

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO**

**Planejamento, Síntese e Avaliação de Derivados 1,2,4-  
Oxadiazólicos com Potencial Atividade Tripanocida**

**Paulo Pitasse Santos**

**2017**



**UFRRJ**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE DERIVADOS 1,2,4-  
OXADIAZÓLICOS COM POTENCIAL ATIVIDADE TRIPANOCIDA**

**PAULO PITASSE SANTOS**

*Sob orientação do Professor*

**Marco Edilson Freire de Lima**

*e Co-Orientação do Doutor*

**Vitor Sueth Santiago**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Orgânica (Química Medicinal).

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P231p Pitasse Santos, Paulo, 1989-  
Planejamento, Síntese e Avaliação de Derivados 1,2,4  
Oxadiazólicos com Potencial Atividade Tripanocida /  
Paulo Pitasse Santos. - 2017.  
170 f.: il.

Orientador: Marco Edilson Freire de Lima.  
Coorientador: Vitor Sueth Santiago.  
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em  
Química, 2017.

1. síntese em fase sólida. 2. antiprotozoário. 3.  
1,2,4-oxadiazol. 4. bioisosterismo. I. Freire de  
Lima, Marco Edilson, 1965-, orient. II. Sueth  
Santiago, Vitor, 1986-, coorient. III Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós  
Graduação em Química. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**PAULO PITASSE SANTOS**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Curso de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Orgânica (Química Medicinal)

Dissertação aprovada em 20 de Fevereiro de 2017.

---

Prof. Marco Edilson Freire de Lima  
(DEQUIM-ICE-UFRRJ)  
(Orientador e Presidente)

---

Prof. Gustavo Henrique Goulart Trossini  
(FCF-USP)

---

Prof. Herbert Leonel M. Guedes  
(IBCCF-UFRJ-Polo Xerém)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar saúde, força e determinação para enfrentar os desafios que se apresentaram ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, Sergio e Célia, que sempre estiveram presentes e me deram suporte e incentivo para poder concretizar meus planos ao longo de toda a minha trajetória. Por me ensinarem, desde sempre, a ser ético, obstinado e forte e por serem pessoas fantásticas das quais muito me orgulho em ser filho.

À minha namorada, amiga e companheira, Gabriela,. por me motivar a buscar o melhor em mim e por ser uma peça essencial na minha vida, me encorajando a seguir a diante independente das dificuldades. Seu amor e carinho fizeram minha existência mais leve e iluminaram minha caminhada. Amo você!

Ao amigo e orientador, Marco Edilson, sem o qual a realização deste trabalho não seria possível. Por compartilhar seus conhecimentos em Química Orgânica e Medicinal que muito agregaram no meu crescimento profissional ao longo deste curso. Por sua paciência, orientações e conselhos, obrigado.

Ao meu co-orientador, Vitor Sueth Santiago, por sua ajuda nas diversas etapas de construção desta dissertação: desde o auxílio na parte experimental até o processo de escrita e correção. Por compartilhar seus conhecimentos e experiência que muito contribuíram para este trabalho.

À professora Débora Decotè Ricardo, quem me introduziu nas áreas de microbiologia e imunologia, ampliando minhas perspectivas na área de Química Medicinal. Obrigado pelos ensinamentos e tempo dedicado a mim e ao meu trabalho.

À professora Rosane Nora Castro pelas análises no HPLC, aulas e pelo suporte gentilmente prestado ao longo das diversas etapas da pesquisa e do curso de pós-graduação.

Ao professor Célio Freire de Lima, da UFRJ, por ceder espaço e material de seu laboratório para a realização de diversas etapas da pesquisa. Também às alunas de doutorado Isabel La Rocque e Joana D'arc por suas dicas, paciência e solicitude nas várias (várias mesmo) vezes que me precisei de auxílio para desvendar problemas no desenvolvimento da parte biológica deste trabalho.

Ao professor Adriano Andricopoulo, da USP-São Carlos, e toda a equipe do Laboratório de Química Medicinal e Computacional, especialmente a Renata Krogh,

Mariana Laureano, Luma Magalhães, Marcelo Tavares e Leonardo Ferreira. Pelo suporte e hospitalidade e pelo material gentilmente cedido.

Aos técnicos do DEQUIM-UFRRJ, Maurício Matos, Frances Santos e Carlos Santana pelo esmero na realização dos espectros de RMN, massas e infra-vermelho.

À professora Wanda Pereira Almeida, do IQ-UNICAMP, pelas análises de Espectrometria de Massas de Alta Resolução.

Aos amigos e "vizinhos" do laboratório de Físico-Química Neubi, Victor, Lipe, Laís, Tati, Gladson e Paulinha pelo bom humor e momentos de descontração.

Aos colegas e amigos dos laboratórios LabQMed 48 e Laboratório de Imunologia e Virologia da UFRRJ, Douglas, Larissa, Raissa Martins, Dominique, Lucas, Juliana, Luiza, Pedro Henrique, Renata, Dany, Israel, Jade, Viviani, Melissa, Raissa Couto e Alice cujas presenças e ajuda foram muito importantes ao longo destes dois anos.

Aos membros da banca por aceitar o convite de ler e acrescentar em nosso trabalho.

Ao **CNPq** pela concessão da minha bolsa de estudos.

À **CAPES**, ao **CNPq** e à **FAPERJ** pelo auxílio financeiro para a execução deste e de outros projetos.

## RESUMO

PITASSE-SANTOS, Paulo. **Planejamento, Síntese e Avaliação de Derivados 1,2,4-Oxadiazólicos com Potencial Atividade Tripanocida**, 2017, 171p. Dissertação (Mestrado em Química, área de concentração Química Orgânica - Química Medicinal). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

A doença de Chagas foi estudada e descrita pelo médico sanitário e cientista brasileiro Carlos Chagas, em 1909. É causada pelo protozoário *Trypanossoma cruzi*, apresentando manifestações clínicas complexas. No entanto, desde sua descoberta, pouco se avançou no tratamento quimioterápico da doença de Chagas, sendo o fármaco disponível (benzonidazol) pouco eficiente e associado à manifestação de diversos efeitos colaterais. A partir do conhecimento da atividade antiparasitária da amida natural piperina, este trabalho focou-se na proposição de novas moléculas estruturalmente semelhantes com potencial tripanocida. A partir dos princípios do bioisosterismo, foi proposta uma série de novos 1,2,4-oxadiazóis diferentemente substituídos. Sua síntese foi concebida partir dos ácidos 3-arylacrílicos correspondentes, obtendo-se os respectivos cloretos de acila, através da reação com cloreto de oxalila. A etapa posterior envolve a *O*-acilação da benzamidoxima adequadamente substituída, seguida do fechamento do anel oxadiazólico, que se dá em em suporte sólido (sílica-gel) empregando-se irradiação de micro-ondas. A caracterização dos produtos foi feita através de ponto de fusão, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , espectrometria no infravermelho e espectrometria de massas de alta e baixa resolução. O presente trabalho ainda traz informações quanto ao perfil de atividade biológica das moléculas sintetizadas frente a formas epimastigotas do protozoário *Trypanosoma cruzi* e frente a células primárias de mamíferos, permitindo que se calculasse o seu índice de seletividade. Investigações quanto a possíveis mecanismos de ação dos derivados sobre o *T. cruzi* indicam não haver influências sobre a ação enzimática da protease cruzaina, sobre o ciclo celular do parasito, nem sobre a biossíntese de esteróis de membrana, catalisada pela enzima CYP51. A metodologia química desenvolvida poderá ser aplicada na síntese de outros análogos. As perspectivas deste trabalho incluem ainda a avaliação biológica frente a formas amastigota e tripomastigota do parasito.

**Palavras-chave:** síntese em fase sólida, antiprotozoário, 1,2,4-oxadiazol, bioisosterismo.

## ABSTRACT

PITASSE-SANTOS, Paulo. **Planning, Synthesis and Evaluation of potentially tripanocidal 1,2,4-Oxadiazolic Derivatives**, 2017, 170p. Dissertation (Masters in Chemistry, Focused in Organic Chemistry - Medicinal Chemistry). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

Chagas disease was studied and described by the Brazilian sanitarian and physician Carlos Chagas in 1909. It is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and presents complex clinical manifestations. However, since its discovery, little progress has been made in the chemotherapeutic treatment of Chagas' disease. The only available drug for its treatment (benznidazole) is not completely efficient and is associated with the development of several side effects. From the knowledge of the antiparasitic activity of the natural amidic alkaloid piperine, this work focused on the proposition of new structurally-similar molecules with trypanocidal potential. From the principles of bioisosterism, a series of new 1,2,4-oxadiazoles were proposed. Its synthesis was designed from the corresponding 3-arylacrylic acids to give the respective acyl chlorides by reaction with oxalyl chloride. The subsequent step involves *O*-acylation of the properly substituted benzamidoxime following the cyclization reaction of the oxadiazolic ring, which occurs in solid support (silica gel) using microwave irradiation. The characterization of the products was done by determination of melting points,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, infrared spectrometry and high and low resolution mass spectrometry. The present work also presents information about the biological activity profile of the molecules synthesized against epimastigote forms of the *T. cruzi* protozoan and against primary mammalian cells, allowing the calculation of their selectivity indexes. Investigations about the possible mechanisms of action of the derivatives on *T. cruzi* indicate that there are no influences on the enzymatic action of the protease cruzain, on the cell cycle of the parasite or on the biosynthesis of membrane sterols catalyzed by the enzyme CYP51. The developed synthetic methodology can be applied in the expansion of the series of analogues derivatives. The perspectives of this work also include the biological evaluation against amastigote and trypomastigote forms of the parasite.

**Key-words:** solid phase synthesis, atiprotozoan, 1,2,4-oxadiazole, bioisosterism.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> nos hospedeiros vertebrado e invertebrado, explicitando-se suas respectivas formas celulares. Traduzido de <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> .....	2
<b>Figura 2.</b> Estrutura do Benzonidazol ( <b>1</b> ), fármaco de utilidade clínica reconhecida na fase aguda da doença. ....	3
<b>Figura 3.</b> Estrutura da cruzaína co-cristalizada com inibidor nitrílico nitrílico - PDB 4QH6 .....	5
<b>Figura 4.</b> Estruturas moleculares do cetoconazol ( <b>2</b> ), fluconazol ( <b>3</b> ) e do posaconazol ( <b>4</b> ): importantes inibidores da CYP51 .....	6
<b>Figura 5.</b> Microscopia eletrônica mostrando uma forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> sem tratamento (a), uma forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> tratado com taxol 10µM por 72h (b) e a estrutura molecular do taxol, <b>5</b> .....	7
<b>Figura 6.</b> Estruturas da quinina ( <b>6</b> ) e da penicilina G ( <b>7</b> ) .....	7
<b>Figura 7.</b> Participação dos produtos naturais na área de desenvolvimento de fármacos ...	8
<b>Figura 8.</b> Piperina ( <b>8</b> ), principal constituinte dos frutos de <i>Piper nigrum</i> .....	9
<b>Figura 9.</b> Derivados análogos à piperina <b>8</b> avaliados frente a <i>T. cruzi</i> .....	10
<b>Figura 10.</b> Estruturas dos cloridratos mesoiônicos testados contra <i>T. cruzi</i> .....	12
<b>Figura 11.</b> Novos derivados oxadiazólicos ( <b>30-38</b> ), derivados e análogos da piperina preparados por Soares .....	13
<b>Figura 12.</b> Isômeros dos oxadiazóis .....	14
<b>Figura 13.</b> Trabalhos publicados desde 1997 até o presente abordando os 1,2,4-oxadiazóis, com destaque para pesquisa nas áreas de química medicinal e farmacologia .....	15
<b>Figura 14.</b> Exemplos de moléculas contendo o núcleo 1,2,4-oxadiazólico com atividade biológica: antitumoral, <b>39</b> , antiinflamatória e antifúngica, <b>40</b> , antimicrobiana, <b>41</b> , antiparasitária, <b>42</b> , e inseticida, <b>43</b> .....	15
<b>Figura 15.</b> a) Molusco marinho <i>Phidiana militaris</i> . b) Estrutura molecular das fidianinas A ( <b>44</b> ) e B ( <b>45</b> ), 1,2,4-oxadiazóis de origem natural com interessante perfil biológico ....	16
<b>Figura 16.</b> Estruturas químicas da Oxolamina ( <b>46</b> ), Libexina ( <b>47</b> ) e do Irrigor ( <b>48</b> ), princípios ativos de fármacos de utilidade clínica reconhecida que contém o núcleo 1,2,4-oxadiazólico .....	17
<b>Figura 17.</b> 1,2,4-oxadiazol-acilidrazônico com atividade contra <i>T. cruzi</i> .....	17
<b>Figura 18.</b> Estrutura da combrestatina A-4 ( <b>68</b> ) com destaque para o grupo farmacofórico 3,4,5-trimetóxi-fenila, importante em mecanismos antimitóticos .....	25

<b>Figura 19.</b> a) Estrutura geral dos 1,2,4-oxadiazóis planejados para este trabalho; b) comparação entre as estruturas da piperina <b>8</b> e do composto <b>31</b> .....	<b>26</b>
<b>Figura 20.</b> Aparelho de micro-ondas <i>CEM Discover System</i> , utilizado nas sínteses descritas neste trabalho .....	<b>27</b>
<b>Figura 21.</b> Estrutura dos 1,2,4-oxadiazóis preparados neste trabalho.....	<b>28</b>
<b>Figura 22.</b> Ácidos 3-arylacrílicos utilizados para a síntese dos 1,2,4-oxadiazóis.....	<b>29</b>
<b>Figura 23.</b> Projeções de Newman para os confômeros do intermediário dicarboxílico que originam produto com geometria <i>Z</i> (a) e com geometria <i>E</i> (b) .....	<b>31</b>
<b>Figura 24.</b> Estrutura das benzamidoximas utilizadas ( <b>94</b> e <b>95</b> ) neste trabalho.e das respectivas benzonitrilas ( <b>94a</b> e <b>95a</b> ) utilizadas em sua preparação.....	<b>32</b>
<b>Figura 25.</b> Detalhe do espectro de RMN <sup>1</sup> H (500MHz) para o oxadiazol <b>70</b> .....	<b>38</b>
<b>Figura 26.</b> Detalhe do espectro de RMN <sup>1</sup> H (DETP-Q, 500MHz) para o oxadiazol <b>70</b> ...	<b>39</b>
<b>Figura 27.</b> Espectro de IV para o oxadiazol <b>81</b> com as respectivas atribuições .....	<b>40</b>
<b>Figura 28.</b> Espectrometria de massas (IE, 70eV) para o oxadiazol <b>69</b> .....	<b>40</b>
<b>Figura 29.</b> Estruturas dos compostos com maior atividade dentre a série preparada neste trabalho e seus respectivos valores de CI <sub>50</sub> frente a epimastigotas de <i>T. cruzi</i> (Tulahuen C2C4 e Dm28c).....	<b>46</b>
<b>Figura 30.</b> a) Estrutura de oxadiazol relatado como potente inibidor da atividade catalítica da cruzaina (IC <sub>50</sub> = 0,2µM). b) Reação de clivagem do substrato peptídico Z-Phe-Arg-AMC ( <b>101</b> ) em presença da protease cruzaina liberando o grupo fluorescente AMC ( <b>102</b> ) .....	<b>47</b>
<b>Figura 31.</b> Histogramas de fluorescência mostrando o conteúdo de DNA correspondentes às fases G1, S e G2 dos parasitos tratados com: a) 0,3% DMSO (controle negativo). b) taxol ( <b>5</b> ) a 20 µM (controle positivo). c) <b>70</b> a 100 µM. d) <b>70</b> a 50 µM. e) <b>70</b> a 10 µM. f) <b>74</b> a 100 µM. g) <b>74</b> a 50 µM. h) <b>74</b> a 10 µM.....	<b>50</b>
<b>Figura 32.</b> Estruturas químicas dos esteróis lanosterol ( <b>104</b> ) e ergosterol ( <b>105</b> ).....	<b>51</b>
<b>Figura 33.</b> Cromatogramas obtidos por CLAE referentes às respectivas frações lipídicas não saponificáveis extraídas de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> (Dm28c) nas seguintes situações: a) sem tratamento; b) tratamento com DMSO 0,03% v/v; c) cetoconazol ( <b>3</b> ) a 0,5 µM; d) tratamento com <b>74</b> a 10 µM; e) tratamento com <b>82</b> a 8 µM; f) cromatogramas sobrepostos: sem tratamento (preto), DMSO (rosa), cetoconazol a 0,5 µM (azul), <b>82</b> a 10 µM (marrom) e <b>82</b> a 8 µM (verde).....	<b>52</b>

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Principais vias sintéticas para a obtenção de 1,2,4-oxadiazóis: a) cicloadição 1,3-dipolar de N-óxidos de nitrilas e nitrilas; b) formação de O-acilamidoximas seguida de desidratação .....	<b>18</b>
<b>Esquema 2.</b> Preparação de 1,2,4-oxadiazóis por Chiou & Shine.....	<b>19</b>
<b>Esquema 3.</b> Síntese de 1,2,4-oxadiazóis a partir de benzamidoximas e ácidos benzóicos em presença de CDI .....	<b>19</b>
<b>Esquema 4.</b> Proposta mecanística para reação de acilação de nucleófilo (NuH) em presença de ácido carboxílico e CDI.....	<b>20</b>
<b>Esquema 5.</b> Metodologia de síntese de 1,2,4-oxadiazóis com irradiação de ultrassom ..	<b>21</b>
<b>Esquema 6.</b> Metodologia para síntese de 1,3,4-oxadiazóis proposta por Sangshetti <i>et al</i> (2008) .....	<b>24</b>
<b>Esquema 7.</b> Esquema reacional proposto por Kaboudin & Navaee para a síntese de 1,2,4-oxadiazóis em suporte sólido e irradiação de micro-ondas.....	<b>24</b>
<b>Esquema 8.</b> Análise retrossintética para a preparação dos 1,2,4-oxadiazóis planejados.....	<b>26</b>
<b>Esquema 9.</b> Reação de formação dos ácidos 3-arilacrílicos <b>84</b> , <b>86</b> , <b>90</b> e <b>91</b> .....	<b>30</b>
<b>Esquema 10.</b> Mecanismo geral de formação dos ácidos 3-arilacrílicos através da reação de Knoevenagel.....	<b>30</b>
<b>Esquema 11.</b> Propostas de fragmentação para os ácidos 3-arilacrílicos .....	<b>32</b>
<b>Esquema 12.</b> Reação de síntese das benzamidoximas utilizadas neste trabalho.....	<b>33</b>
<b>Esquema 13.</b> Proposta mecanística para a reação de formação das benzamidoximas.....	<b>33</b>
<b>Esquema 14.</b> Propostas de fragmentação para as benzamidoximas.....	<b>37</b>
<b>Esquema 15.</b> Metodologia sintética <i>one-pot</i> para obtenção dos ácidos 3-arilacrílicos e das respectivas benzamidoximas.....	<b>35</b>
<b>Esquema 16.</b> Mecanismo geral para a reação de formação dos cloretos de acila.....	<b>36</b>
<b>Esquema 17.</b> Proposta mecanística para a reação de formação dos oxadiazóis .....	<b>37</b>
<b>Esquema 18.</b> Propostas de fragmentação para o oxadiazol <b>69</b> .....	<b>41-42</b>
<b>Esquema 19.</b> Reação colorimétrica de clivagem do CPRG ( <b>96</b> ) em galactose ( <b>97</b> ) e vermelho de clorofenol ( <b>98</b> ).....	<b>43</b>
<b>Esquema 20.</b> Reação colorimétrica de clivagem do sal de MTT ( <b>99</b> ), de coloração amarelo-pálida, dando origem à formazana de MTT ( <b>100</b> ), de coloração violeta-azulada .....	<b>45</b>
<b>Esquema 21.</b> Reação colorimétrica de formação do derivado formazana ( <b>108</b> ) a partir do sal de XTT ( <b>106</b> ) catalisada pelo PMS ( <b>107</b> ).....	<b>54</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Tabela de $CI_{50}$ do benzonidazol da piperina e dos derivados análogos ( <u>9-20</u> ) frente a <i>T. cruzi</i> nas formas epimastigota e amastigota .....	<b>11</b>
<b>Tabela 2.</b> Valores de $CI_{50}$ ( $\mu M$ ) para piperina ( <u>2</u> ), derivados ( <u>21-29</u> ) e benzonidazol ( <u>1</u> ) frente a diferentes formas do <i>T. cruzi</i> .....	<b>13</b>
<b>Tabela 3.</b> Constantes dielétricas ( $\epsilon'$ ) e fatores de dissipação ( $\tan \delta$ ) para diferentes solventes utilizados em síntese orgânica.....	<b>23</b>
<b>Tabela 4.</b> Aldeídos diferentemente substituídos ( <u>84a</u> , <u>86a</u> , <u>90a</u> e <u>91a</u> ) utilizados na preparação dos respectivos ácidos 3-arylacrílicos ( <u>84</u> , <u>86</u> , <u>90</u> e <u>91</u> ).....	<b>29</b>
<b>Tabela 5.</b> Valores de $CI_{50}$ frente a epimastigotas de <i>T. cruzi</i> (cepa Tulahuen C2C4) calculados para os compostos <u>69-82</u> .....	<b>44</b>
<b>Tabela 6.</b> Valores de $CI_{50}$ frente a epimastigotas de <i>T. cruzi</i> (cepa Dm28C) calculados para os compostos <u>69-82</u> .....	<b>45</b>
<b>Tabela 7.</b> Resultados da avaliação <i>in vitro</i> da inibição da atividade enzimática da protease cruzaina em presença dos derivados <u>69-82</u> .....	<b>48</b>
<b>Tabela 8.</b> Valores de $DL_{50}$ frente a macrófagos peritoneais e esplenócitos totais de camundongo BALB/c calculados para os compostos <u>69-82</u> .....	<b>55</b>
<b>Tabela 9.</b> Valores dos respectivos índices de seletividade (IS) para os derivados <u>66-79</u> para epimastigotas de cruzi (cepas Tulahuen C2C4 e Dm28c) frente a macrófagos e esplenócitos murinos primários.....	<b>56</b>
<b>Tabela 10.</b> Reagentes e rendimentos das reações de formação dos ácidos 3-arylacrílicos.....	<b>58</b>
<b>Tabela 11.</b> Caracterização dos ácidos 3-arylacrílicos: P.F. observados em comparação com dados da literatura e fragmentos característicos do EM (IE, 70eV).....	<b>59</b>
<b>Tabela 12.</b> Quantidades de reagentes usados nas reações de formação dos 1,2,4-oxadiazóis <u>69-82</u> .....	<b>61</b>
<b>Tabela 13.</b> Massas obtidas, rendimento das reações de formação, pontos de fusão e sinais característicos de RMN <sup>13</sup> C e EM para os oxadiazóis <u>69-82</u> .....	<b>62</b>
<b>Tabela 14.</b> Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>13</sup> C para o oxadiazol <u>69</u> .....	<b>64</b>
<b>Tabela 15.</b> Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>13</sup> C para o oxadiazol <u>70</u> .....	<b>65</b>
<b>Tabela 16.</b> Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>13</sup> C para o oxadiazol <u>71</u> .....	<b>67</b>

<b>Tabela 17.</b> Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>13</sup> C para o oxadiazol <u>72</u> .....	<b>68</b>
<b>Tabela 18.</b> Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>13</sup> C para o oxadiazol <u>73</u> .....	<b>70</b>
<b>Tabela 19.</b> Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>13</sup> C para o oxadiazol <u>74</u> .....	<b>71</b>
<b>Tabela 20.</b> Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>13</sup> C para o oxadiazol <u>75</u> .....	<b>72</b>
<b>Tabela 21.</b> Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>13</sup> C para o oxadiazol <u>76</u> .....	<b>74</b>
<b>Tabela 22.</b> Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>13</sup> C para o oxadiazol <u>77</u> .....	<b>75</b>
<b>Tabela 23.</b> Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>13</sup> C para o oxadiazol <u>78</u> .....	<b>76</b>
<b>Tabela 24.</b> Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>13</sup> C para o oxadiazol <u>79</u> .....	<b>78</b>
<b>Tabela 25.</b> Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>13</sup> C para o oxadiazol <u>80</u> .....	<b>79</b>
<b>Tabela 26.</b> Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>13</sup> C para o oxadiazol <u>81</u> .....	<b>81</b>
<b>Tabela 27.</b> Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>13</sup> C para o oxadiazol <u>82</u> .....	<b>82</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- AMC = 7-amino-4-metilcumarina)  
BHI = *Brain heart infusion*  
CLAE = Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos  
CCF = Cromatografia em camada fina  
CDI = Carbonil-diimidazol  
CI<sub>50</sub> = Concentração Inibitória de 50%  
CPRG = *Chlorophenol red β-D-galactopyranoside*  
d = duplete  
dd = duplo duplete  
DC = Doença de Chagas  
DCA = Doença de Chagas Aguda  
DCM = Diclorometano  
DL<sub>50</sub> = Dose Letal de 50%  
DMSO = Dimetilsulfóxido  
EMBR/IE = Espectrometria de massas de baixa resolução com ionização por Impacto de elétrons  
EMAR/ES+ = Espectrometria de Massa de Alta Resolução com ionização por *Electronspray* no modo positivo  
Hz = Hertz  
IS = Índice de Seletividade  
IV = InfraVermelho  
J = constante de acoplamento  
LIT = *Liver infusion tryptose*  
M<sup>+</sup>. = Íon Molecular  
m = multiplete  
MTT = (4,5-dimetil-2-((E)-[(Z)-fenil(2-fenilhidrazinilideno)metil]diazetil)-1,3-tiazol  
m/z = razão massa-carga  
PBS = Solução Tampão de Fosfato  
P.F. = Ponto de fusão  
PN = Produto Natural  
ppm = parte do milhão  
RMN<sup>1</sup>H = Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio  
RMN<sup>13</sup>C = Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13  
s = simpleto  
SFB = Soro Fetal Bovino  
SNC = Sistema nervoso central  
t = tripleto  
XTT = 2,3-Bis-(2-Metoxi-4-Nitro-5-Sulfofenil)-2H-Tetrazol-5-Carboxanilida  
δ = deslocamento químico  
ν = estiramento  
μM = micromolar  
λ = comprimento de onda

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. A doença de Chagas e os desafios nas pesquisas por novos fármacos .....	<b>1</b>
1.2. O potencial dos produtos naturais na descoberta de moléculas aplicáveis na modulação de fenômenos biológicos .....	<b>7</b>
1.3. Piperina: o potencial da amida natural e análogos e sintéticos semissintéticos para a quimioterapia da doença de Chagas.....	<b>9</b>
1.4. O núcleo oxadiazólico .....	<b>14</b>
1.5. Síntese assistida por micro-ondas .....	<b>21</b>
<b>2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS</b> .....	<b>25</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>28</b>
3.1. Obtenção dos ácidos 3-irilacrílicos diferentemente substituídos .....	<b>28</b>
3.2. Síntese das benzamidoximas .....	<b>32</b>
3.3. Estratégia adotada para a síntese de 1,2,4-oxadiazóis .....	<b>34</b>
3.4. Caracterização dos produtos .....	<b>37</b>
3.5. Determinação da atividade biológica dos 1,2,4-oxadiazóis frente a epimastigotas de <i>T. cruzi</i> (cepas Tulahuen C2C4 e Dm28c) e investigação quanto a possíveis mecanismos de ação .....	<b>42</b>
3.6. Investigação quanto a possíveis mecanismos de ação dos 1,2,4-oxadiazóis frente ao <i>T. cruzi</i> .....	<b>46</b>
3.6.1. Inibição da atividade catalítica da protease cruzaina .....	<b>46</b>
3.6.2. Avaliação das alterações sobre o ciclo celular do <i>T. cruzi</i> .....	<b>49</b>
3.6.3. Alterações no processo biossintético de lipídeos de membrana.....	<b>51</b>
3.7. Determinação da atividade biológica dos 1,2,4-oxadiazóis frente a macrófagos peritoniais e esplenócitos totais de camundongos.....	<b>53</b>
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>56</b>
4.1. Materiais e métodos. ....	<b>56</b>
4.1.1. Instrumentos utilizados nas caracterizações espectrométricas .....	<b>56</b>
4.1.2. Instrumentos utilizados nas análises, sínteses e purificações.....	<b>57</b>
4.1.3. Instrumentos e reagentes utilizados nos ensaios biológicos .....	<b>57</b>
4.1.4. Outros equipamentos .....	<b>57</b>
4.2. Experimental geral para a preparação dos ácidos cinâmicos.....	<b>58</b>
4.3. Experimental geral para a preparação das benzamidoximas .....	<b>59</b>
4.4. Experimental geral para a preparação dos derivados 1,2,4-oxadiazólicos .....	<b>60</b>

4.5. Caracterização dos derivados 1,2,4-oxadiazólicos <b>69-82</b> .....	<b>63</b>
4.5.1. Derivado <b>69</b> (3-fenil-5-[(Z)-2-fenilvinil]-1,2,4-oxadiazol).....	<b>63</b>
4.5.2. Derivado <b>70</b> (5-[(Z)-2-(3-metóxfenil)vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol).....	<b>64</b>
4.5.3. Derivado <b>71</b> (5-[(Z)-2-(4-metóxfenil)vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol).....	<b>66</b>
4.5.4. Derivado <b>72</b> (5-[(E)-2-(1,3-benzodioxan-5-il)vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol).....	<b>67</b>
4.5.5. Derivado <b>73</b> (5-[(E)-2-(2,3-benzodioxin-6-il)vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol).....	<b>69</b>
4.5.6. Derivado <b>74</b> (5-[(E)-2-(furan-2-il)-vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol).....	<b>70</b>
4.5.7. Derivado <b>75</b> (5-[(E)-2-(tiofen-2-il)-vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol).....	<b>71</b>
4.5.8. Derivado <b>76</b> (5-[(E)-2-(4-fluorfenil)-vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol).....	<b>73</b>
4.5.9. Derivado <b>77</b> (5-[(E)-2-(4-clorofenil)-vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol).....	<b>74</b>
4.5.10. Derivado <b>78</b> (5-[(E)-2-(4-nitrofenil)-vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol).....	<b>75</b>
4.5.11. Derivado <b>79</b> (5-[(E)-2-fenilvinil]-3-(3,4,5-trimetoxifenil-1,2,4-oxadiazol).....	<b>77</b>
4.5.12. Derivado <b>80</b> (5-[(E)-2-(3-metoxifenil)vinil]-3-(3,4,5-trimetoxifenil-1,2,4-oxadiazol).....	<b>78</b>
4.5.13. Derivado <b>81</b> (5-[(E)-2-(1,3-benzodioxin-5-il)vinil]-3-(3,4,5-trimetoxifenil-1,2,4-oxadiazol).....	<b>80</b>
4.5.14. Derivado <b>82</b> (5-[(E)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol).....	<b>81</b>
4.6. Protocolo experimental para ensaio de atividade biológica frente a epimastigotas de <i>T. cruzi</i> (Tulahuen C2C4).....	<b>83</b>
4.7. Protocolo experimental para ensaio de atividade biológica frente a epimastigotas de <i>T. cruzi</i> (Dm28c).....	<b>83</b>
4.8. Protocolo experimental para ensaio de inibição da protease cruzaina.....	<b>84</b>
4.9. Análise do ciclo celular através de citometria de fluxo.....	<b>84</b>
4.10. Extração dos lipídeos de membrana.....	<b>85</b>
4.11. Análise dos lipídios de membrana por CLAE.....	<b>85</b>
4.12. Protocolo experimental para ensaio de citotoxicidade frente a macrófagos peritoniais e esplenócitos totais de camundongo.....	<b>86</b>
<b>5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>87</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>88</b>
<b>7. ANEXOS</b> .....	<b>98</b>

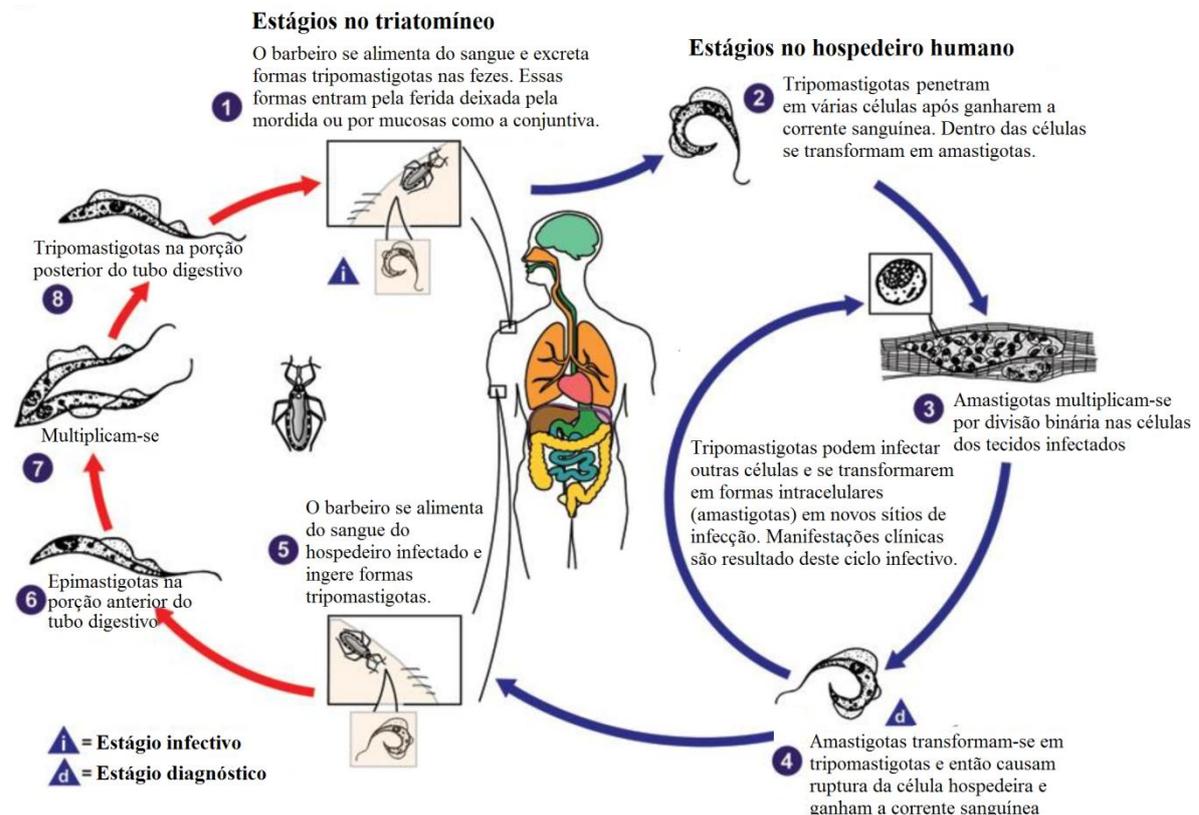
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A doença de Chagas e os desafios nas pesquisas por novos fármacos

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, é uma parasitose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) que foi descoberta e descrita por completo por Carlos Chagas, em 1909, desde a identificação do vetor, do agente etiológico, formas de transmissão, hospedeiros e manifestações clínicas (CHAGAS, 1909). O *T. cruzi* apresenta diferentes formas evolutivas ao longo de seu ciclo de vida: epimastigota (forma replicativa no vetor invertebrado), tripomastigota (forma infectiva) e amastigota (forma replicativa nas células do hospedeiro vertebrado) (BRENER E ANDRADE, 1979).

Em ocorrências naturais, a transmissão do *T. cruzi* se dá por meio da picada de insetos triatomíneos pertencentes aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (popularmente conhecidos como barbeiros) que estejam infectados com o parasito. Ao ingerir o sangue do indivíduo o barbeiro se incha e libera fezes contendo o *T. cruzi* na forma tripomastigota. Ao coçar o local da picada, o indivíduo carrega as fezes contaminadas até a ferida resultante da picada ou até mucosas, de forma que o parasito alcance a corrente sanguínea do hospedeiro. Ao penetrar em uma célula do hospedeiro (macrófagos e cardiomiócitos, por exemplo) o *T. cruzi* se diferencia em amastigota e se multiplica por fissão binária até causar a morte desta célula. Os parasitos se diferenciam em tripomastigotas ainda dentro da célula de forma que, ao romper-se a membrana celular, os parasitos são liberados novamente na corrente sanguínea prontos para infectar novas células, repetindo-se o ciclo descrito (BRENER E ANDRADE, 1979). Esse processo caracteriza a fase aguda da doença de Chagas, que se estende pelos primeiros meses após a infecção quando se pode observar uma alta carga parasitária na corrente sanguínea do hospedeiro. Geralmente não apresenta sintomas ou os apresenta de forma moderada, podendo incluir aumento do fígado e dos linfonodos, exantema (erupção cutânea), perda de apetite, um inchaço no local da picada (chagoma) e, em alguns casos, o sinal de Romaña (edema inflamatório bipalpebral unilateral) (REY, 2001). Quando um barbeiro não infectado pelo *T. cruzi* pica um hospedeiro que se encontra na fase aguda da doença, o triatomíneo adquire o parasito, que por sua vez se diferencia em epimastigota na porção anterior do tubo digestivo do inseto, se multiplica por fissão binária e se diferencia novamente em tripomastigota na porção posterior do

tubo digestivo (BRENER E ANDRADE, 1979). O ciclo infectivo descrito pode ser melhor visualizado na **Figura 1**.



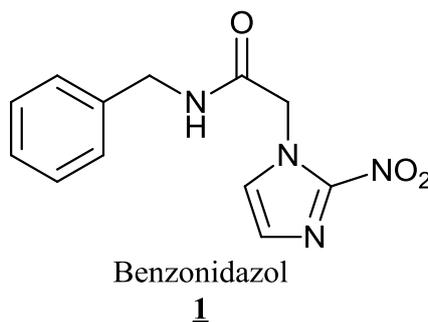
**Figura 1.** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* nos hospedeiros vertebrado e invertebrado, explicitando-se suas respectivas formas celulares. Traduzido de *Centers for Disease Control and Prevention* ([www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html](http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html)).

Após a fase aguda da doença a quantidade de parasitos na forma tripomastigota (encontrados na corrente sanguínea) diminui drasticamente e a maior parte da população de *T. cruzi* no hospedeiro passa a permanecer na forma amastigota (intracelular), caracterizando a fase crônica da doença. Os indivíduos infectados passam, então, por longos períodos sem manifestar sintomas após os quais podem apresentar quadros de megacólon, megaesôfago e, mais frequentemente, cardiomegalia. (COURA & BORGES-PEREIRA, 2011). Além da contaminação por via vetorial, existem outras formas clinicamente relevantes, como transfusão de sangue, transplante de órgãos (WENDEL, 2010), via vertical placentária, amamentação (DIAZ-LUJÁN *et al*, 2012) e via oral (BENCHIMOL-BARBOSA, 2009).

A Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* - WHO) caracteriza a tripanossomíase americana como uma doença tropical extremamente negligenciada, ou seja, uma doença que aflige principalmente populações pobres, que

possuem pouco acesso a condições sanitárias adequadas. Além disso, por tal população não representar um mercado com alto potencial econômico, as empresas farmacêuticas não investem em pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos para tratamento destas doenças (WHO, 2010). No caso da doença de Chagas, o vetor responsável pela transmissão do parasito pode comumente ser encontrado em frestas de paredes em casas de pau-a-pique, construções comuns em áreas pobres de zonas rurais (LEITE DIAS *et al*, 2016). Dados ainda revelam que cerca de 50.000 novos casos de doença de chagas são registrados anualmente somente na América Latina (WHO, 2012).

O único fármaco utilizado no tratamento da doença de Chagas é o derivado nitro-heterocíclico benzonidazol (**1**), cuja estrutura molecular é mostrada na **Figura 2**, além de não conseguir, em muitos casos, erradicar o parasita no hospedeiro, é também de alto risco, devido à toxicidade das doses utilizadas e aos efeitos adversos associados à sua administração, como por exemplo anorexia e perda de peso, náusea e vômito, excitação nervosa, insônia, depressão psíquica, convulsões, vertigem, dores de cabeça, sonolência, perda de equilíbrio, perda de memória e intolerância hepática. (MAYA *et al*, 2007; CASTRO & DIAZ, 1988). Outro inconveniente da administração prolongada do Benzonidazol emerge da sua associação a processos mutagênicos, potencialmente ligados à tumorigênese e à carcinogênese (CASTRO *et al*, 2006).



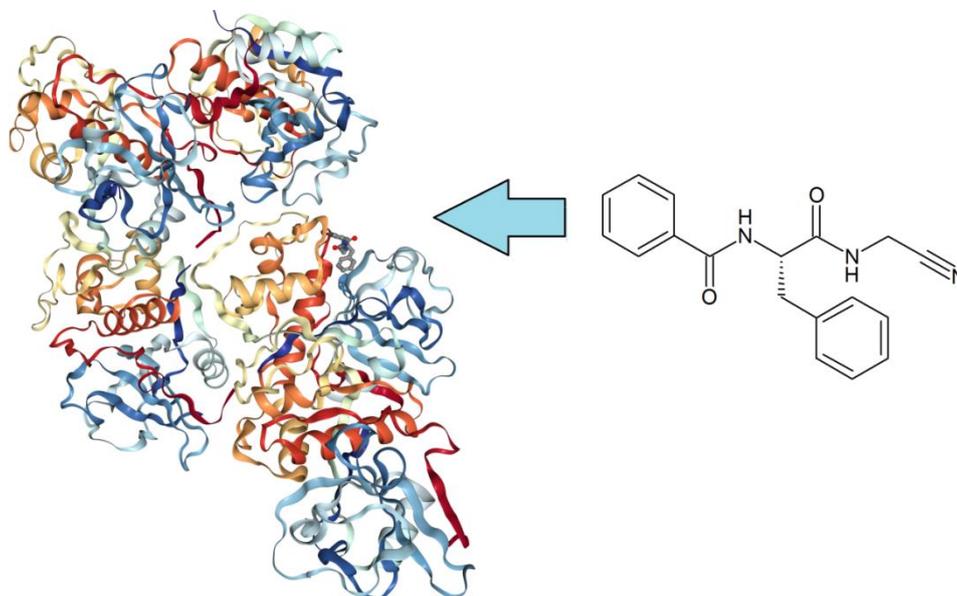
**Figura 2.** Estrutura do Benzonidazol (**1**), fármaco de utilidade clínica reconhecida na fase aguda da doença de Chagas.

O benzonidazol, apresenta boa eficácia frente a parasitos na forma tripomastigota presentes na corrente sanguínea, portanto, durante a fase aguda da doença, que é mais curta e geralmente assintomática. No entanto para o tratamento da fase crônica da doença de Chagas, quando predominam as formas amastigotas intracelulares do parasito, não existe nenhum fármaco eficaz (MAYA *et al*, 2007).

A dimensão do desafio a ser encarado pelos pesquisadores dessa área emerge, seja do ponto de vista da busca de novas substâncias com atividade tripanocida satisfatória, seja da busca por fármacos que apresentem reduzidos efeitos adversos ou da compreensão dos diversos mecanismos possíveis de ação antiparasitária de tais substâncias, propiciando uma busca mais racional por novos compostos protótipos. Dentre as estratégias no planejamento de moléculas com potencial para a quimioterapia da doença de Chagas podem-se citar a inibição de proteases (múltiplas funções no organismo do parasito, e.g., cruzaina), inibição da biossíntese de esteróis (componentes das membranas celular e mitocondrial, e.g., ergosterol), alteração dos mecanismos de formação dos microtúbulos celulares (importantes no processo de divisão celular, de formação do citoesqueleto e de outros componentes estruturais da célula do parasito), alteração de processos de obtenção de energia do parasito (e.g., via glicolítica e inibição de proteínas quinases), inibição da biossíntese de lipídeos (presentes em diversos constituintes celulares, e.g., glicosfingolipídeos), alteração de processos de controle do stress oxidativo (e.g., metabolismo dependente de grupos tióis, metabolismo de pensotse fosfato e transporte de poliaminas), alteração em processos de replicação do material genético (inibição da síntese de nucleotídeos e de DNA topoisomerases), alteração no funcionamento de organelas celulares (e.g., núcleo, cinetoplasto e glicosomo) e inibição de mecanismos de evasão do sistema imunológico do hospedeiro (e.g., inibição da trans-sialidase). Apesar do alto número de alternativas, argumentos como a existência de isoformas no hospedeiro (DIAS *et al*, 2009) e a disponibilidade de informação na literatura (Pesquisa realizada na base de dados Scopus com as palavras-chave "*Trypanosoma cruzi*" e os nomes dos respectivos alvos - <https://www.scopus.com>) nos levaram a, neste trabalho, abordar com mais profundidade somente as estratégias de inibição da protease cruzaina, inibição da rota biossintética de ergosterol e inibição de polimerização de tubulina na formação dos microtúbulos.

As proteases são uma família de enzimas que têm por função catalisar a quebra de ligações peptídicas, como as cisteíno proteases, serino proteases, metaloproteínas e treonino proteases (MCKERROW *et al*, 2008; DUSCHAK & COUTO, 2007) e estão envolvidas em diversas funções celulares desde a invasão celular até a evasão do sistema imune do hospedeiro. As proteases, devido à sua função biológica, apresentam sítios ativos grandes do ponto de vista molecular, havendo possibilidade de ligação em diferentes sub-sítios em se tratando de micromoléculas (100-1000Da). (SAJID & MCKERROW, 2002). Um importante alvo dentro desse contexto é a cruzaina, a

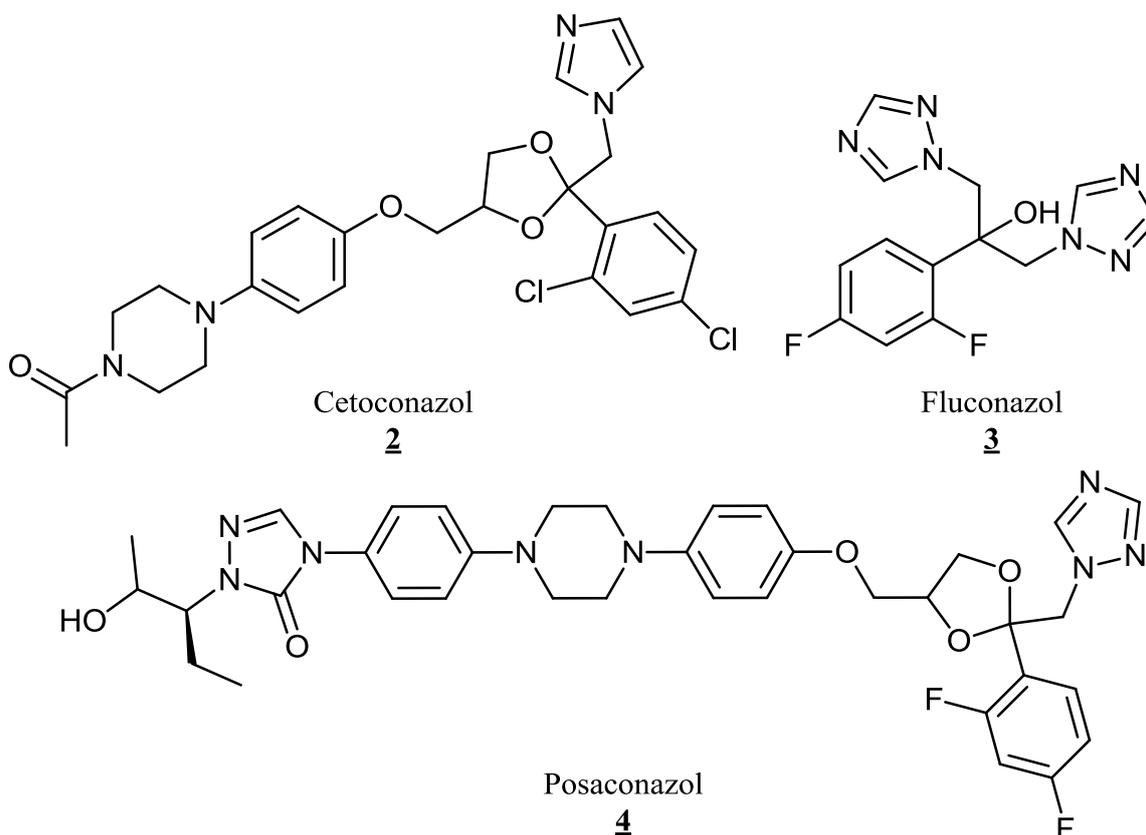
cisteíno protease mais abundantemente encontrada no *T. cruzi*. Dentre as moléculas com atividade inibitória sobre a cruzaina (**Figura 3**), os derivados peptídicos constituem a classe mais importante (BRAK *et al*, 2008).



**Figura 3.** Estrutura da cruzaina co-cristalizada com inibidor nitrílico - PDB 4QH6 (AVELAR *et al*, 2015).

A biossíntese de esteróis também é um alvo amplamente explorado na busca por quimioterápicos para a doença de Chagas. Esteróis são importante componentes estruturais de células, estando presente em membranas celulares de animais e plantas (ESPENSHADE & HUGHES, 2007). Já em organismos unicelulares, os esteróis são também essenciais ao crescimento celular. A alteração ou inibição de sua via biossintética desponta como uma estratégia atraente no planejamento de moléculas com atividade antichagásica, uma vez que existem diferenças significativas na estrutura de esteróis de mamíferos e de protozoários, sendo colesterol e ergosterol respectivamente os principais esteróis encontrados em cada família de organismos. No caso da biossíntese do ergosterol, as enzimas envolvidas mais bem descritas são esterol 14 $\alpha$ -demetilase (ou CYP51), lanosterol sintase, esqualeno epoxidase, esqualeno sintase, e a  $\Delta$ -24(25) esterol metiltransferase (DE SOUZA & RODRIGUES, 2009). Os inibidores de biossíntese de ergosterol são os únicos candidatos a fármacos para tratamento da doença de Chagas que alcançaram a etapa de triagem clínica. Dentre os inibidores de maior relevância nessa classe podem-se citar os inibidores de CYP51 cetoconazol (**2**),

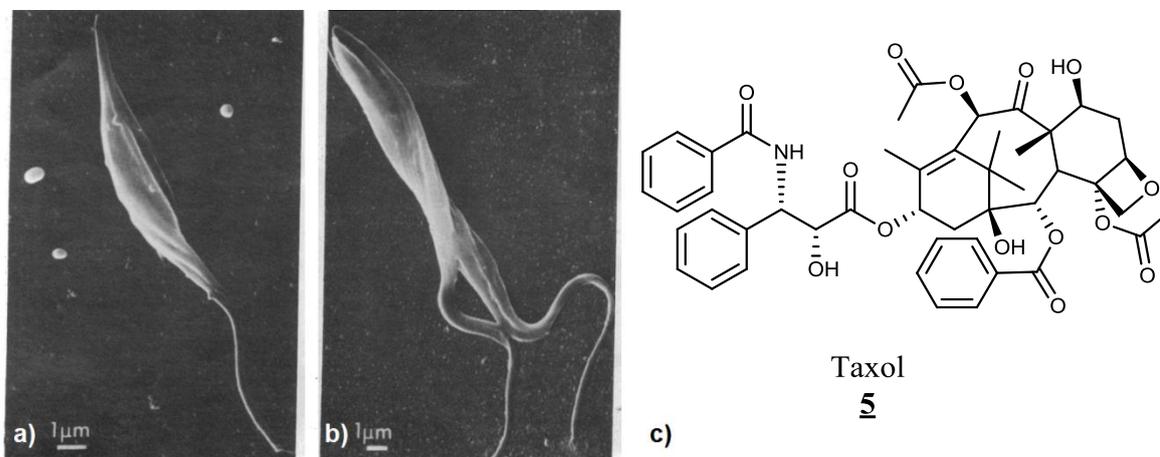
fluconazol (**3**) e posaconazol (**4**), cujas estruturas moleculares são mostradas na **Figura 4** (MCKERROW *et al*, 2008; DIAS *et al*, 2009).



**Figura 4.** Estruturas moleculares do cetoconazol (**2**), fluconazol (**3**) e do posaconazol (**4**): importantes inibidores da CYP51 (DIAS *et al*, 2009).

Os microtúbulos têm importância em componentes estruturais do parasito, como o citoesqueleto (influenciando no formato do parasito) e o flagelo, e no processo de divisão celular, na formação do fuso mitótico. Os microtúbulos são estruturas poliméricas formadas por dois monômeros polipeptídicos, a  $\alpha$ - e a  $\beta$ -tubulina, que se encontram dispostos de maneira alternada no polímero (ROBINSON *et al*, 1991; SEEDBECK *et al*, 1990). Dessa forma alvos que interfiram na polimerização dos microtúbulos (como os sítios  $\alpha,\beta$ - e  $\beta,\alpha$ -tubulínicos),(GULL, 1999) na expressão dos monômeros (RNAm de  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina) (SOARES *et al*, 1989) ou nas alterações pós-traducionais (como a fosforilação da  $\beta$ -tubulina e a acetilação da  $\alpha$ -tubulina) (EIPPER, 1972; L'HERNAULT & ROSEMBAUM, 1983), são interessantes na pesquisa por fármacos antichagásicos. Moléculas que inibem a formação ou alteram a forma dos microtúbulos geralmente causam alterações ultraestruturais ou interrompem o processo

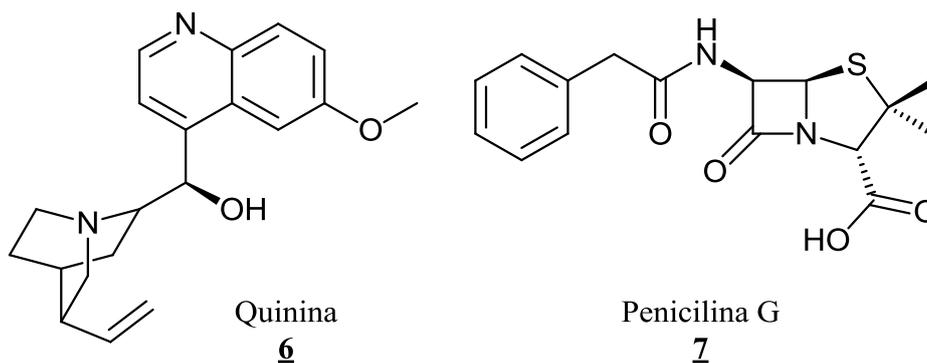
replicativo dos parasitos, causando sua morte. A **Figura 5** mostra a estrutura molecular do taxol (**5**), um reconhecido agente estabilizador de microtúbulos, e seu efeito sobre a estrutura do *T. cruzi*. A presença de parasitos apresentando dois flagelos é indicativo de que o processo de replicação celular fora interrompido (BAUM *et al*, 1981).



**Figura 5.** Microscopia eletrônica mostrando uma forma epimastigota de *T. cruzi* sem tratamento (a), uma forma epimastigota de *T. cruzi* tratado com taxol 10 $\mu$ M por 72h (b) e a estrutura molecular do taxol, **5** (c) (BAUM *et al*, 1981).

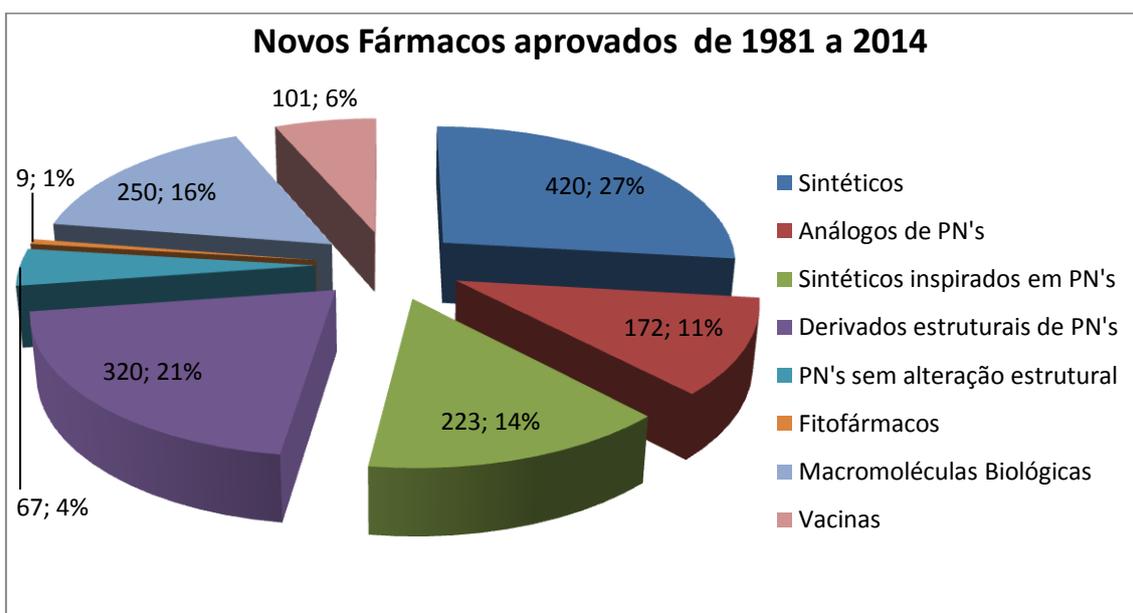
## 1.2. O potencial dos produtos naturais na descoberta de moléculas aplicáveis na modulação de fenômenos biológicos

Historicamente os produtos naturais (PN's) já foram amplamente utilizados como base sintética para novos fármacos, ou até mesmo utilizados diretamente no tratamento de doenças. Como exemplo pode-se citar a quinina (**6**), um antimalárico extraído de *Cinchona officinalis*, e a penicilina G (**7**), obtida de processos fermentativos do *Penicillium chrysogenum* e utilizada como bactericida (**Figura 6**), o que coloca em posição de destaque os produtos de origem natural, principalmente na área de quimioterapia de doenças infecciosas (HOSTETTMANN *et al*, 2003).



**Figura 6.** Estruturas da quinina (**6**) e da penicilina G (**7**).

Um dado que corrobora esse fato provém de que dos 1562 fármacos aprovados no período de 1981 a 2014, cerca de 3/4 são relacionados a pesquisas com produtos naturais, sendo que 25% do total são exclusivamente de produtos naturais utilizados sem alteração estrutural ou a partir de derivação direta de produtos naturais (extraídos de sua fontes, semissintetizados ou 100% sintéticos) , como mostrado na **Figura 7** (NEWMANN & CRAGG, 2016).



**Figura 7.** Participação dos produtos naturais na área de desenvolvimento de fármacos (adaptado de NEWMANN & CGRAGG, 2016).

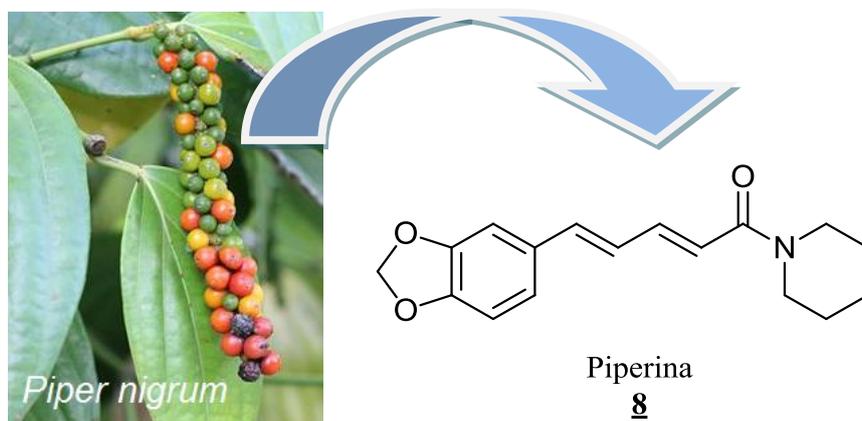
O Brasil, devido à sua grande biodiversidade vegetal (cerca de 55.000 espécies catalogadas), tem um alto potencial para a identificação de produtos naturais com possível utilização econômica como, por exemplo, no uso como matéria-prima na preparação de moléculas com diferentes tipos de aplicação na área biológica (HARVEY, 2000).

Outra vantagem inata da utilização de produtos naturais sobre os sintéticos na obtenção de novos fármacos reside na rica diversidade molecular de arcações estruturais e de grupos farmacofóricos que geralmente desempenham função biológica nos organismos dos quais são extraídos. É importante ainda ressaltar que a identificação de substâncias de origem vegetal não representou apenas o surgimento de um grupo novo de substâncias, mas originou a identificação de uma nova possibilidade de intervenção terapêutica. Exemplos dessa afirmação são a descoberta de anestésicos

locais, bloqueadores musculares, anticolinérgicos, entre outras categorias terapêuticas, a partir do isolamento e estudo da atividade da cocaína, tubocurarina e atropina, respectivamente. A descoberta dessas substâncias naturais bioativas foram determinantes para o atual estágio de evolução da terapêutica (BUTLER *et al*, 2014; HARVEY, 2000).

### 1.3. Piperina: o potencial da amida natural e análogos e sintéticos semissintéticos para a quimioterapia da doença de Chagas

A amida natural piperina (**8**, **Figura 8**) é o principal constituinte químico de *Piper nigrum*, ocorrendo em maior proporção nos frutos da planta. *Piper nigrum* (popularmente conhecida como pimenta-do-reino, **Figura 8**) tem seu uso bastante difundido na medicina popular da Índia, país de onde é originária. No Brasil seu principal uso é como condimento. Apesar de ser considerada aqui uma planta exótica, o Brasil é um dos grandes produtores mundiais de pimenta do reino (SEMLER & GROSS, 1988).

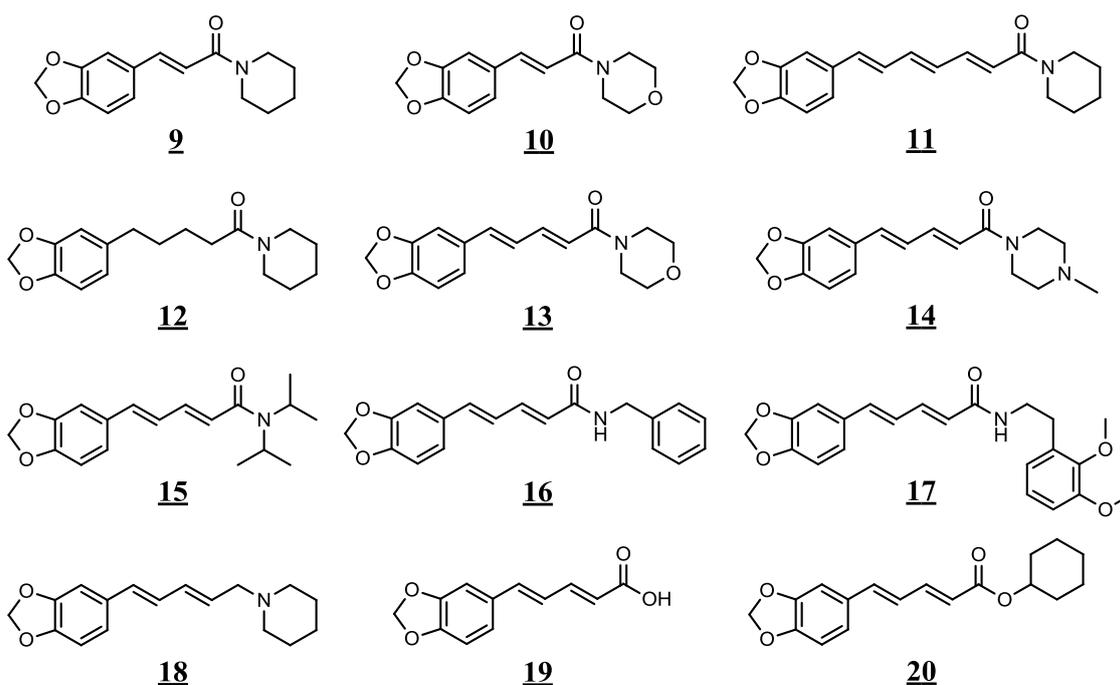


**Figura 8.** Piperina (**8**), principal constituinte dos frutos de *Piper nigrum* (SEMLER & GROSS, 1988).

Outro atrativo em relação à utilização da piperina (**8**) é a sua abundância, uma vez que a mesma é extraída com rendimentos de cerca de 3-7% a partir dos frutos secos da planta (SEMLER & GROSS, 1988). Além disso, devido à maior ocorrência da piperina (**8**) nos frutos, a pimenteira do reino constitui-se como uma fonte renovável para esta substância, visto que com manejo adequado pode-se realizar várias colheitas no ano sem comprometer a planta. É possível encontrar na literatura uma gama variada

de atividades biológicas associadas à piperina (**8**), entre as quais podem ser citadas a atividade inseticida (TAVARES *et al*, 2011) e a antiparasitária, mostrando-se ativa sobre cepas de *Leishmania donovani* (KAPIL, 1993). Posteriormente, resultados promissores foram obtidos dos estudos de atividade de derivados mistos da piperina e aminoácidos contra *Leishmania amazonensis* (SINGH *et al*, 2010). Ainda pode ser citada a atividade inibidora do metabolismo hepático para a piperina (**8**) e derivados (KOUL *et al*, 2000) e de amidas isoladas de *Piper nigrum* contra larvas de mosquitos *Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti* e *A. togoi*, vetores de diversas doenças infecciosas, com resultados extremamente interessantes (PARK *et al*, 2002).

Freire-de-Lima *et al* descreveu a atividade antiparasitária da piperina (**8**) sobre o *T. cruzi* (FREIRE-DE-LIMA *et al*, 2008). Na **Figura 9** são mostradas as estruturas de derivados de modificação estrutural análogos à piperina (**8**) com alteração da comprimento cadeia lateral (**9-11**) e de modificação estrutural direta da piperina, onde foram preparados um derivado de saturação das ligações duplas (**12**), amidas diferentemente substituídas (**13-17**), uma amina (**18**), um ácido (**19**) e um éster (**20**). O produto natural e os derivados obtidos tiveram sua atividade biológica avaliada frente a formas epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, como é mostrado na **Tabela 1** (RIBEIRO *et al*, 2004).



**Figura 9.** Derivados análogos à piperina **8** avaliados frente a *T. cruzi* (RIBEIRO, 2004).

A análise dos resultados permite-nos inferir quanto ao perfil de Relação estrutura-atividade (REA) para a piperina e seus análogos estruturais. Elementos como a extensão da cadeia espaçadora entre o anel aromático e a carbonila amídica e a função amida terciária, com substituintes de caráter lipofílicos, se mostraram importantes para a atividade dos compostos testados (RIBEIRO *et al*, 2004). Este estudo preliminar demonstrou a potencialidade do arcabouço estrutural presente na amida natural e em seus similares sintéticos contra o *T. cruzi*. No entanto, devido à ação de enzimas amidases, a piperina é facilmente hidrolisada no meio biológico, não sendo possível à molécula garantir um perfil farmacocinético adequado. O estudo da literatura revelou que compostos heterocíclicos nitrogenados poderiam conferir maior bioestabilidade ao mesmo tempo que manteriam a atividade antiparasitária (OLESEN *et al*, 2000). Esses compostos são os oxadiazóis (SANTAGADA *et al*, 2004; COTTRELL *et al*, 2004), triazóis (MAVROVA *et al*, 2009, TRON *et al*, 2008; BRIK *et al*, 2005) e tiadiazóis (SILVA *et al*, 2002; CADENA *et al*, 1998).

**Tabela 1.** Tabela de  $CI_{50}$  do benzonidazol da piperina e dos derivados análogos (**8-20**) frente a *T. cruzi* nas formas epimastigota e amastigota (RIBEIRO, 2004).

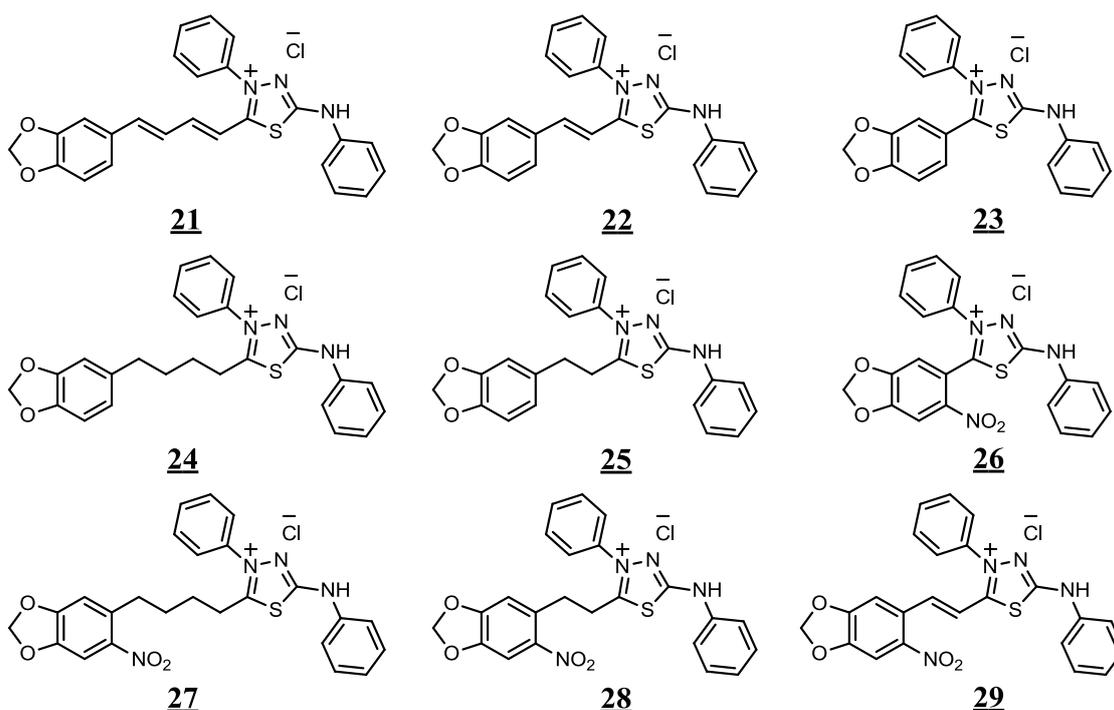
Compostos	$CI_{50}$ ( $\mu M$ )	
	Epimastigota	Amastigota
<u>1</u> <sup>1</sup>	2,20	2,58
<u>8</u>	7,36	4,91
<u>9</u>	>96,52	NT <sup>2</sup>
<u>10</u>	>95,78	NT
<u>11</u>	10,67	7,40
<u>12</u>	19,41	11,52
<u>13</u>	56,13	5,71
<u>14</u>	>83,33	NT
<u>15</u>	14,85	7,77
<u>16</u>	>81,43	NT
<u>17</u>	>65,61	NT
<u>18</u>	17,49	9,63
<u>19</u>	>114,67	NT
<u>20</u>	>83,33	NT

<sup>1</sup>Benzonidazol: Fármaco de referência; <sup>2</sup>Não testados.

De posse destas informações, traçou-se como primeiro objetivo dentro desta linha, a síntese de derivados mesoiônicos do tipo 1,3,4-tiadiazólio-2-amidinas (FERREIRA *et al*, 2008). Os compostos da classe dos mesoiônicos possuem características estruturais interessantes, que os fazem sistemas do tipo betaínico, devido a possuírem regiões com carga positiva e negativa na mesma molécula. Possuem um anel heterocíclico de cinco membros com um sexteto de elétrons, sustentando uma

carga positiva, a qual é contrabalaneada por uma carga negativa formal posicionada sobre um átomo presente na cadeia lateral ligada ao anel). Núcleos mesoiônicos estão presentes na estrutura de uma grande variedade de substâncias que possuem um grande espectro de atividades biológicas descritas, dentre as quais podemos citar: atividade antifúngica, bactericida e antitumoral (KIER & ROCHE, 1967; SHINZATO *et al*, 1989; LÄHTEENMÄKI & VAPAATALO, 1998) Dentre os compostos mesoiônicos, destacam-se os derivados 1,3,4-tiadiazólio-2-amidinas, para os quais Silva e colaboradores evidenciaram suas atividades antiparasitárias sobre *Leishmania amazonensis* (SILVA *et al*, 2002).

Baseados em dados descritos na literatura sobre a atividade de cloridratos da classe das 1,3,4-tiadiazólio-2-aminidas contra *Leishmania amazonensis*, foi realizada a síntese, caracterização e avaliação da atividade tóxica contra o *T. cruzi* de uma nova série de derivados e análogos da piperina (**21-29**) aos quais foram homologados o núcleo mesoiônico, baseados na estratégia de hibridação molecular (VIEGAS-JUNIOR *et al*, 2007). Os novos derivados foram obtidos e avaliados na forma dos respectivos sais (**Figura 10**) e os resultados da avaliação da atividade tóxica frente a diversas formas evolutivas do parasito *T. cruzi* são mostradas na **Tabela 2** (FERREIRA *et al*, 2008).



**Figura 10.** Estruturas dos cloridratos mesoiônicos testados contra *T. cruzi* (FERREIRA *et al*, 2008).

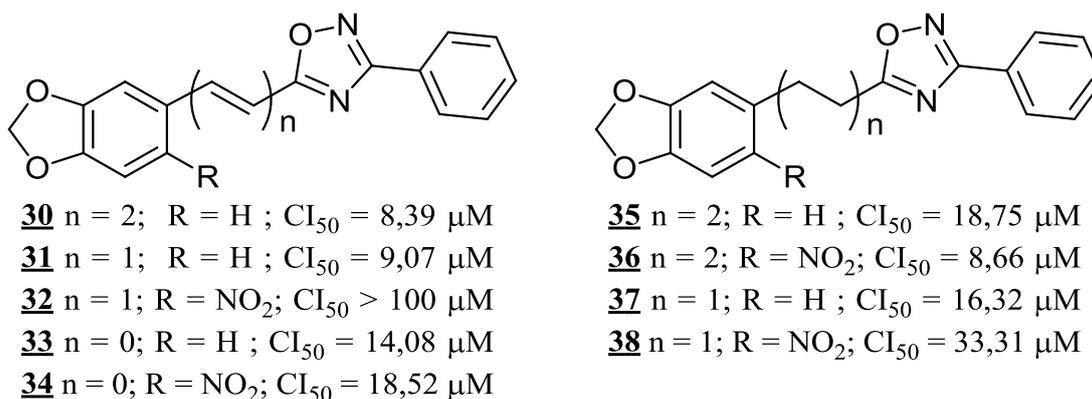
Como pode ser visto na análise dos dados mostrados na **Tabela 2**, o composto **21**, derivado direto do produto natural, foi o que apresentou melhor perfil de atividade (elevada toxicidade frente ao parasito e reduzidos efeitos tóxicos frente à célula do hospedeiro) (FERREIRA *et al*, 2008).

**Tabela 2.** Valores de  $CI_{50}$  ( $\mu M$ ) para piperina (**2**), derivados (**21-29**) e benzonidazol (**1**) frente a diferentes formas do *T. cruzi* (FERREIRA *et al*, 2008).

Compostos	$CI_{50}(\mu M)$			$DL_{50}(\mu M)$
	Epimastigota	Tripomastigota	Amastigota	Citotoxicidade <sup>2</sup>
<b>1</b> <sup>1</sup>	2,20	6,60	2,50	.....
<b>8</b>	7,30	$>[ ]_{max}$ <sup>3</sup>	4,90	20,00
<b>21</b>	10,83	6,70	1,35	38,56
<b>22</b>	4,13	$>[ ]_{max}$	NT <sup>4</sup>	1,95
<b>23</b>	113,06	NT	NT	NT
<b>24</b>	31,50	NT	NT	NT
<b>25</b>	83,42	NT	NT	NT
<b>26</b>	13,42	$>[ ]_{max}$	NT	6,62
<b>27</b>	45,24	NT	NT	NT
<b>28</b>	40,82	NT	NT	NT
<b>29</b>	0,64	$>[ ]_{max}$	NT	1,08

<sup>1</sup>Benzonidazol: Fármaco de referência; <sup>2</sup>Citotoxicidade para macrófagos murinos; <sup>3</sup>Maior que a concentração máxima permitida; <sup>4</sup>Não testados;

Outro núcleo heterocíclico que despertou interesse foi o oxadiazol. Foram encontrados na literatura vários exemplos da utilização do núcleo oxadiazólico como equivalente bioisostérico de amidas e ésteres (LIMA & BARREIRO, 2005; WERMUTH, 1996), o que estimulou a proposta de síntese de novos derivados da classe dos 1,2,4-oxadiazóis. Soares, em sua dissertação de mestrado, preparou 9 novos derivados (**30-38**), cujas estruturas encontram-se na **Figura 11** (SOARES, 2009).

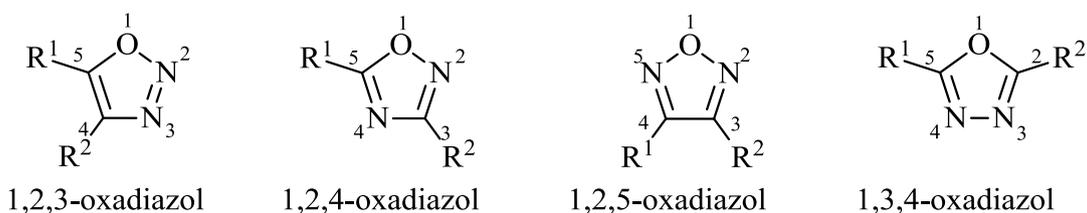


**Figura 11.** Novos derivados oxadiazólicos (**30-38**), derivados e análogos da piperina preparados por Soares (2009).

Dentre os nove derivados descritos por Soares, o oxadiazol **30** (derivado direto da piperina), foi o que apresentou melhor perfil de atividade contra epimastigotas do *T. cruzi* (CI<sub>50</sub>= 8,32µM contra a cepa Dm28c). Este derivado encontra-se em fase de preparação em maior escala para realização de ensaios *in vivo*, dos quais espera-se maior atividade do que o precursor natural, piperina, visto que é predita uma maior estabilidade no meio biológico. A piperina, nos ensaios *in vivo* realizados preliminarmente não apresentou diminuição significativa da parasitemia dos animais infectados, em comparação com o grupo não tratado (resultados não publicados). O derivado cinâmico (**31**) apresentou atividade significativa contra epimastigotas de *T. cruzi* (CI<sub>50</sub>= 9,07µM), o que reforçou a proposta de síntese de outros derivados cinâmicos, modificados ao nível da substituição do anel fenila (SOARES, 2009).

#### 1.4. O núcleo oxadiazólico

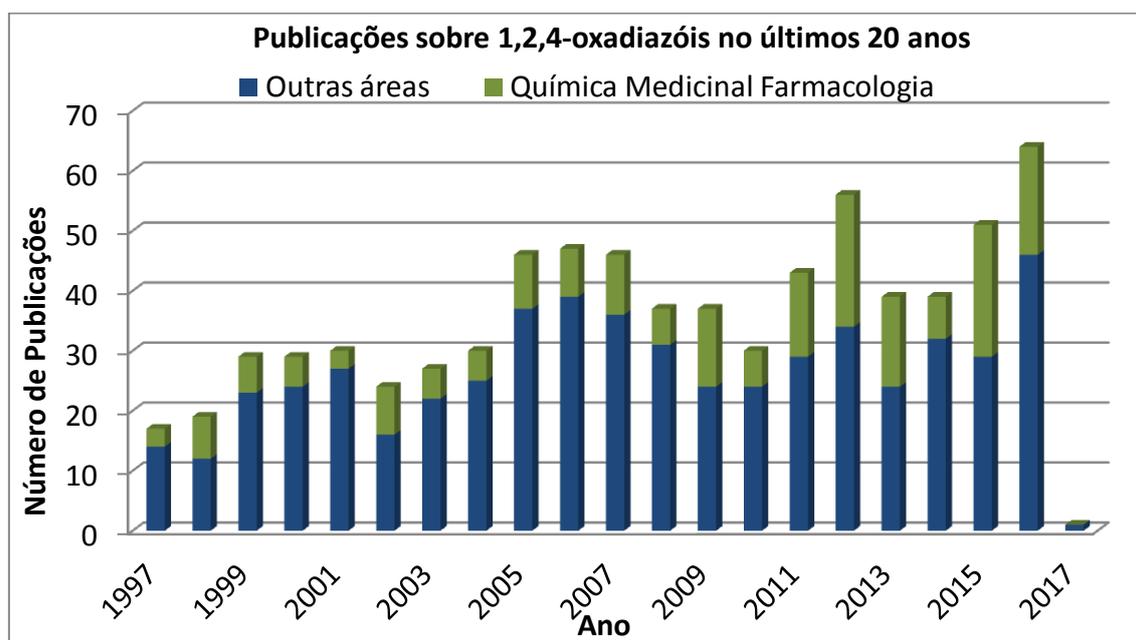
Oxadiazóis são grupos orgânicos heterocíclicos compostos por dois átomos de carbono, dois átomos de nitrogênio e um átomo de oxigênio. Eles foram descobertos em 1884 por Tiemann e Krüger quando então foram denominados furo [ab] diazóis (TIEMANN & KRÜGER, 1884). Anéis oxadiazólicos podem ser comparados isostericamente ao furano, (GUPTA *et al*, 2005), mas a substituição de dois grupos metino (-CH=) por dois nitrogênios piridínicos (-N=) reduz a sua aromaticidade de maneira que são eletronicamente comparáveis a sistemas dieno-conjugadas. A **Figura 12** ilustra as quatro diferentes formas isoméricas que os oxadiazóis podem ser encontrados (CLAPP, 1976).



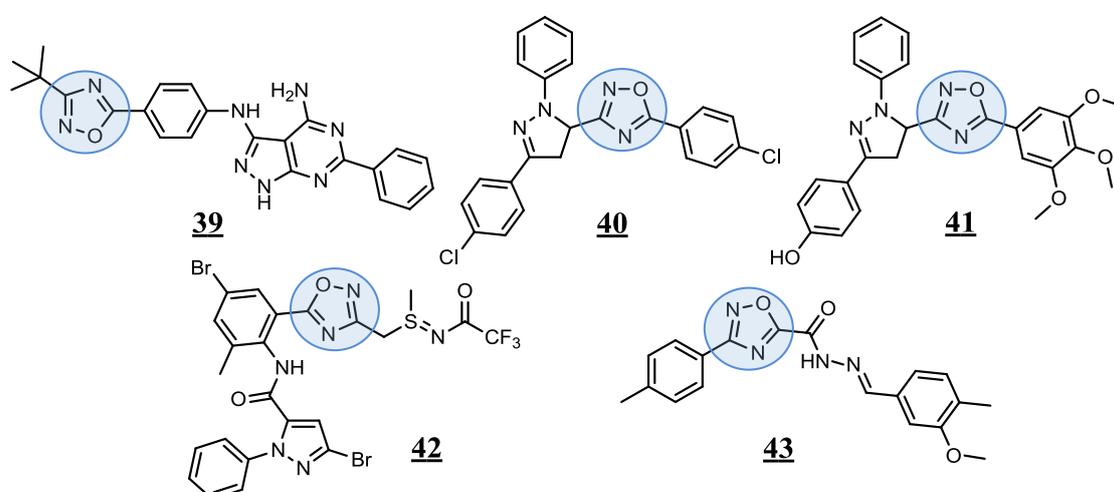
**Figura 12.** Isômeros dos oxadiazóis (CLAPP, 1976).

Um indício da crescente importância de núcleos heterocíclicos, mais especificamente dos 1,2,4-oxadiazóis, na pesquisa por novos químicos de relevância, inclusive do ponto de vista da química medicinal e farmacologia, é o número de artigos

publicados sobre 1,2,4-oxadiazóis nos últimos 20 anos, conforme mostrado na **Figura 13** (WEB OF SCIENCE DATABASE). Dentre as moléculas contendo o núcleo 1,2,4-oxadiazólico com propriedades biológicas interessantes reportadas recentemente podemos citar antitumorais (e.g., **39**) (MAFTEI *et al.*, 2016), antiinflamatórias e antifúngicas (e.g., **40**), antimicrobianas (e.g., **41**) (NINGAIAH *et al.*, 2013), antiparasitárias (**42**) (SANTOS-FILHO *et al.*, 2016) e inseticidas (e.g., **43**) (LIU *et al.*, 2016) (**Figura 14**).



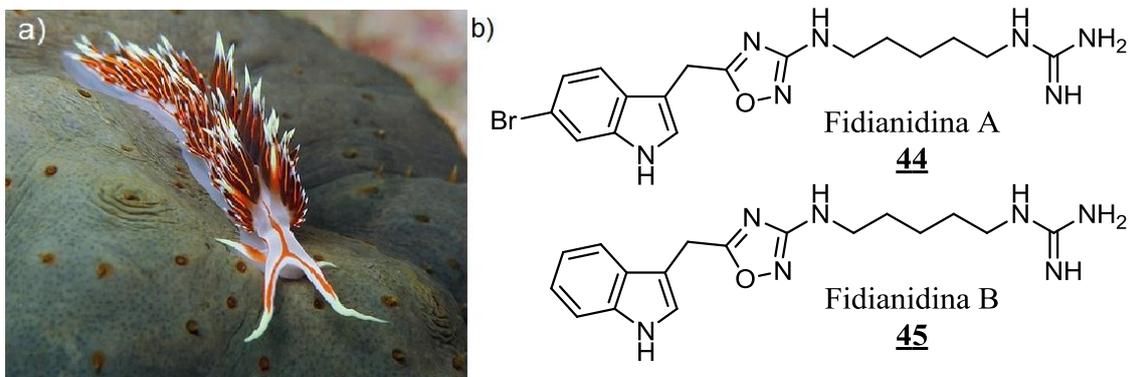
**Figura 13.** Trabalhos publicados desde 1997 até o presente abordando os 1,2,4-oxadiazóis, com destaque para pesquisa nas áreas de química medicinal e farmacologia.



**Figura 14.** Exemplos de moléculas contendo o núcleo 1,2,4-oxadiazólico com atividade biológica: antitumoral, **39**, (MAFTEI *et al.*, 2016), antiinflamatória e antifúngica, **40**, antimicrobiana, **41**, (NINGAIAH *et al.*, 2013), antiparasitária, **42**, (SANTOS-FILHO *et al.*, 2016) e inseticida, **43**, (LIU *et al.*, 2016).

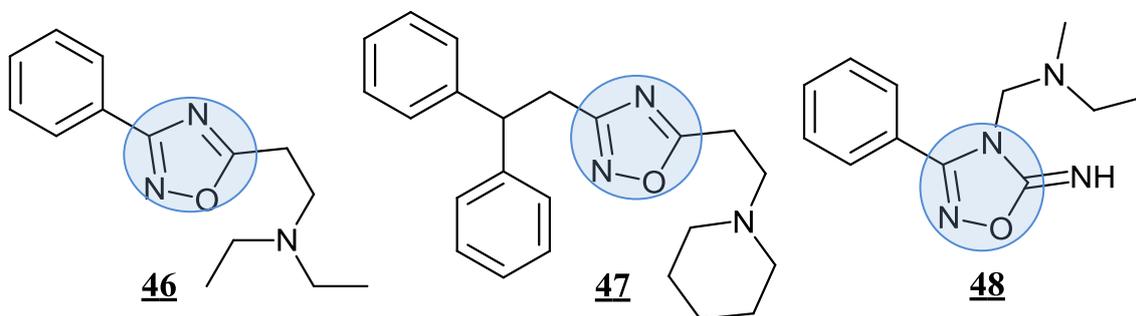
Os núcleos oxadiazólicos apresentam características interessantes do ponto de vista da química medicinal: estabilidade em solução aquosa (sendo estáveis mesmo frente a ácido sulfúrico) (TIEMANN & KRÜGER, 1884) e capacidade de atuar como acceptor de ligação de hidrogênio por meio dos pares de elétrons não ligantes dos heteroátomos (NOBELI *et al.*, 1997). Além disso oxadiazóis funcionam como bioisómeros de grupos funcionais carbonílicos como ésteres, amidas, carbamatos e ésters hidroxâmicos, cuja instabilidade no meio biológico podem ser um empecilho para a sua utilização como grupos farmacofóricos, uma vez que estes grupos podem ser facilmente hidrolisados devido à ação de esterases e amilases presentes no meio biológico (LIMA & BARREIRO, 2005). 1,2,4 e 1,3,4 oxadiazóis apresentam disposição espacial das cadeias laterais similar aos correspondentes carbonílicos, de forma que os análogos heterocíclicos tendem a se ligar de maneira similar em um mesmo sítio ativo (BOSTROM *et al.*, 2006).

Durante muito tempo acreditou-se que o anel oxadiazólico poderia ser obtido apenas por vias sintéticas, no entanto, em 2011, duas moléculas, as fidianidinas A (**44**) e B (**45**), foram isoladas do molusco marinho *Phidiana militaris* (**Figura 15**) (CARBONE *et al.*, 2011), endêmico do sul da Índia (ALDER & HANCOCK, 1864). As fidianidinas naturais apresentaram um potente e seletivo perfil citotóxico frente a linhagens celulares tumorais e não-tumorais (C6, HeLa, Caco-2, 3T3-L1 e H9c2), e exibiram propriedades seletivas de ligação com sítios do sistema nervoso central (SNC), como o receptor  $\mu$ -opióide e o transportador de dopamina, o que representa um ponto de partida interessante para a otimização bioquímica de fármacos em potencial para o tratamento de câncer, doenças do SNC e desenvolvimento de analgésicos (BROGAN *et al.*, 2012).



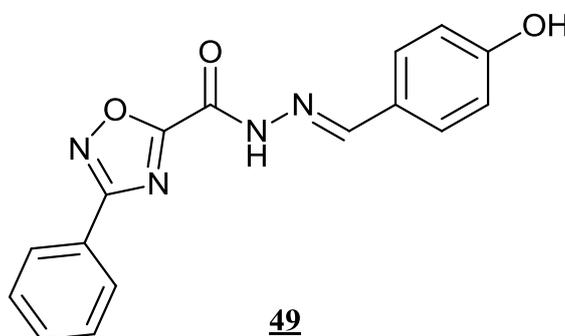
**Figura 15.** a) Molusco marinho *Phidiana militaris*. b) Estrutura molecular das fidianinas A (**44**) e B (**45**), 1,2,4-oxadiazóis de origem natural com interessante perfil biológico (CARBONE *et al.*, 2012; BROGAN *et al.*, 2012).

É possível também encontrar o núcleo 1,2,4-oxadiazólico na estrutura dos princípios ativos de alguns fármacos já disponíveis no mercado, como a Oxolamina (**46**) e a Libexina (**47**), dois antitussígenos, e o Irrigor (**48**), um vasodilatador coronariano e anestésico local (**Figura 16**) (FREITAS *et al*, 2012).



**Figura 16.** Estruturas químicas da Oxolamina (**46**), Libexina (**47**) e do Irrigor (**48**), princípios ativos de fármacos de utilidade clínica reconhecida que contém o núcleo 1,2,4-oxadiazólico (FREITAS *et al*, 2012).

Já no campo de pesquisa se antichagásicos, Santos-Filho descreveu em 2009 a preparação de uma série de acilidrazonas contendo o núcleo 1,2,4-oxadiazólico em sua estrutura. Dentre os 16 diferentes derivados preparados pelos autores, aquele que apresentou melhor perfil de atividade foi o derivado **49**, mostrado na **Figura 17**, que apresentou valores de  $CI_{50}$  de 3,6  $\mu$ M e 14,2  $\mu$ M contra tripó- e epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y), respectivamente (SANTOS-FILHO *et al*, 2009).

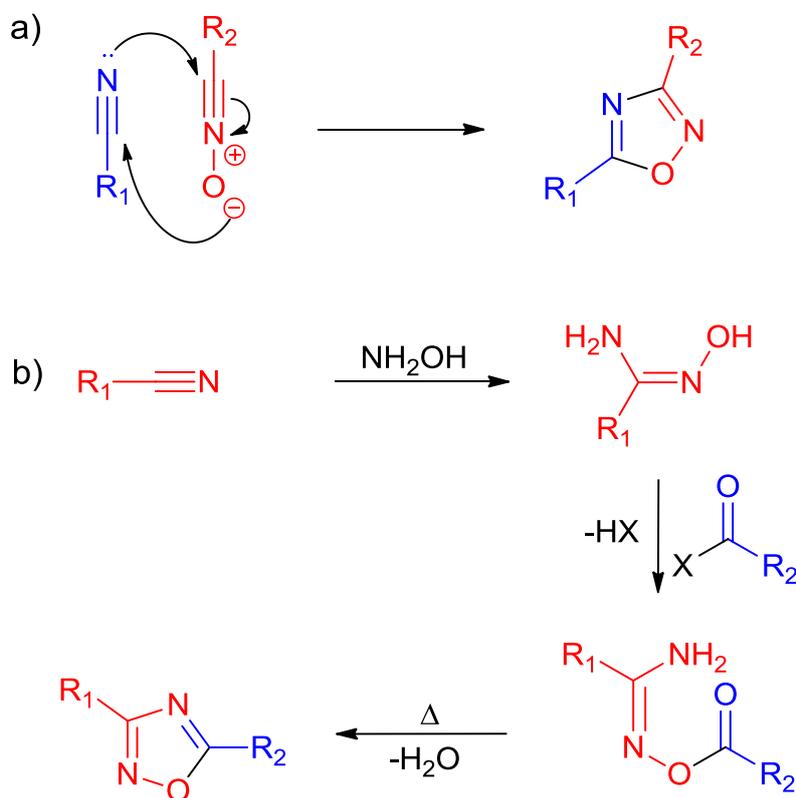


$CI_{50} = 3,6 \mu\text{M}$  (contra tripomastigotas)

**Figura 17.** 1,2,4-oxadiazol-acilidrazônico (**49**) com atividade contra *T. cruzi* (SANTOS-FILHO *et al*, 2009).

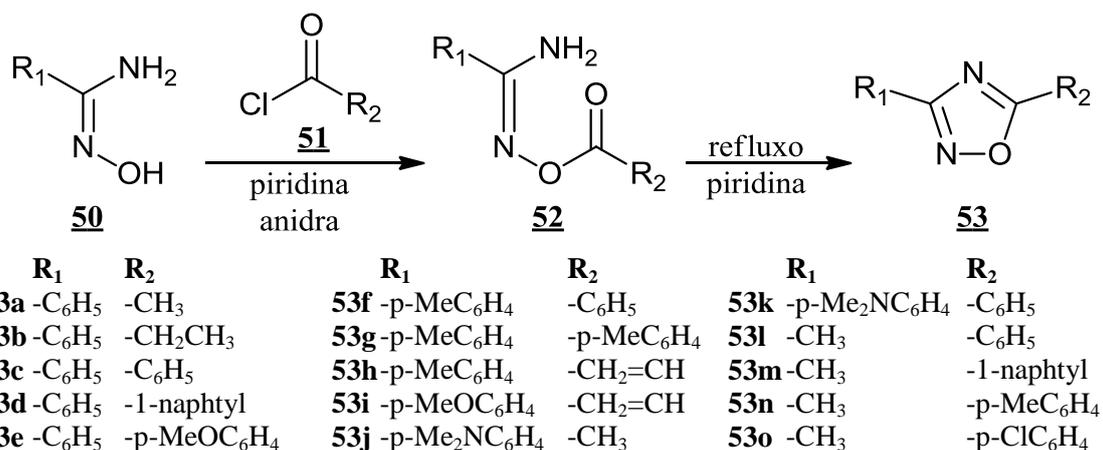
A obtenção sintética do núcleo oxadiazólico se dá principalmente por duas vias sintéticas envolvendo a utilização de carbonitrilas (**Esquema 1**): uma por meio da

cicloadição 1,3-dipolar de um *N*-óxido de nitrila a uma segunda nitrila e a outra por meio da obtenção da formação de uma amidoxima a partir de uma carbonitrila, seguida de *O*-acilação e subsequente ciclização e desidratação (GUPTA *et al*, 2005).



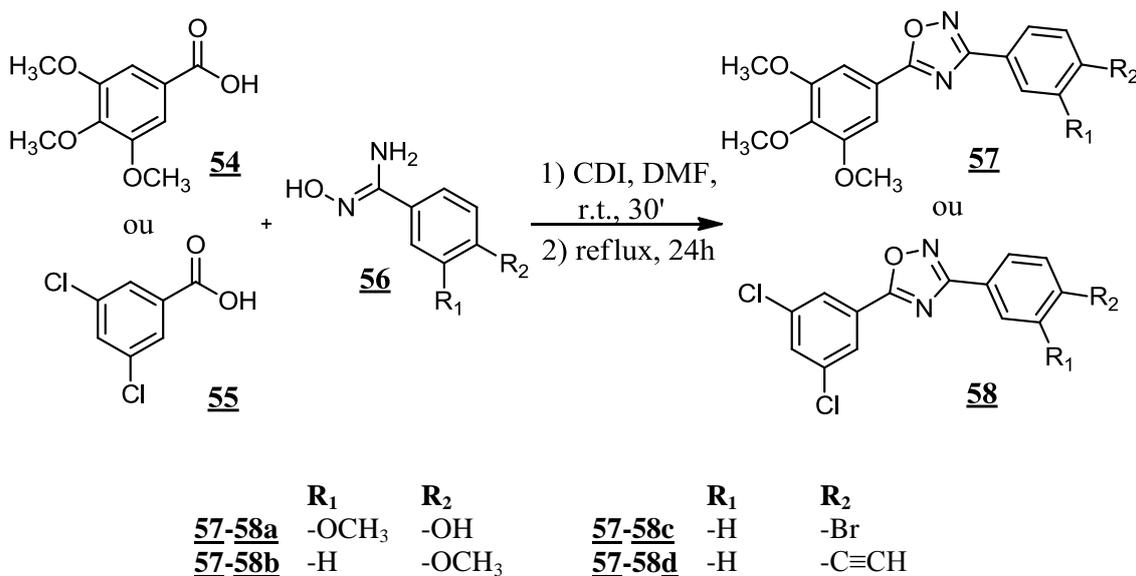
**Esquema 1.** Principais vias sintéticas para a obtenção de 1,2,4-oxadiazóis: a) cicloadição 1,3-dipolar de *N*-óxidos de nitrilas e nitrilas; b) formação de *O*-acilamidoximas seguida de desidratação (GUPTA *et al*, 2005).

A estratégia da cicloadição 1,3-dipolar é menos explorada que a estratégia de formação da *O*-acilamidoxima, sendo relatos da segunda estratégia muito mais comuns na literatura que da primeira (FREITAS *et al*, 2012). Chiou & Shine (1989) descreveram a síntese de 1,2,4-oxadiazóis por meio da *O*-acilação de amidoximas diferentemente substituídas (**50**) utilizando cloretos de ácido (**51**) como agentes acilantes em piridina. A formação da *O*-acilamidoxima (**52**) se dá sob agitação em temperatura ambiente e o fechamento do anel ocorre sob refluxo em piridina por 2-6h, fornecendo o oxadiazol **53**. O esquema reacional é mostrado no **Esquema 2** (CHIOU & SHINE, 1989).



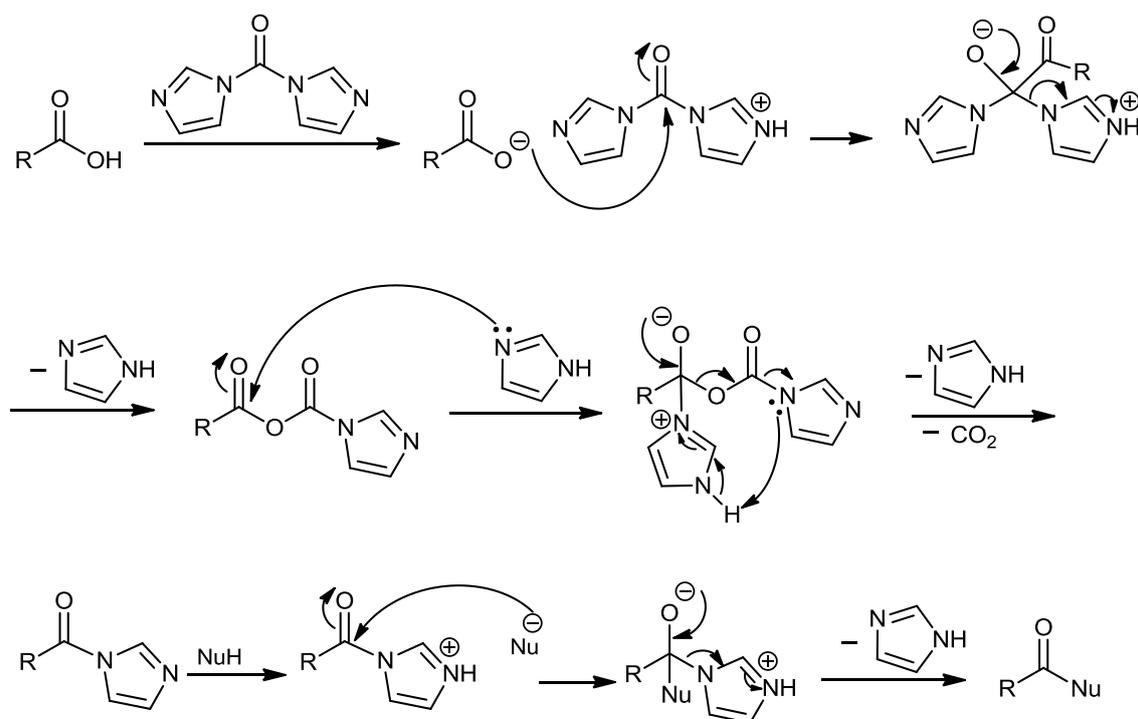
**Esquema 2.** Preparação de 1,2,4-oxadiazóis por Chiou & Shine (CHIOU & SHINE, 1989).

Um trabalho mais recente, publicado por Das e colaboradores, descreveu a síntese de 1,2,4-oxadiazóis (**57** ou **58**) a partir da reação de benzamidoximas diferentemente substituídas (**56**) com ácidos carboxílicos (**54** ou **55**) ou em presença do ativador carbonildiimidazol (CDI) em dimetil formamida (DMF) (**Esquema 3**). Essa abordagem permite a formação a *O*-acilação da amidoxima em temperatura ambiente sem que haja a liberação de HCl no meio reacional. Por outro lado a etapa de ciclização exige cerca de 24h em refluxo para se completar (DAS *et al*, 2012).



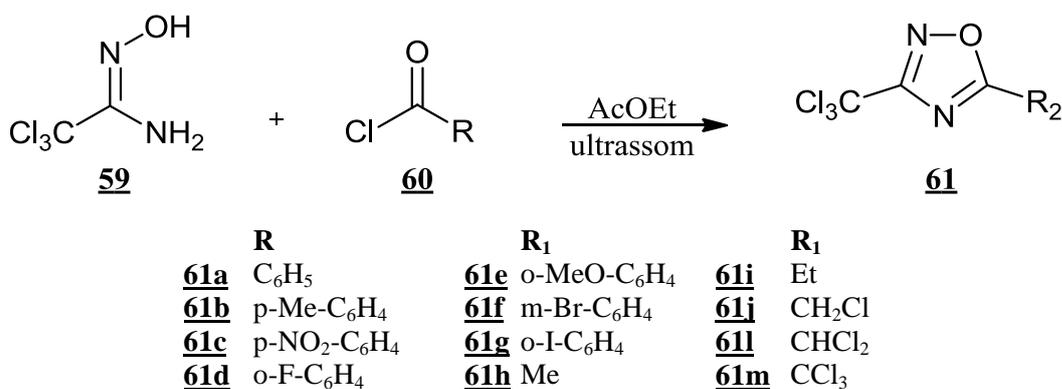
**Esquema 3.** Síntese de 1,2,4-oxadiazóis a partir de benzamidoximas e ácidos benzóicos em presença de CDI (DAS *et al*, 2012).

A reação com ácido carboxílico em presença de CDI ocorre por meio da formação de intermediário *N*-acil-imidazol de forma irreversível, uma vez que há liberação de gás CO<sub>2</sub> proveniente da decomposição do ativador. A carbonila do intermediário é altamente reativa devido ao caráter eletronegativo da ligação entre o carbono carbonílico e o nitrogênio do ciclo imidazólico e devido à estabilidade do grupo abandonador após o ataque do nucleófilo. O **Esquema 4** mostra a proposta mecanística para a reação de acilação em presença de CDI, onde o nucleófilo é representado de maneira genérica como NuH (STAAB & WENDEL, 1973).



**Esquema 4.** Proposta mecanística para reação de acilação de nucleófilo (NuH) em presença de ácido carboxílico e CDI (STAAB & WENDEL, 1973).

Já Bretanha *et al* (2011) apresentaram um procedimento experimental onde se reagiu tricloroacetoamidoxima (**59**) com cloretos de ácido diferentemente substituídos (**60**) em acetato de etila e irradiação de ultrassom (**Esquema 5**). Os resultados publicados (ultrassom,  $t = 15$  min,  $\eta = 84-98\%$ ) foram comparados aos resultados obtidos a partir do experimental convencional (refluxo,  $t = 20$ h,  $\eta = 61-90\%$ ) e o método se mostrou atraente tanto pelo reduzido tempo reacional quanto pelos altos rendimentos encontrados na obtenção dos 1,2,4-oxadiazóis (**61**) (BRETANHA *et al*, 2011).



**Esquema 5.** Metodologia de síntese de 1,2,4-oxadiazóis com irradiação de ultrassom (BRETANHA *et al*, 2011).

A irradiação de em frequência ultrassônica causa a rápida rarefação e compressão do meio reacional, promovendo a formação de bolhas por meio da vaporização dos componentes (rarefação) seguido da implosão dessas bolhas causada pelo repentino aumento de pressão (compressão), num fenômeno denominado cavitação. Esse fenômeno promove tanto um melhor contato entre os reagentes quanto uma excitação das espécies químicas envolvidas, aumentando-se a velocidade da reação (MASON, 1997).

### 1.5. Síntese orgânica assistida por micro-ondas

Desde a sua primeira utilização, em 1986 por Gedye (GEDYE *et al*, 1986) e Giguere (GIGUERE *et al*, 1986), muitos artigos já foram publicados acerca das aplicações da radiação de micro-ondas em reações de síntese orgânica. A utilização desse tipo de tecnologia otimiza os resultados no sentido de reduzir o tempo reacional e aumentar o rendimento e a pureza dos produtos, quando se comparado às técnicas de aquecimento convencionais. Vem sendo amplamente utilizada no campo de sínteses multi-etapas, descoberta e desenvolvimento de novos fármacos em Química Medicinal além de aplicações no campo de síntese polimérica, nanotecnologia, processos bioquímicos entre outros. O sucesso da implementação dessa tecnologia se deve principalmente à drástica redução nos tempos reacionais: reações que levariam horas ou até dias para se concluir utilizando-se de métodos convencionais podem ser realizadas em minutos ou mesmo segundos no aparelho de micro-ondas (LINDSTROM *et al*, 2001).

Antigamente a síntese em micro-ondas era realizada em recipientes selados de teflon ou vidro em aparelhos de micro-ondas domésticos, o que causava muitos

acidentes devido à falta de controle de temperatura e pressão e às hostis condições de solventes orgânicos aquecidos sem qualquer controle em recipientes fechados. Nesse contexto surgiram as reações de micro-ondas em fase sólida (livres de solventes) que praticamente eliminou o risco de explosões. Nesse método os reagentes são adsorvidos em sólidos sensíveis à radiação de micro-ondas (como sílica, alumina ou grafite) (LINDSTROM *et al*, 2001).

Atualmente, os aparelhos de micro-ondas utilizados em síntese são específicos para essa aplicação o que nos trouxe muito mais segurança devido à possibilidade de controle de temperatura, pressão entre outros parâmetros da reação. O uso destes reatores, com condições reacionais controladas, possibilita a reprodutibilidade das reações realizadas, o que era muito difícil anteriormente, quando utilizava-se equipamentos de micro-ondas domésticos (LINDSTROM *et al*, 2001).

A radiação de micro-ondas se localiza no espectro eletromagnético na faixa de 300 MHz ( $\lambda = 10^0$  m) a 300 GHz ( $\lambda = 10^{-3}$  m). Essa faixa inclui frequências utilizadas em telecomunicações, tipicamente de 3 a 30 GHz. Dessa forma, para evitar interferências, a radiação de micro-ondas utilizada em dispositivos comerciais, domésticos e laboratoriais, operam em 2,45 GHz. A irradiação de micro-ondas carrega energia em torno de 0,0016 eV, bem abaixo do necessário para se romper ligações tipicamente encontradas em moléculas orgânicas (cerca de 3,6 a 7,7 eV), mesmo se considerarmos ligações de hidrogênio (0,04 a 0,044 eV) (DE SOUZA & MIRANDA, 2011).

O aquecimento por meio da irradiação de micro-ondas se dá por meio do alinhamento de seu campo elétrico com o dipolo das moléculas, causando uma vibração a nível molecular que se reflete em aquecimento. A capacidade de determinada moléculas em converter energia eletromagnética em calor é medida por meio da equação (1):

$$\tan \delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'} \quad (1)$$

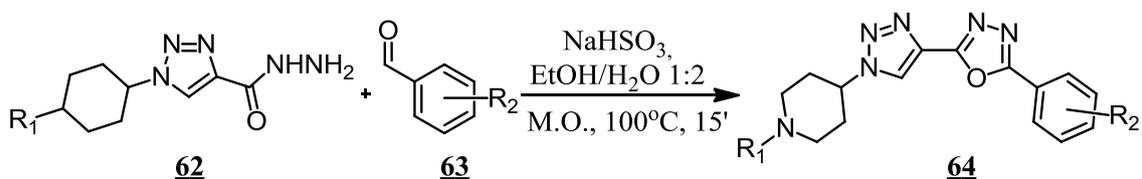
onde, (**tan  $\delta$** ) é o fator de dissipação,  $\epsilon''$  é a perda dielétrica, que mede a eficiência da conversão de calor a partir da radiação eletromagnética e  $\epsilon'$  é a constante dielétrica, que reflete a capacidade da molécula em ser polarizada por um campo elétrico. Na prática, quanto maior o fator de dissipação melhor a interação da molécula com a radiação eletromagnética (CADDICK, 1995). A **Tabela 3** traz os valores das respectivas

constantes dielétricas ( $\epsilon'$ ) e dos fatores de dissipação ( $\tan \delta$ ) para diferentes solventes comumente utilizados em síntese orgânica (LINDSTROM *et al*, 2001).

**Tabela 3.** Constantes dielétricas ( $\epsilon'$ ) e fatores de dissipação ( $\tan \delta$ ) para diferentes solventes utilizados em síntese orgânica (LINDSTROM *et al*, 2001).

Solvente	Constante dielétrica ( $\epsilon'$ )	Fator de dissipação ( $\tan \delta$ )
Hexano	1,9	-
Benzeno	2,3	-
CCl <sub>4</sub>	2,2	-
Clorofórmio	4,8	-
Ácido acético	6,1	0,091
Acetato de Etila	6,2	0,174
THF	7,6	0,059
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	9,1	0,047
Acetona	20,6	0,042
Etanol	24,6	0,054
Metanol	32,7	0,941
Acetonitrila	36,0	0,659
DMF	36,7	0,062
DMSO	47,0	0,161
Ácido Fórmico	58,0	0,722
Água	80,4	0,123

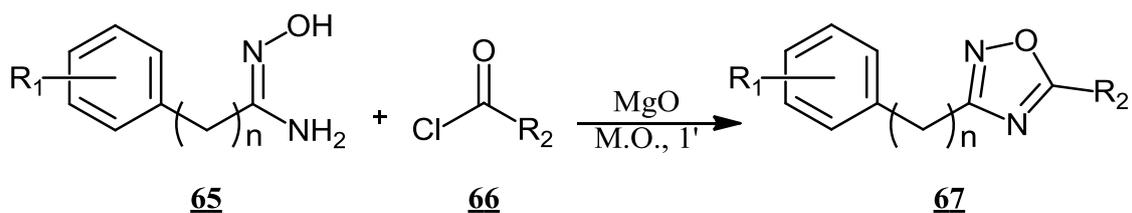
A utilização da irradiação de micro-ondas em Síntese Orgânica, especialmente na química de compostos heterocíclicos, possibilitou o vislumbre de novos panoramas na investigação de moléculas com propriedades bioativas. Isso porque as novas metodologias apresentadas refletem ganhos significativos nos tempos de reação e, em muitos casos, viabilizam a simplificação de procedimentos experimentais, fornecendo produtos com maiores graus de pureza e rendimentos (GARELLA *et al*, 2013). Um exemplo é a síntese de 1,3,4-oxadiazóis a partir de hidrazidas (**62**) e aldeídos (**63**) em presença de bissulfito de sódio como catalizador em EtOH/H<sub>2</sub>O 1:2 (**Esquema 6**). A metodologia convencional, com aquecimento em banho de óleo (100°C) prevê tempos reacionais em torno de 9h. Já a proposta de Sangshetti *et al*, com a reação ocorrendo sob irradiação de micro-ondas, relatou tempos de reação na faixa de 10-15 minutos. As novas moléculas sintetizadas (**64**) apresentaram perfil antifúngico (*Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, and *Cryptococcus neoformans*) (SANGSHETTI *et al*, 2011).



<u>62</u>	<u>63</u>	<u>64</u>
<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>1</sub></b>
<b>64a</b> -Boc	-H	<b>64h</b> -Me
<b>64b</b> -H	-H	<b>64i</b> -Et
<b>64c</b> -Me	-H	<b>64j</b> -CO-Me
<b>64d</b> -Et	-H	<b>64k</b> -SO <sub>2</sub> -Me
<b>64e</b> -SO <sub>2</sub> -Me	-H	<b>64l</b> -Me
<b>64f</b> -CO-Ph	-H	<b>64m</b> -Et
<b>64g</b> -CO-(4-Cl-Ph)	-H	
		<b>R<sub>2</sub></b>
		<b>64n</b> -SO <sub>2</sub> -Me
		<b>64o</b> -Me
		<b>64p</b> -Et
		<b>64q</b> -SO <sub>2</sub> -Me
		<b>64r</b> -CO-Me
		<b>64s</b> -CO-Ph
		<b>64t</b> -OH
		<b>64u</b> -OMe
		<b>64v</b> -OMe
		<b>64w</b> -NO <sub>2</sub>
		<b>64x</b> -Me
		<b>64y</b> -Me

**Esquema 6.** Metodologia para síntese de 1,3,4-oxadiazóis proposta por Sangshetti *et al* (2008).

Já Kaboudin & Navaee (2003) descreveram a síntese de 1,2,4-oxadiazóis em ausência de solvente (suporte sólido em MgO) e irradiação de micro-ondas (**Esquema 7**). A partir de amidoximas (**65**) e cloretos de acila (**66**) diferentemente substituídos, a reação se deu por 1 minuto fornecendo os produtos (**67**) com rendimentos entre 67-86% (KABOUDIN & NAVAE, 2003).

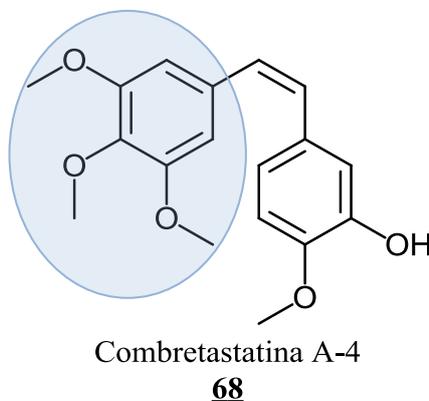


<u>65</u>	<u>66</u>	<u>67</u>
<b>n</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<b>67a</b>	0 Ph	Me
<b>67b</b>	0 <i>m</i> -Cl-Ph	Me
<b>67c</b>	0 <i>p</i> -Cl-Ph	Me
<b>67d</b>	0 2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	Me
<b>67e</b>	1 <i>p</i> -Cl-Ph	Ph
<b>n</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<b>67f</b>	1 Ph	Ph
<b>67g</b>	0 Ph	Ph
<b>67h</b>	0 Ph	<i>p</i> -NO <sub>2</sub> -Ph
<b>67i</b>	1 <i>p</i> -Cl-Ph	<i>p</i> -NO <sub>2</sub> -Ph
<b>67j</b>	0 <i>m</i> -Cl-Ph	<i>p</i> -NO <sub>2</sub> -Ph

**Esquema 7.** Esquema reacional proposto por Kaboudin & Navaee para a síntese de 1,2,4-oxadiazóis em suporte sólido e irradiação de micro-ondas (KABOUDIN & NAVAE, 2003).

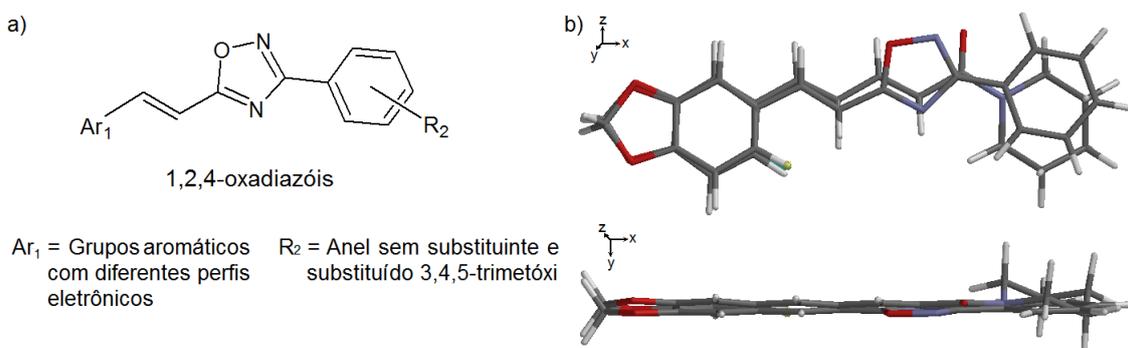
## 2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Os resultados obtidos pelo grupo na síntese de heterociclos, derivados e análogos da amida natural piperina, nos levaram a propor uma nova série de análogos 1,2,4-oxadiazólicos, visando comparar seu efeito tripanocida com o do produto **31**, preparado por Soares (2009). Sabe-se que alguns núcleos heterocíclicos, como os oxadiazóis, são bioisómeros de amidas (LIMA & BARREIRO, 2005), corroborando-se a ideia de se definir incluir tal grupo no planejamento da série de moléculas proposta nesse trabalho. Há na literatura indícios de que a piperina atua sobre o *T. cruzi* alterando mecanismos citocinéticos influenciando aspectos ultraestruturais e de multiplicação celular dos parasitos (FREIRE-DE-LIMA *et al*, 2008). Dessa forma, idealizou-se incluir o grupo farmacofórico 3,4,5-trimetóxi-fenila, presente na combretastatina A-4 (**68**, **Figura 18**), molécula de reconhecida atividade antimitótica (NAM, 2003), como uma estratégia de hibridização molecular (VIEGAS-JUNIOR *et al*, 2007).



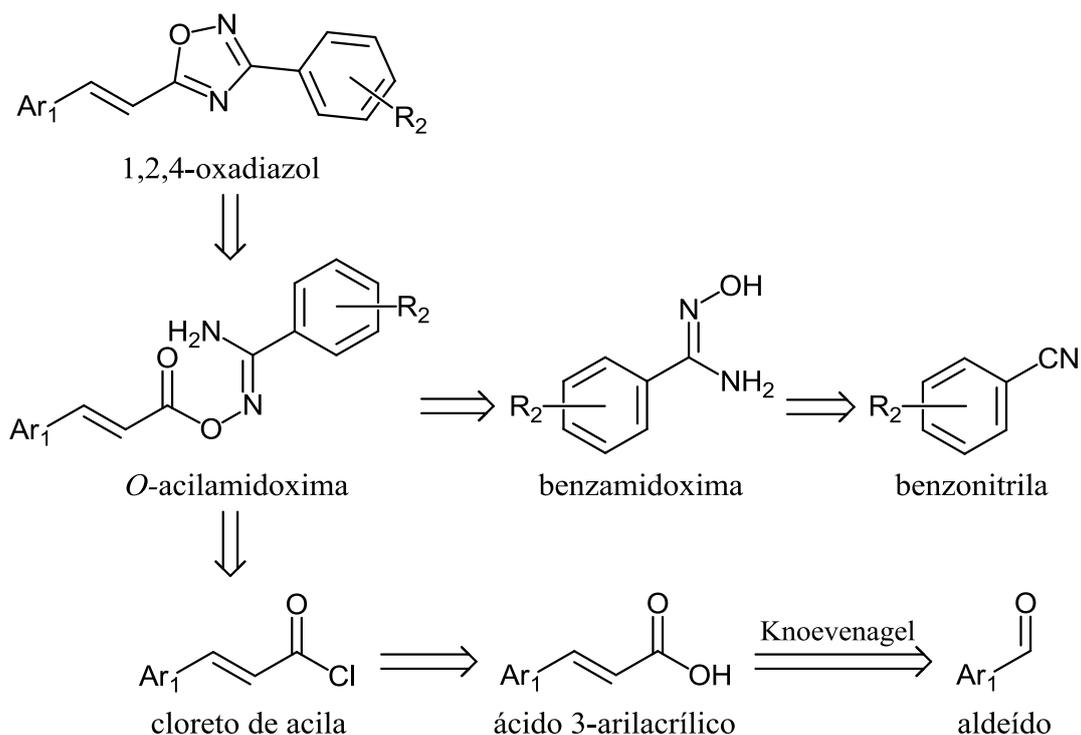
**Figura 18.** Estrutura da combretastatina A-4 (**68**) com destaque para o grupo farmacofórico 3,4,5-trimetóxi-fenila, importante em mecanismos antimitóticos (NAM, 2003).

Com base nos argumentos apresentados, foi planejada uma série de moléculas com arcabouço estrutural semelhante ao da piperina, contendo o núcleo 1,2,4-oxadiazólico, semelhantes ao composto **31**, e incluindo-se o grupo 3,4,5-trimetóxi-fenila. A **Figura 19** traz a estrutura geral dos oxadiazóis que serão apresentados neste trabalho (**a**) e a comparação entre as estruturas moleculares sobrepostas do composto **31** e da piperina **8** (**b**). Observa-se que a redução do número de carbonos espaçadores entre os anéis preserva o comprimento das novas moléculas em relação à piperina, visando obter uma melhor correspondência bioisostérica.



**Figura 19.** a) Estrutura geral dos 1,2,4-oxadiazóis planejados para este trabalho; b) comparação entre as estruturas da piperina **8** e do composto **31**.

O **Esquema 8** apresenta a análise retrossintética para a preparação dos compostos 1,2,4-oxadiazólicos, os quais podem ser obtidos a partir do intermediário acílico, por meio de uma reação de ciclização. Por sua vez, o intermediário vem da reação dos cloretos de acila, obtidos a partir dos ácidos 3-arylacrílicos correspondentes, com as respectivas benzamidoximas, previamente sintetizada a partir de benzonitrilas (CHIOU & SHINE, 1989). Os ácidos 3-arylacrílicos, quando não disponíveis comercialmente, podem ser preparados a partir dos benzaldeídos adequadamente substituídos, por meio da condensação de Knoevenagel (TIETZE & EICHER, 1989). Tanto os benzaldeídos quanto as benzonitrilas utilizados foram obtidos comercialmente.



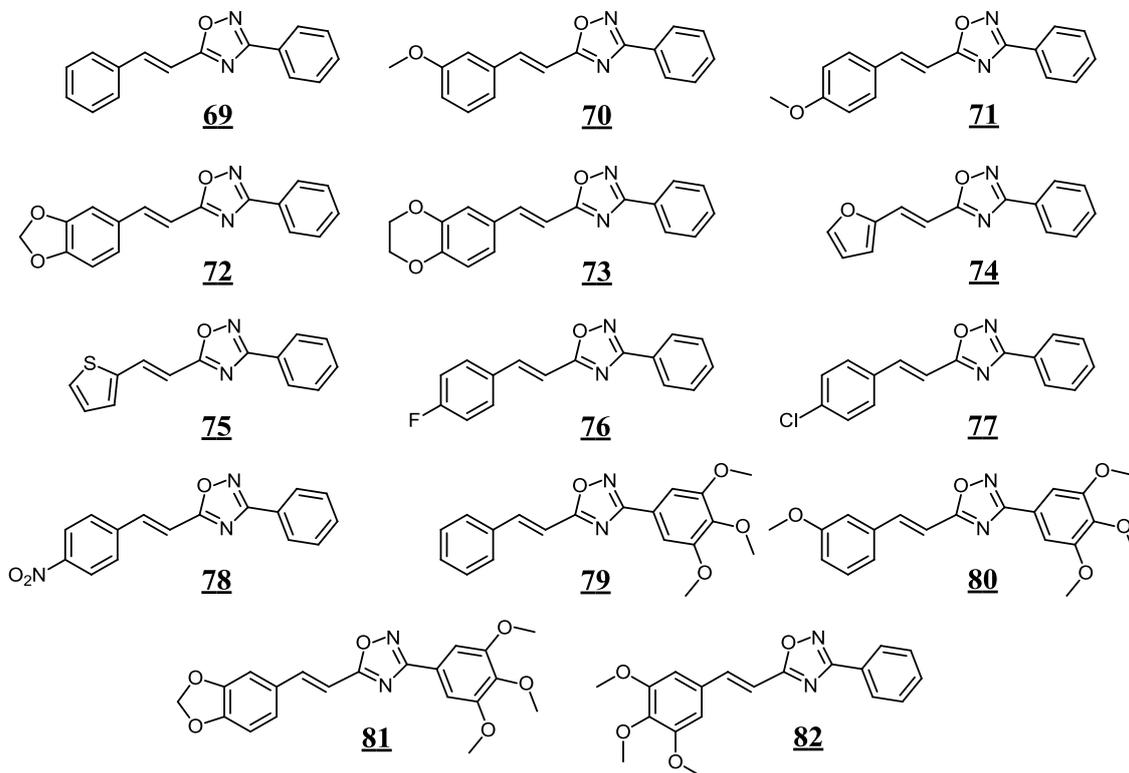
**Esquema 8.** Análise retrossintética para a preparação dos 1,2,4-oxadiazóis planejados.

Neste trabalho, a irradiação de micro-ondas foi utilizado principalmente com o intuito de se reduzir o tempo reacional e diminuir a quantidade de rejeitos, uma vez que o procedimento experimental anteriormente adotado em nosso grupo para a formação do núcleo 1,2,4-oxadiazólico previa reação sob refluxo por 6-7h em piridina, um solvente tóxico e de custo elevado (adaptado de CHIOU & SHINE, 1989). A utilização do reator de micro-ondas permite que a reação seja realizada na ausência de solventes (suporte sólido), o que minimiza a quantidade de rejeitos, uma vez que o conteúdo reacional já se encontra na forma de pastilha para a etapa de purificação subsequente à reação, ao mesmo tempo que elimina a necessidade de se utilizar piridina no procedimento sintético. Outro atrativo à utilização do reator de micro-ondas é a drástica redução no tempo reacional, conferindo maior agilidade ao procedimento sintético e consequentemente, um menor gasto energético. Esta abordagem atualmente é bastante atraente, pois se baseia nos princípios da “Química Verde” (MACHADO, 2011). Em nosso trabalho realizamos reações na ordem de 1 a 2 mmol, devido principalmente às limitações do tamanho do espaço de irradiação no reator. No entanto, apesar da possibilidade do uso do micro-ondas em escalas maiores, alguns autores acreditam que esta utilização levaria a um aumento muito grande no consumo energético, o que não compensaria o ganho em tempo (MOSELEY, 2011). O reator de micro-ondas (CEM Discover System) utilizado no presente trabalho é mostrado na **Figura 20**.



**Figura 20.** Aparelho de micro-ondas CEM Discover System, utilizado nas sínteses descritas neste trabalho.

Seguindo-se a metodologia apresentada, os 1,2,4-oxadiazóis **69-82** foram planejados, sintetizados e caracterizados a fim de se avaliar sua atividade biológica frente a diferentes formas evolutivas do *T. cruzi* (**Figura 21**).

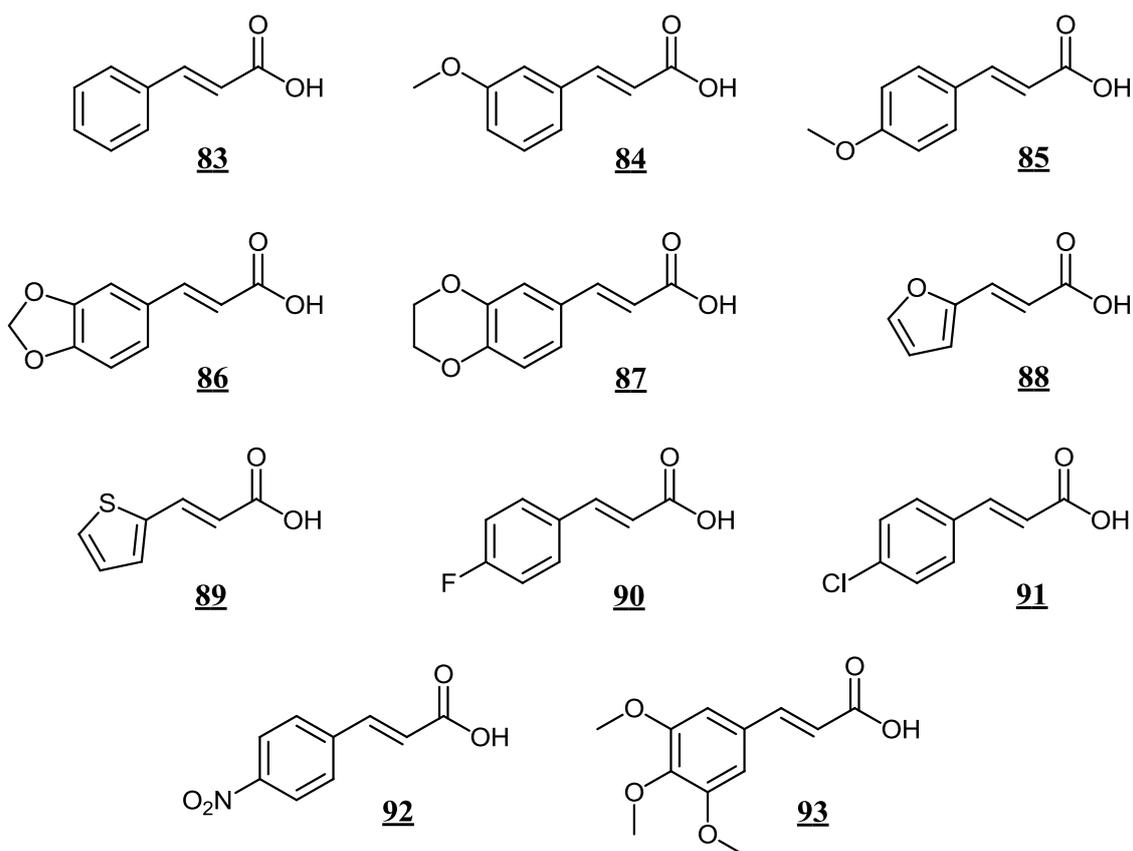


**Figura 21.** Estrutura dos 1,2,4-oxadiazóis preparados neste trabalho.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Obtenção dos ácidos 3-arylacrílicos diferentemente substituídos**

A rota sintética traçada para este trabalho envolve a utilização de ácidos 3-arylacrílicos diferentemente substituídos como precursores (**Figura 22**). Parte destes precursores já estavam disponíveis no laboratório ao início deste trabalho, tendo sido em parte, obtidos comercialmente pela Sigma-Aldrich® (**83**, **85**, **92** e **93**) ou preparados por Soares (**87**, **88** e **89**) e descritos em sua dissertação de mestrado (SOARES, 2009).

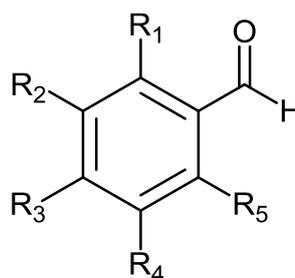


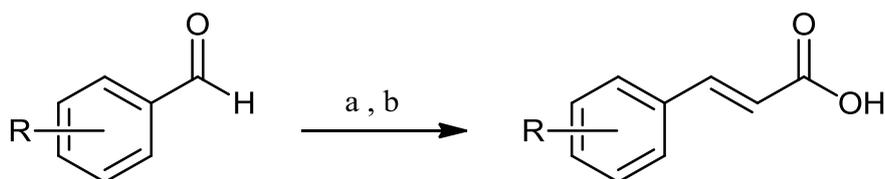
**Figura 22.** Ácidos 3-arylacrílicos utilizados para a síntese dos 1,2,4-oxadiazóis.

Os precursores **84**, **86**, **90** e **91** foram sintetizados conforme a reação de Knoevenagel, a partir dos respectivos aldeídos adequadamente substituídos (**84a**, **86a**, **90a**, e **91a**), relacionados na **Tabela 4**, ácido malônico, catalisada por piperidina e utilizando-se piridina como solvente (**Esquema 9**) (TIETZE & EICHER, 1989).

**Tabela 4.** Aldeídos diferentemente substituídos (**84a**, **86a**, **90a** e **91a**) utilizados na preparação dos respectivos ácidos 3-arylacrílicos (**84**, **86**, **90** e **91**).

	Aldeídos
<b>84a</b>	$R_1=R_3=R_4=R_5=H$ ; $R_2= -OCH_3$
<b>86a</b>	$R_1=R_4=R_5=H$ ; $R_2,R_3= -OCH_2O-$
<b>90a</b>	$R_1=R_2=R_4=R_5=H$ ; $R_3= F$
<b>91a</b>	$R_1=R_2=R_4=R_5=H$ ; $R_3= Cl$

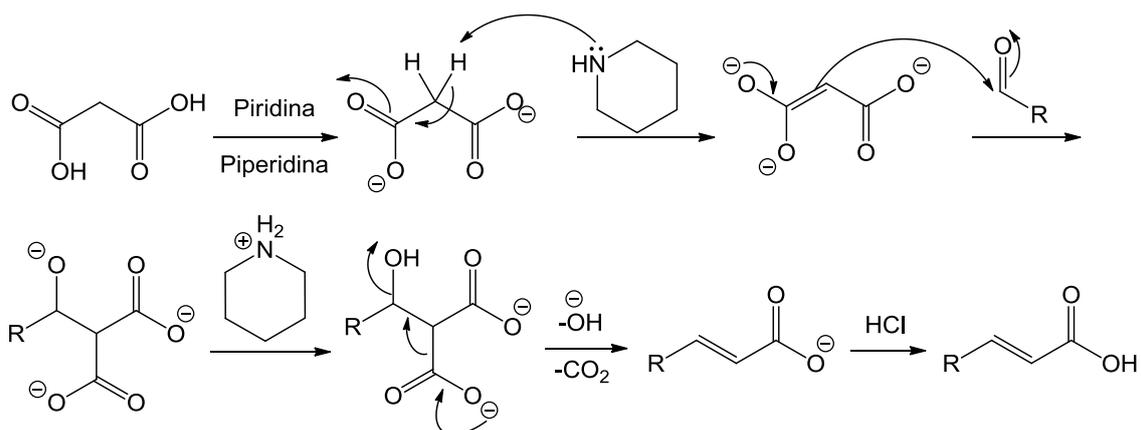




a) Ácido malônico, piridina e piperidina, refluxo, 4h; b) HCl<sub>(aq)</sub> 10% v/v

**Esquema 9.** Reação de formação dos ácidos 3-arylacrílicos **84**, **86**, **90**, e **91**.

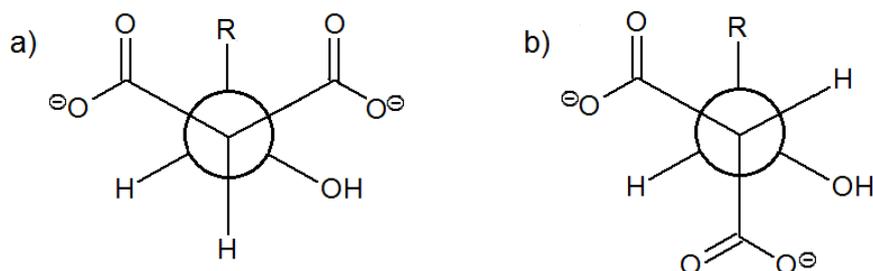
Devido ao caráter básico do meio, o ácido malônico é desprotonado e o malonato resultante, em presença de piperidina, é enolizado de modo a formar um diânion que, devido à ligação de hidrogênio intramolecular e à deslocalização das cargas negativas por meio da extensão de conjugação, é relativamente estável. A reação de Knoevenagel se dá por meio do ataque da nuvem  $\pi$  da dupla ligação do diânion ao centro eletrofílico do aldeído (carbono carbonílico). O intermediário dicarboxílico que se forma sofre uma eliminação descarboxilativa que, por restrições estereoeletrônicas, gera estereosseletivamente o alceno com configuração *E*, como mostra o mecanismo descrito no **Esquema 10** (CLAYDEN *et al*, 2000).



**Esquema 10.** Mecanismo geral de formação dos ácidos 3-arylacrílicos por meio da reação de Knoevenagel (CLAYDEN *et al*, 2000).

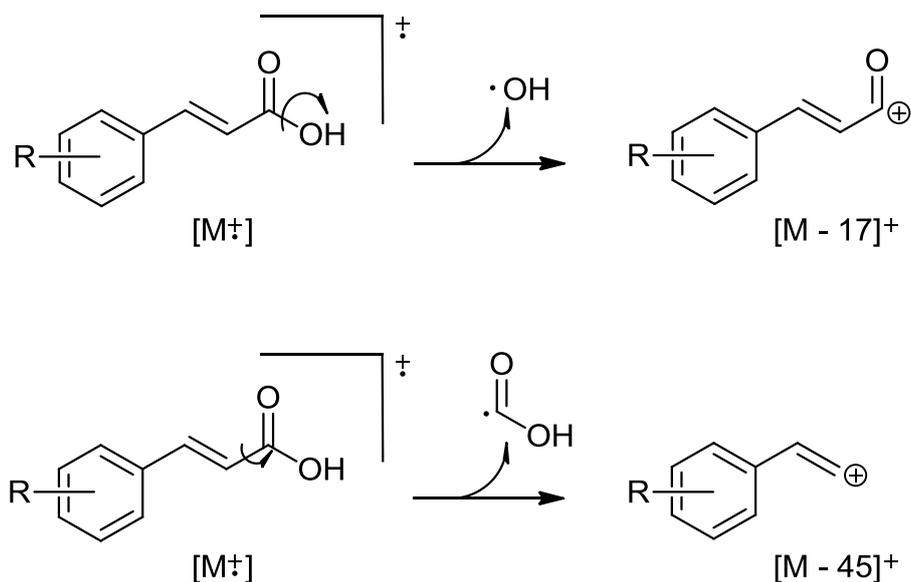
A estereosseletividade nesse caso emerge da maior estabilidade do estado de transição que leva à conformação *E* em comparação estado de transição que levaria à conformação *Z*. A **Figura 23** mostra, em projeção de Newman, os confôrmeros do intermediário dicarboxílico que levam a formação de ligação dupla com conformação *Z* (**a**) e com conformação *E* (**b**). Nota-se que para a formação da dupla com conformação *Z* os dois grupos carboxila se orientam *gauche* em relação ao grupo R, o que resulta em

instabilidade conformacional devido à repulsão estérica. Já para a formação da dupla com conformação *E* um dos grupos carboxila se orienta *anti* em relação ao grupo R, minimizando a repulsão estérica (CLAYDEN *et al*, 2000; TIETZE & EICHER, 1989).



**Figura 23.** Projeções de Newman para os confôrmeros do intermediário dicarboxílico que originam produto com geometria *Z* (a) e com geometria *E* (b).

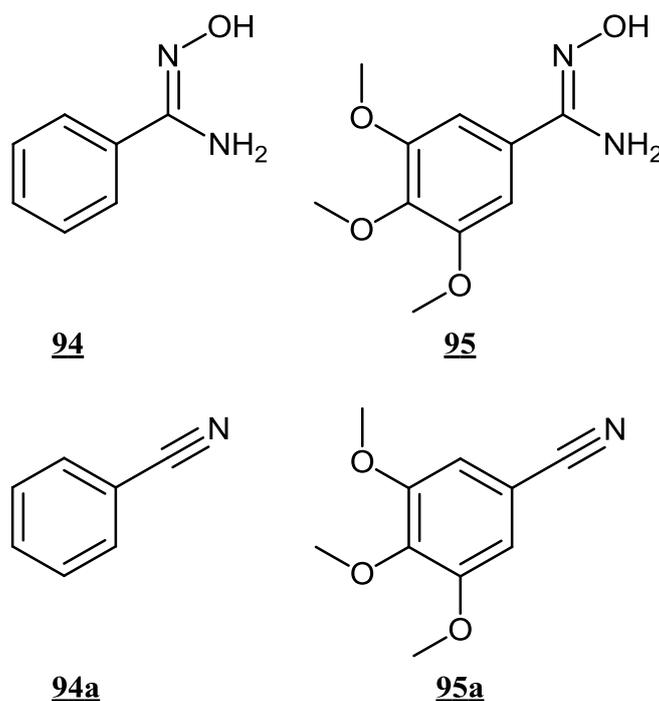
O acompanhamento da reação se deu por meio de análise por cromatografia em camada fina, com sílica como fase estacionária e hexano/acetato de etila 30% como eluente. Evidenciou o caráter mais polar dos produtos em relação aos respectivos aldeídos de partida. Esse fato se explica pela melhor interação das hidroxilas ácidas com a sílica, realizando ligações de hidrogênio de maneira mais eficiente que os respectivos aldeídos. Ao fim das etapas descritas para a sua síntese, os ácidos 3-arilacrílicos foram obtidos sob a forma de cristais amorfos que foram caracterizados por espectrometria de massas (EM) (IE, 70eV) e por comparação dos pontos de fusão experimentais com dados da literatura. As propostas de fragmentação para EM da família de ácidos 3-arilacrílicos são apresentadas de forma genérica na **Esquema 11**, onde M<sup>+</sup> representa os respectivos íons moleculares.



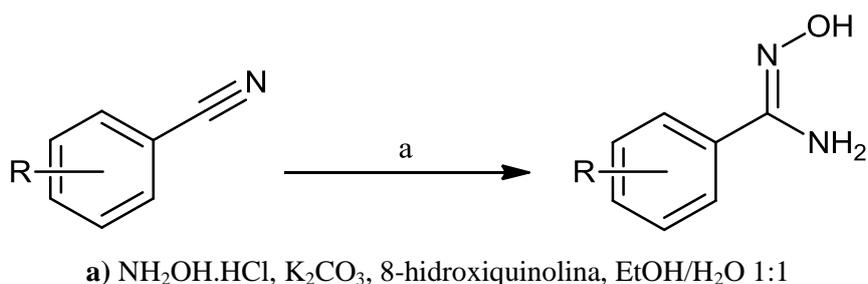
**Esquema 11.** Propostas de fragmentação para os ácidos 3-arylacrílicos.

### 3.2. Síntese das benzamidoximas

A síntese das benzamidoximas **94** e **95** ocorreu a partir da reação das respectivas benzonitrilas **94a** e **95a** (**Figura 24**), obtidas comercialmente (Sigma-Aldrich), com cloridrato de hidroxilamina e carbonato de potássio e utilizando-se 8-hidroxiquinolina como catalisador, como é mostrado no **Esquema 12** (SRIVASTAVA *et al*, 1997).

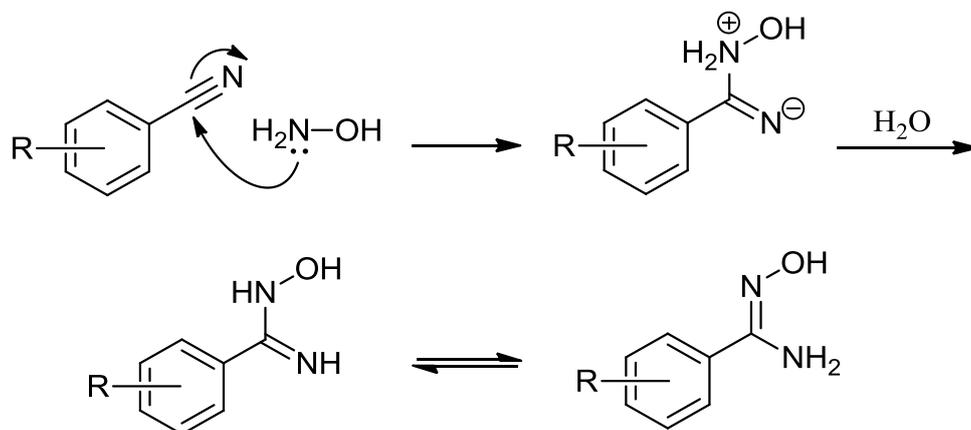


**Figura 24.** Estrutura das benzamidoximas utilizadas (**94** e **95**) neste trabalho, e das respectivas benzonitrilas (**94a** e **95a**) utilizadas em sua preparação.



**Esquema 12.** Reação de síntese das benzamidoximas utilizadas neste trabalho (SRIVASTAVA *et al*, 1997).

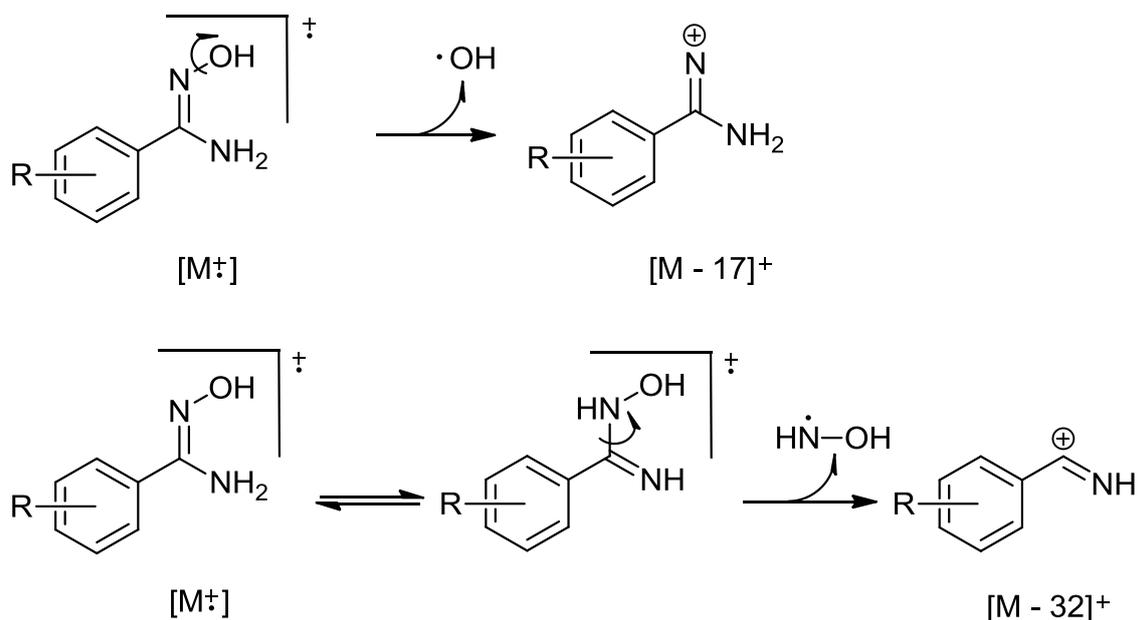
A proposta mecanística para a síntese das benzamidoximas envolve o ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio da hidroxilamina ao carbono nitrílico. Após o rearranjo dos prótons intermediado pelo solvente prótico, obtém-se as respectivas benzamidoximas, em equilíbrio tautomérico (**Esquema 13**) (SRIVASTAVA *et al*, 1997).



**Esquema 13.** Proposta mecanística para a reação de formação das benzamidoximas (SRIVASTAVA *et al*, 1997).

O acompanhamento da reação se deu por meio de análise por cromatografia em camada fina, com sílica como fase estacionária e hexano/acetato de etila 50% como eluente, em que se evidenciou o caráter mais polar dos produtos em relação às respectivas nitrilas de partida. Esse fato se explica pela melhor interação dos componentes  $-\text{OH}$  e  $-\text{NH}_2$  do grupo amidoxima com a sílica, realizando ligações de hidrogênio de maneira mais eficiente que as respectivas nitrilas. Ao fim do

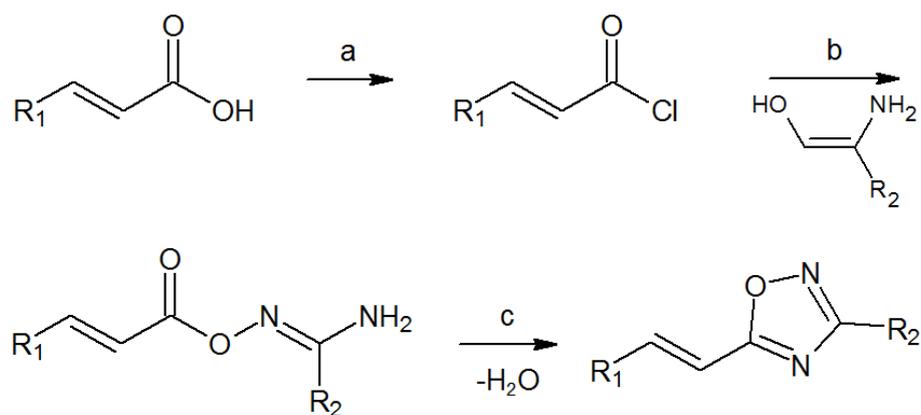
procedimento reacional, as benzaminoximas foram obtidas sob a forma de cristais amorfos marrom-esverdeados que foram caracterizados por EM (IE, 70eV) e por comparação dos pontos de fusão experimentais com dados da literatura (somente para o composto **94**, uma vez que não foi encontrado relato de valor de ponto de fusão experimental para o composto **95**). As propostas de fragmentação para EM para as benzaminoximas são apresentadas de forma genérica na **Esquema 14**, onde  $M^+$  representa os respectivos íons moleculares.



**Esquema 14.** Propostas de fragmentação para as benzaminoximas.

### 3.3. Estratégia adotada para a síntese de 1,2,4-oxadiazóis

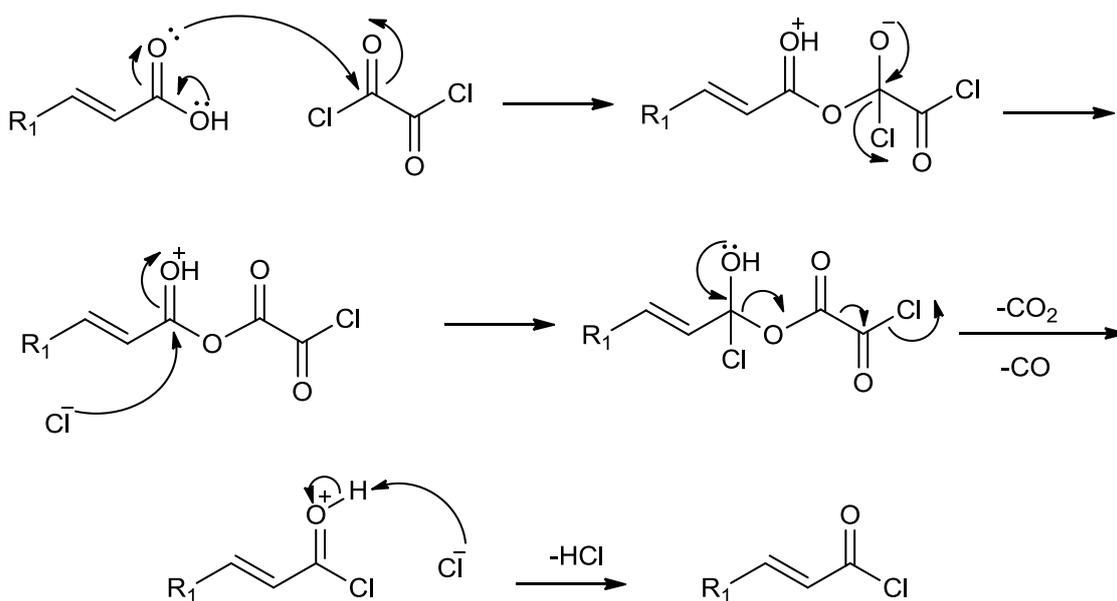
A nossa estratégia de síntese para os 1,2,4-oxadiazóis envolve uma sequência de 3 reações *one-pot*: ativação da carbonila dos ácidos 3-arylacrílicos por meio da formação do cloreto de acila correspondente, *O*-acilação da benzaminoxima adequada e reação térmica de fechamento do ciclo 1,2,4-oxadiazólico (**Esquema 15**).



a) (COCl)<sub>2</sub>, agitação, T<sub>ambiente</sub>, 15-60 min.; b) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, anidro, agitação, T<sub>ambiente</sub>, 15-90 min.; c) sem solvente, SiOH, T = 100-103°C, MW, 5-60 min.

**Esquema 15.** Metodologia sintética *one-pot* para obtenção dos ácidos 3-arylacrílicos e das respectivas benzamidoximas (adaptado de CHIOU & SHINE, 1989).

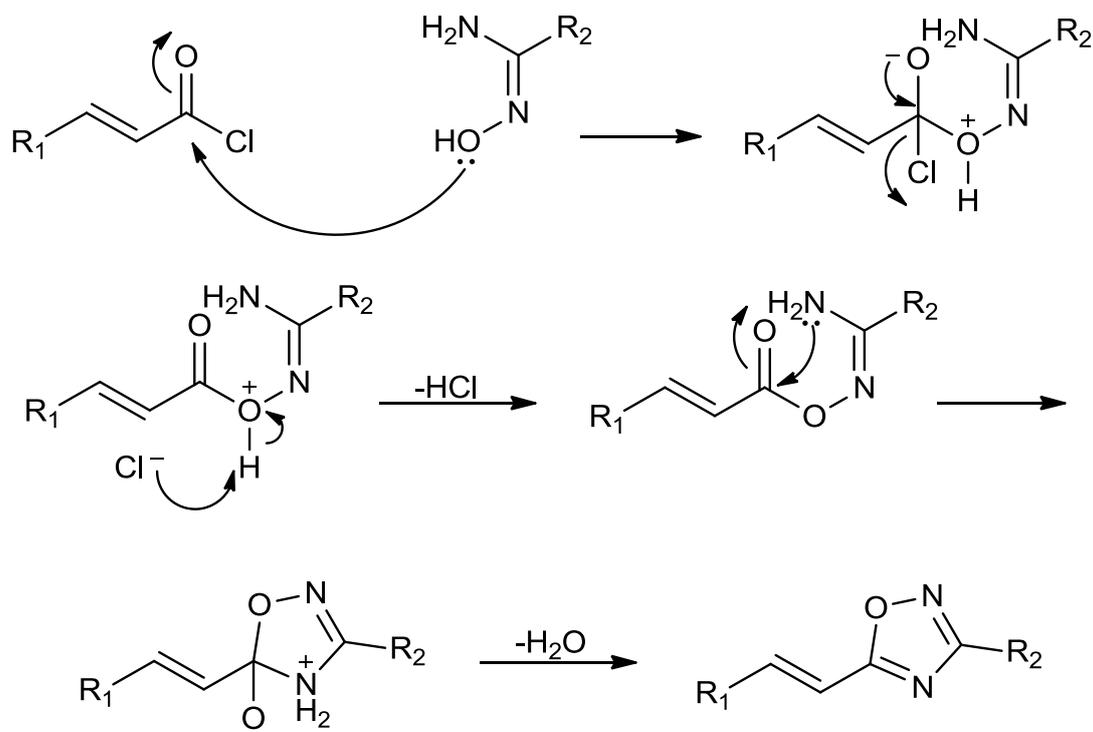
Cloretos de ácido são intermediários altamente reativos devido ao forte efeito retirador do cloro ligado à carbonila. O carbono dessa carbonila é um centro eletrofílico sensível a reagentes nucleofílicos, agindo como um ácido de Lewis. Estes intermediários podem ser preparados por meio de diferentes metodologias (ANSELL, 1972). Em nosso trabalho, os cloretos de ácido necessários à síntese dos oxadiazóis, foram obtidos por meio da reação dos respectivos ácidos 3-arylacrílicos com cloreto de oxalila (COCl)<sub>2</sub>, conforme mostrado previamente no **Esquema 15**. Devido à sua instabilidade os cloretos de ácidos são de difícil isolamento e caracterização. Dessa forma os cloretos de acila formados foram trabalhados em atmosfera inerte (N<sub>2</sub> seco) e utilizados sem tratamento na etapa sintética subsequente. A confirmação de sua formação foi feita indiretamente por meio da adição de uma alíquota do meio reacional em metanol. O cloreto de acila em contato com metanol reage instantaneamente formando um éster metílico, que pode ser observado por cromatografia em camada fina (CCF), uma vez que o éster apresenta caráter mais apolar que o ácido cinâmico de partida. O mecanismo proposto para a formação dos cloretos de ácidos é mostrado no **Esquema 16** (SOLOMONS & FRIHLE, 2009).



**Esquema 16.** Mecanismo geral para a reação de formação de cloreto de acila (SOLOMONS & FRIHLE, 2009).

Os oxadiazóis foram obtidos a partir da *O*-acilação da benzamidoxima adequada com o respectivo cloreto de ácido. Um par de elétrons não ligantes do oxigênio da benzamidoxima ataca a carbonila do cloreto de acila originando um intermediário acíclico, que pôde ser verificado por CCF demonstrando caráter de polaridade intermediário ao do ácido cinâmico e da benzamidoxima.

Após completa a adição da benzamidoxima ao cloreto de acila, sílica-gel (240 Mesh) é adicionada ao meio reacional removendo-se, em seguida, todo o solvente com auxílio de evaporador rotatório, de forma que o intermediário *O*-acil-benzamidoxima fique suportado na superfície da sílica. A etapa de ciclização e formação do núcleo oxadiazólico se deu em fase sólida, sob irradiação de micro-ondas. No **Esquema 17** é apresentada a proposta mecanística para a *O*-acilação da benzamidoxima e subsequente fechamento do ciclo 1,2,4-oxadiazólico (adaptado de CHIOU & SHINE, 1989).



**Esquema 17.** Proposta mecanística para a reação de formação dos oxadiazóis (adaptado de CHIOU & SHINE, 1989).

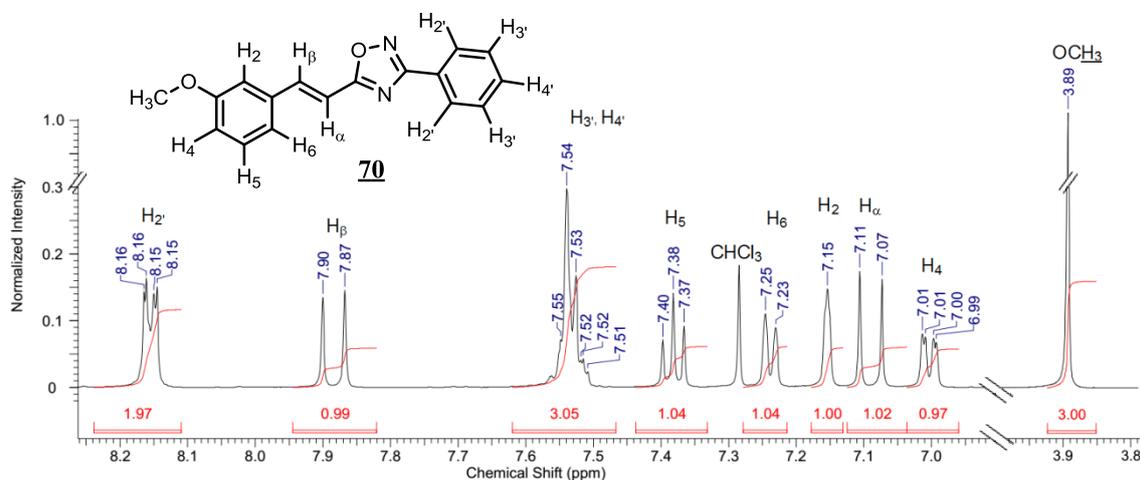
Nosso planejamento envolveu a preparação de 14 diferentes derivados, variando-se a natureza eletrônica dos substituintes no anel aromático (sem substituinte, com grupo doador de elétron e grupo retirador de elétron) a fim de avaliarmos a influência deste parâmetro na atividade biológica das novas moléculas preparadas.

### 3.4. Caracterização dos produtos

Os novos 1,2,4-oxadiazóis **69-82** foram caracterizados por ressonância nuclear de hidrogênio e carbono (RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C), espectrometria no infravermelho (IV) e espectrometria de massas de baixa resolução (EMBR) e de alta resolução (EMAR).

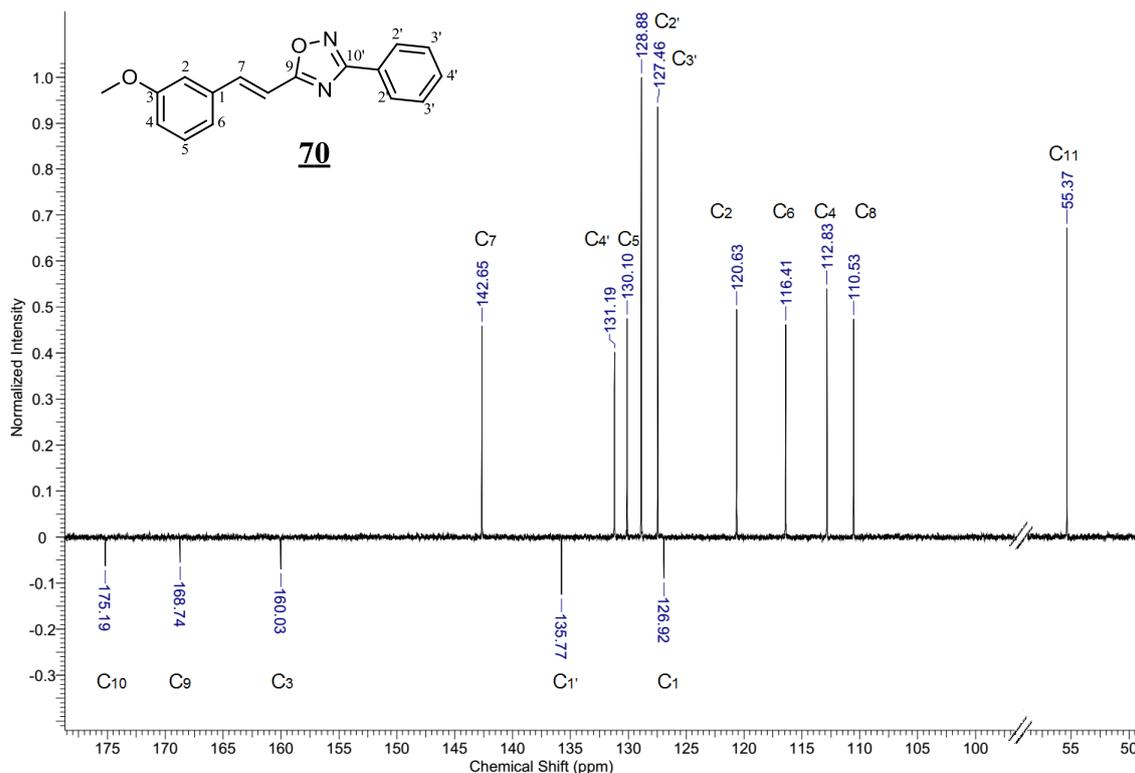
Nos espectros de RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz) os sinais característicos da série de moléculas são observados em torno de  $\delta = 7,1$  ppm (d,  $J = 15$ Hz, 1H), referente ao hidrogênio ligado ao carbono  $\alpha$  ao núcleo oxadiazólico, e em torno de  $\delta = 7,9$  ppm (d,  $J = 15$ Hz, 1H), referente ao hidrogênio ligado ao carbono  $\beta$  ao núcleo oxadiazólico. A constante de acoplamento na faixa de 16Hz é característica entre átomos de hidrogênio olefínicos ligados à dupla ligação C=C com conformação *E*. Além dos sinais característicos foram confirmados os sinais dos demais átomos de hidrogênio dentro das faixas de absorção, multiplicidades de sinais e constantes de acoplamento esperadas,

conforme exemplificado no detalhe do espectro de RMN<sup>1</sup>H referente ao composto **70** (**Figura 25**). Observa-se em todos os espectros de RMN<sup>1</sup>H um singlete fino em  $\delta = 7,28$  ppm referente ao resíduo de CHCl<sub>3</sub> presente no solvente deuterado (CDCl<sub>3</sub>). Em alguns espectros ainda foi observado singlete fino em em torno de  $\delta = 1,6$  ppm referente à presença de água no CDCl<sub>3</sub>.



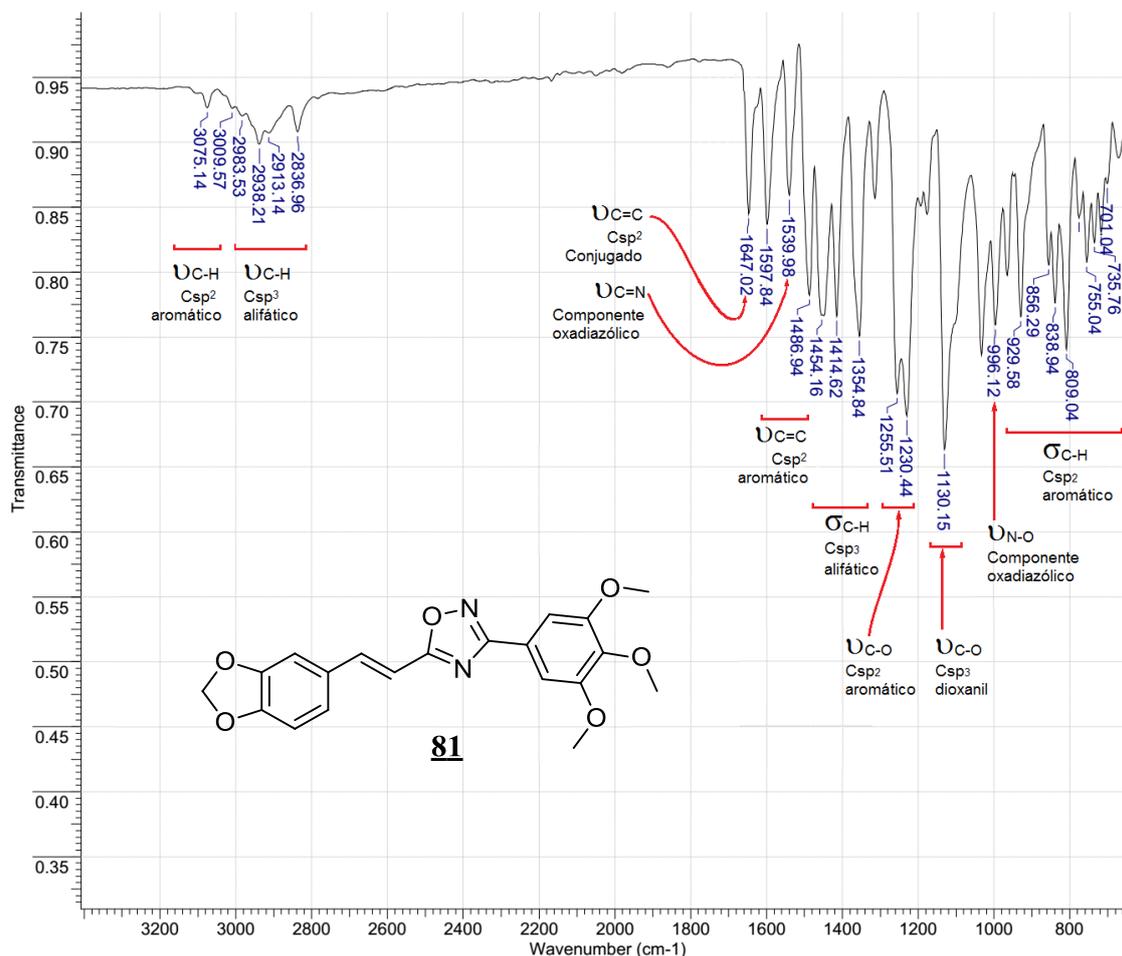
**Figura 25.** Detalhe do espectro de RMN<sup>1</sup>H (500MHz) para o oxadiazol **70**.

Nos espectros de RMN<sup>13</sup>C (DEPT-Q, 500MHz), dentre os sinais característicos da classe de moléculas sintetizadas, podemos citar os sinais na faixa de  $\delta = 175$  ppm e  $\delta = 168$  ppm, referentes aos carbonos não hidrogenados do heterociclo 1,2,4-oxadiazólico, respectivamente ligados a dois átomos de nitrogênio sp<sup>2</sup> e a um átomo de oxigênio e um átomo de nitrogênio. Devido ao seu maior tempo de relaxação, a intensidade dos sinais de RMN<sup>13</sup>C para carbonos não hidrogenados é naturalmente menor que a intensidade dos sinais referentes a carbonos hidrogenados. Todos os núcleos de <sup>13</sup>C esperados para cada composto foram identificados com valores de absorção dentro das faixas previstas, conforme exemplificado no detalhe do espectro de RMN<sup>13</sup>C referente ao composto **70** (**Figura 26**). Observa-se em todos os espectros de RMN<sup>13</sup>C um tripleto em  $\delta = 74$  ppm referente ao solvente deuterado (CDCl<sub>3</sub>).



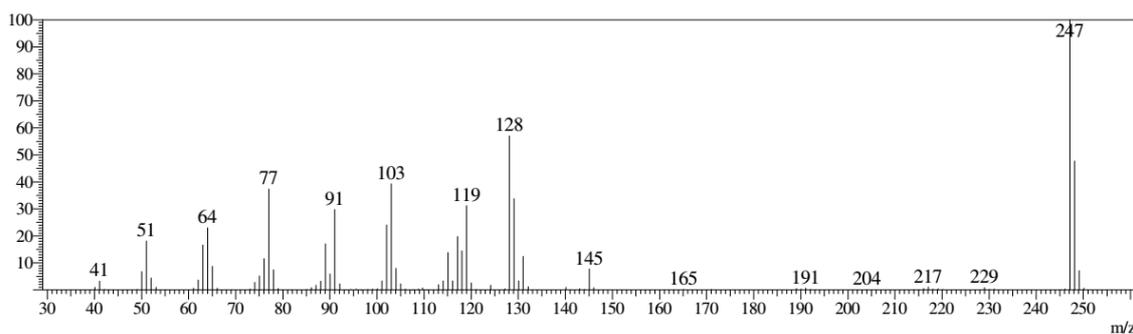
**Figura 26.** Detalhe do espectro de RMN<sup>13</sup>C (DETP-Q, 500MHz) para o oxadiazol **70**.

Nos espectros de infravermelho são observadas absorções de média a forte intensidade nas faixas de  $\nu_{N-O} = 960-1000 \text{ cm}^{-1}$  e  $\nu_{N=C} = 1539-1560 \text{ cm}^{-1}$ , correspondentes à deformação axial das ligações N-O e N=C, respectivamente, constituintes do anel oxadiazólico. Outro sinal característico da família de compostos sintetizada é a deformação axial da ligação C=C oriunda dos ácidos arilacrílicos conjugada entre um anel aromático e o núcleo oxadiazólico na faixa de  $\nu_{C=C} = 1640-1650 \text{ cm}^{-1}$ . Os demais sinais característicos para os respectivos derivados foram identificados, confirmando suas estruturas químicas, conforme exemplificando na **Figura28** que apresenta o espectro de IV para o oxadiazol **81** com as respectivas atribuições.

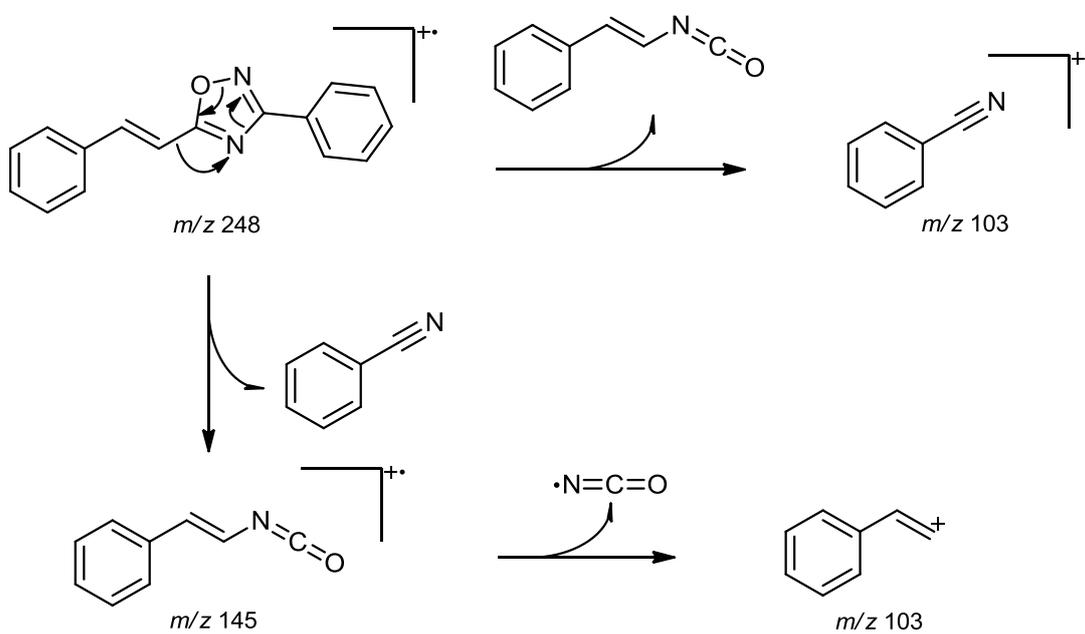
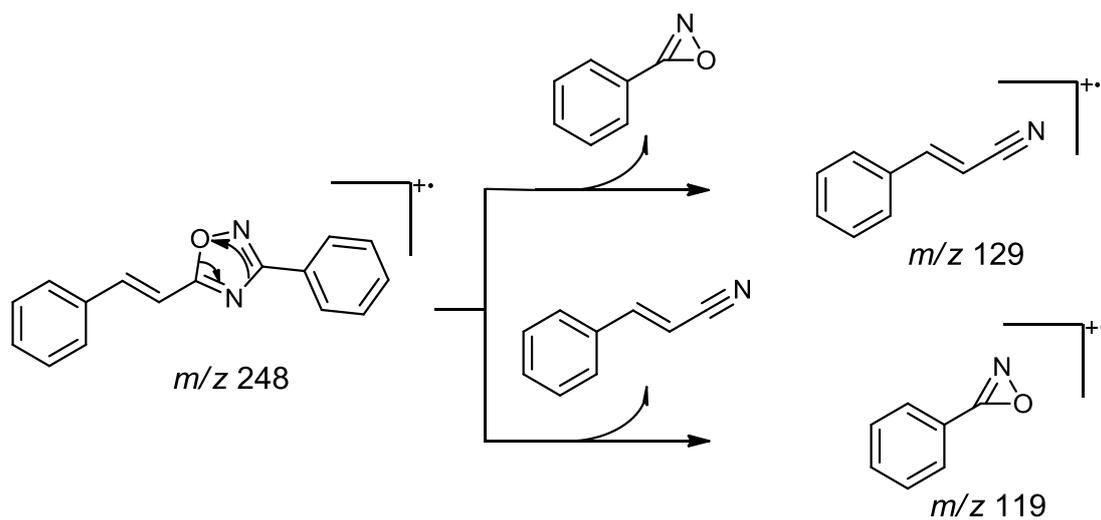


**Figura 27.** Espectro de IV para o oxadiazol **81** com as respectivas atribuições.

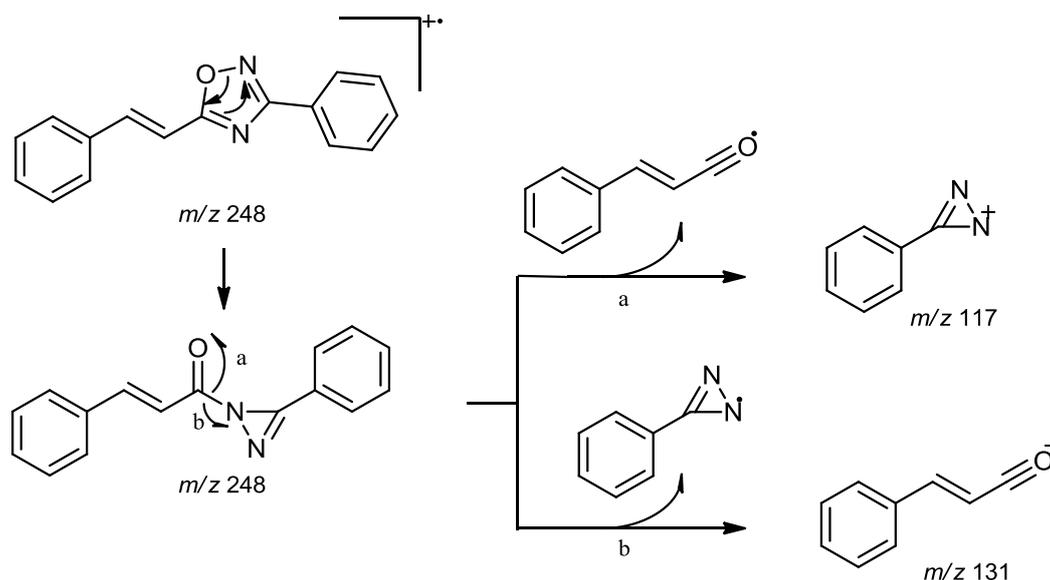
Observou-se nos espectros de massas (IE, 70eV) que os fragmentos identificados estavam de acordo com a proposta de fragmentação determinada para este trabalho. A **Figura 27** mostra o EM para o oxadiazol **69**, cuja proposta de fragmentação é esmiuçada no **Esquema 18**. Para os oxadiazóis **70-82** serão adotadas propostas similares, sendo somente explicitados os respectivos fragmentos característicos.



**Figura 28.** Espectrometria de massas (IE, 70eV) para o oxadiazol **69**.



**Esquema 18.** Propostas de fragmentação para o oxadiazol **69** (continua).



**Esquema 18.** Propostas de fragmentação para o oxadiazol **69** (continuação).

A análise dos espectros de massas de alta resolução (EMAR/ES+) confirmou a presença dos 1,2,4-oxadiazóis **69-82** uma vez que os picos referentes aos respectivos íons  $[M+H]^{++}$  foram observados. As massas monoisotópicas observadas apresentaram variações menores ou iguais a 0,001% em relação aos valores calculados. A interpretação do conjunto de dados espectrométricos obtidos para cada produto (RMN<sup>1</sup>H, DEPTQ, IV, EMBR e EMAR) permitiu então que houvesse a elucidação estrutural e caracterização do conjunto de produtos inicialmente planejados com rendimentos globais variando de 40 a 79%. O detalhamento dessas informações para cada um dos oxadiazóis 69-82 é apresentado na seção experimental deste trabalho e os respectivos espectros se encontram na seção de anexos.

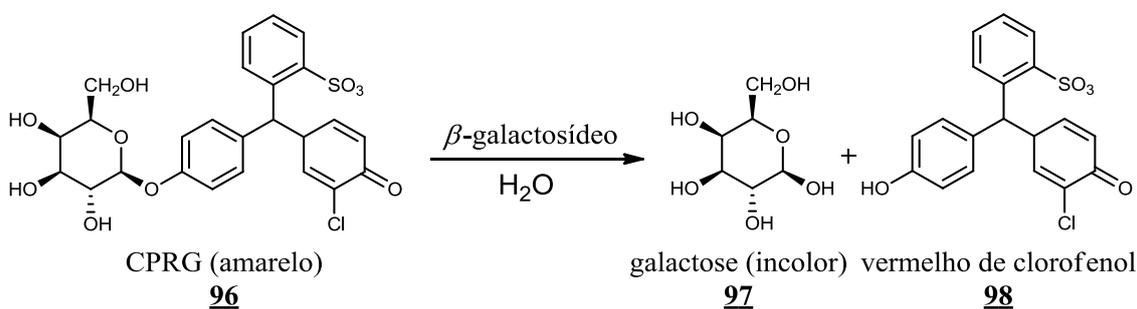
### 3.5. Determinação da atividade biológica dos 1,2,4-oxadiazóis frente a epimastigotas de *T. cruzi* (cepas Tulahuen C2C4 e Dm28c) e investigação quanto a possíveis mecanismos de ação

A avaliação da atividade tóxica e/ou inibitória *in vitro* é normalmente a primeira etapa de uma sequência de ensaios biológicos que visem caracterizar as propriedades de um conjunto de derivados racionalmente planejados como agentes tripanocidas. Os ensaios *in vitro* possuem a vantagem de permitir a realização de uma triagem para selecionar aqueles derivados mais ativos que serão, então, utilizados nos ensaios *in vivo* (que mimetizam melhor as alterações patológicas da doença de Chagas em um

mamífero), um ensaio que envolve a utilização de animais e que, portanto, deve ser conduzido com o máximo critério na escolha das condições experimentais.

A atividade inibitória e/ou toxicidade *in vitro* frente a *T. cruzi* (cepas Tulahuen C2C4 e Dm28c) foi determinada após incubação por 7 dias de formas epimastigotas do parasito em meios de cultura LIT (*Liver Infusion Tryptose*, para Tulahuen C2C4) e BHI (*Brain Heart Infusion*, para Dm28c), ambos suplementados com ácido fólico (20 mg/L), hemina (10 mg/L) e 10% de soro fetal bovino (SFB). O tratamento com os compostos **69-82** foi feito em triplicata em diferentes concentrações (100, 60, 24, 9,6, 3,8 e 1,5 $\mu$ M) e comparadas com os controles Vivo (triplicata, sem tratamento), de veículo (triplicata, DMSO 0,6% v/v), branco (meio de cultivo sem adição de parasitos) e do fármaco de referência (Benzonidazol **1**, triplicata, 100, 60, 24, 9,6, 3,8 e 1,5 $\mu$ M). O percentual de DMSO nos experimentos realizados encontra-se abaixo do valor máximo recomendado, que é de 2% para *T. cruzi*.

A cepa Tulahuen C2C4 é uma cepa em que os parasitos foram submetidos a engenharia genética de modo a serem capazes de expressar a enzima  $\beta$ -galactosidase (gene *lacZ* de *Escherichia coli*) (BUCKNER *et al*, 1996). Essa enzima catalisa a reação colorimétrica de clivagem do vermelho de clorofenol  $\beta$ -galactosídeo, **96**, (CPRG), de coloração amarela, dando origem à galactose, **97**, (incolor) e ao vermelho de clorofenol, **98**, de coloração avermelhada ( $\lambda = 562\text{nm}$ ) (SEEBER & BOOTHROYD, 1996) (**Esquema 19**).



**Esquema 19.** Reação de colorimétrica de clivagem do CPRG em galactose e vermelho de clorofenol (BUCKNER *et al*, 1996).

A viabilidade celular foi determinada no sétimo dia de incubação dos parasitos após tratamento com solução de CPRG (concentração final de 3mg/mL) por meio de leitura fotocolorimétrica no comprimento de onda de  $\lambda = 570\text{nm}$ , de modo que os valores de absorbância encontrados são diretamente proporcionais ao número de células

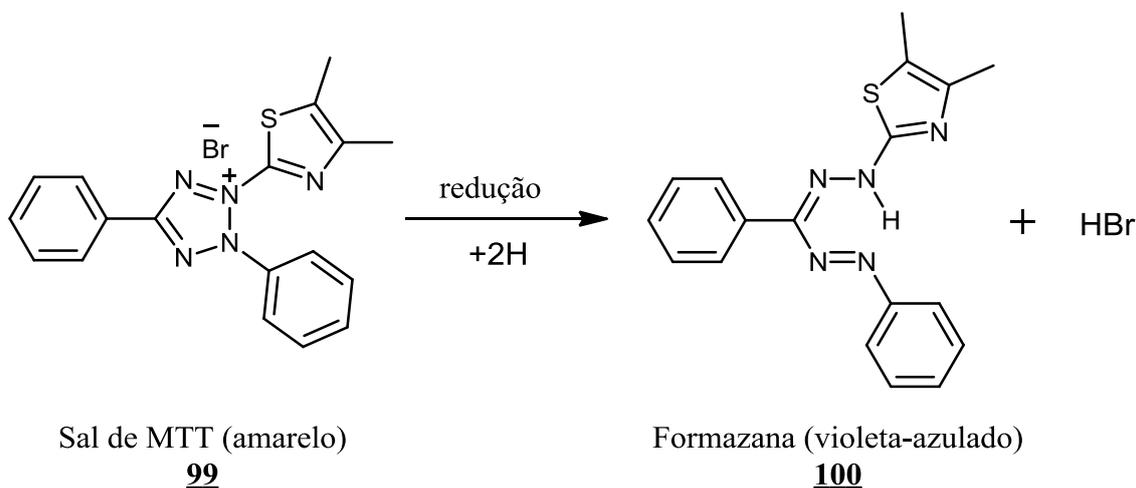
viáveis (BUCKNER *et al*, 1996). Os valores de CI<sub>50</sub> frente a epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Tulahuen C2C4) calculados para os compostos **69-82** a são apresentados na **Tabela 5**.

**Tabela 5.** Valores de CI<sub>50</sub> frente a epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Tulahuen C2C4) calculados para os compostos **69-82**.

Composto	CI <sub>50</sub> ± σ <sup>1</sup> (µM)
<b>1</b> <sup>2</sup>	5,4 ± 1,1
<b>69</b>	96,4 ± 11,4
<b>70</b>	<100 <sup>3</sup>
<b>71</b>	<100
<b>72</b>	<100
<b>73</b>	<100
<b>74</b>	19,6 ± 1,3
<b>75</b>	95,0 ± 4,3
<b>76</b>	<100
<b>77</b>	<100
<b>78</b>	<100
<b>79</b>	<100
<b>80</b>	<100
<b>81</b>	<100
<b>82</b>	33,4 ± 1,1

<sup>1</sup> Desvio padrão <sup>2</sup> Benzonidazol, fármaco de referência <sup>3</sup> Inativo à maior concentração testada

A viabilidade celular de formas epimastigotas de *T. cruzi* da cepa Dm28c tratados com os oxadiazóis **69-82** foi determinada por meio da reação colorimétrica de redução do sal de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-1,3-tiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazól-3-io, **99**), de coloração amarelo-pálida e solúvel em água, dando origem à formazana de MTT (4,5-dimetil-2-{(E)-[(Z)-fenil(2-fenilhidrazinilideno)metil]diazetil}-1,3-tiazol, **100**), de coloração violeta-azulada e lipossolúvel (**Esquema 20**). A redução do sal de MTT à respectiva formazana ocorre em presença de atividade mitocondrial, de forma que o método em é uma forma indireta de determinação da viabilidade celular, assumindo-se um maior número de células viáveis quão maior a quantidade de formazana de MTT formada. A quantificação é feita após a solubilização dos cristais de formazana em DMSO e leitura dos valores de absorbância em leitor de placas com filtro de luz no comprimento de 570nm (VAN MEERLOO *et al.*, 2011).



**Esquema 20.** Reação colorimétrica de clivagem do sal de MTT (**99**), de coloração amarelo-pálida, dando origem à formazana de MTT (**100**), de coloração violeta-azulada (VAN MEERLOO *et al.*, 2011).

Os valores de  $CI_{50}$  dos oxadiazóis **69-82**, bem como do Benzonidazol (**1**), frente a epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) são apresentados na **Tabela 6**.

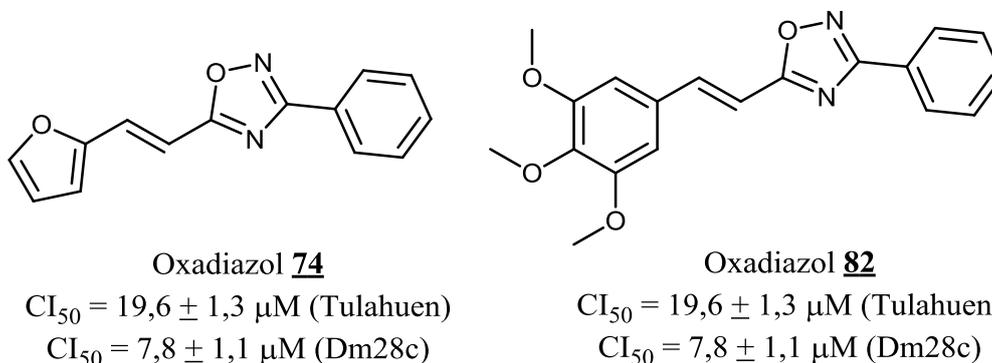
**Tabela 6.** Valores de  $CI_{50}$  frente a epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28C) calculados para os compostos **69-82**.

Composto	$CI_{50} \pm \sigma^1$ ( $\mu M$ )
<b>1</b> <sup>2</sup>	$3,2 \pm 1,0$
<b>69</b>	$11,2 \pm 1,1$
<b>70</b>	$12,0 \pm 1,0$
<b>71</b>	$14,5 \pm 1,2$
<b>72</b>	$46,9 \pm 1,5$
<b>73</b>	$14,9 \pm 1,2$
<b>74</b>	$7,8 \pm 1,1$
<b>75</b>	$21,7 \pm 1,3$
<b>76</b>	$> 100^3$
<b>77</b>	$> 100$
<b>78</b>	$> 100$
<b>79</b>	$> 100$
<b>80</b>	$19,5 \pm 1,2$
<b>81</b>	$18,3 \pm 1,5$
<b>82</b>	$9,4 \pm 1,1$

<sup>1</sup> Desvio padrão <sup>2</sup> Benzonidazol, fármaco de referência <sup>3</sup> Inativo à maior concentração testada

Observou-se, de maneira geral, uma maior susceptibilidade da cepa Dm28c em relação à cepa Tulahuen C2C4 à ação dos oxadiazóis **69-82**. Tal discrepância é recorrente quando da comparação do efeito tóxico/inibitório de moléculas bioativas frente a diferentes cepas do *T. cruzi* (NEAL & VAN BUEREN, 1984). No entanto há uma limitação quanto à comparação dos resultados apresentados oriunda dos diferentes

métodos adotados para a quantificação do parasito, havendo inclusive na literatura trabalhos discutindo tais aspectos (YANG *et al*, 2017). Verificou-se ainda que, dentre os compostos sintetizados neste trabalho, os mais ativos frente a epimastigotas de *T. cruzi* das duas cepas testadas são os oxadiazóis **74** e **82** (Figura 29).



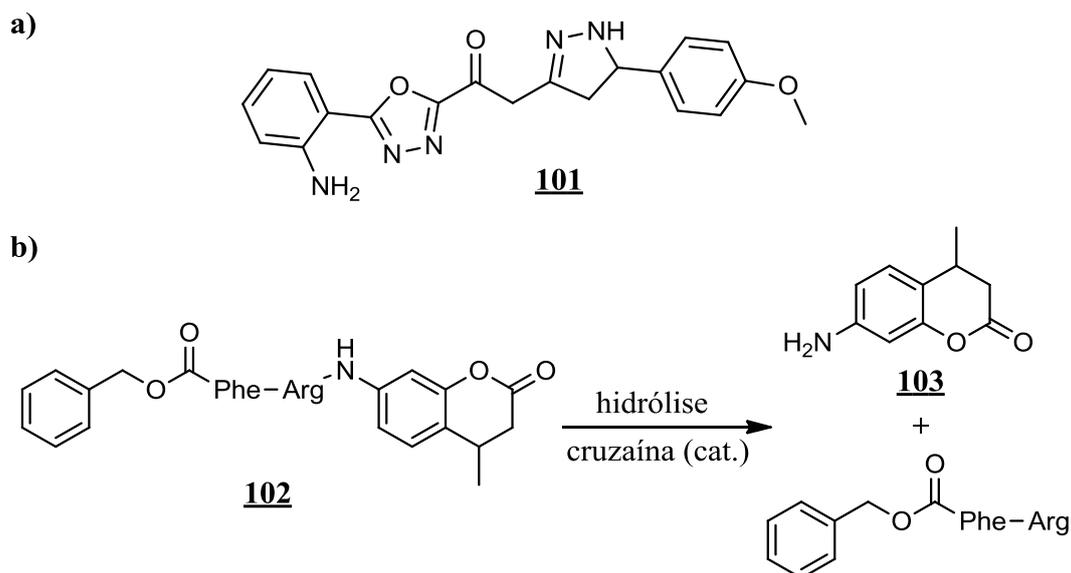
**Figura 29.** Estruturas dos compostos com maior atividade dentre a série preparada neste trabalho e seus respectivos valores de  $CI_{50}$  frente a epimastigotas de *T. cruzi* (Tulahuen C2C4 e Dm28c).

### 3.6. Investigação quanto a possíveis mecanismos de ação dos 1,2,4-oxadiazóis frente a *T. cruzi*

Um dos desafios da pesquisa por moléculas com perfil antichagásico emerge da rica variedade de alvos que podem ser explorados com potencial farmacológico. No presente trabalho investigaram-se a atividade inibitória da protease cruzaina, alterações no ciclo celular e alteração/inibição da biossíntese de esteróis.

#### 3.6.1. Inibição da atividade catalítica da protease cruzaina

O relato de oxadiazóis com atividade inibitória sobre a atividade catalítica da protease cruzaina (**101**,  $CI_{50} = 0,2\mu\text{M}$ , **Figura 30.a.**) nos estimulou a investigar o potencial inibitório da nossa série de moléculas neste alvo. A inibição da atividade catalítica da protease cruzaina foi avaliada *in vitro* com base no seu potencial de clivagem do substrato peptídico Z-Phe-Arg-AMC (benziloxycarbonil-fenilalanina-arginina-aminometilcumarina, **102**), que apresenta baixa fluorescência, liberando o grupo AMC (7-amino-4-metilcumarina, **103**), que apresenta alta fluorescência. A **Figura 30.b** apresenta as estruturas. (FERREIRA *et al*, 2009).



**Figura 30. a)** Estrutura de oxadiazol (**101**) relatado como potente inibidor da atividade catalítica da cruzaina ( $IC_{50} = 0,2\mu M$ ). **b)** Reação de clivagem do substrato peptídico Z-Phe-Arg-AMC (**102**) em presença da protease cruzaina liberando o grupo fluorescente AMC (**103**).

Os testes de inibição de atividade catalítica da cruzaina foram realizados a partir do monitoramento da fluorescência em fluorímetro de placa com  $\lambda = 355$  nm para excitação e  $\lambda = 460$  nm para emissão após o tratamento da proteína isolada com os derivados **69-82** nas concentrações de tratamento de 100  $\mu M$  e 200  $\mu M$  em triplicata, com e sem incubação por 10 minutos anteriores à adição do substrato e em comparação a uma triplicata de controle positivo (sem tratamento). O percentual de inibição foi determinado por meio da razão entre as médias dos valores de fluorescência observados para as diferentes situações tratadas e para o controle positivo (CHEN *et al*, 2010). Os percentuais de inibição da atividade catalítica da cruzaina observados para os oxadiazóis **69-82** são apresentados na **Tabela 7**.

**Tabela 7.** Resultados da avaliação *in vitro* da inibição da atividade enzimática da protease cruzaina em presença dos derivados **69-82**.

Composto	Percentual de Inibição (%) <sup>1</sup>			
	Sem incubação <sup>2</sup>		Com Incubação (10') <sup>3</sup>	
	100 µM	200 µM	100 µM	200 µM
<b>69</b>	13	6	15	25
<b>70</b>	18	7	10	12
<b>71</b>	11	39	19	38
<b>72</b>	25	44	23	51
<b>73</b>	53	87	47	67
<b>74</b>	16	26	14	23
<b>75</b>	21	30	19	28
<b>76</b>	8	1	8	16
<b>77</b>	5	17	4	8
<b>78</b>	14	18	14	19
<b>79</b>	5	17	6	14
<b>80</b>	29	25	79	94
<b>81</b>	10	49	19	44
<b>82</b>	46	Fluoresce	64	Fluoresce

<sup>1</sup> Percentual em relação ao controle positivo (sem tratamento) <sup>2</sup> Adição do substrato peptídico concomitante ao tratamento <sup>3</sup> Incubação por 10' das situações tratadas antes da adição do substrato peptídico <sup>4</sup> A fluorescência do composto em solução na concentração testada interferiu no resultado.

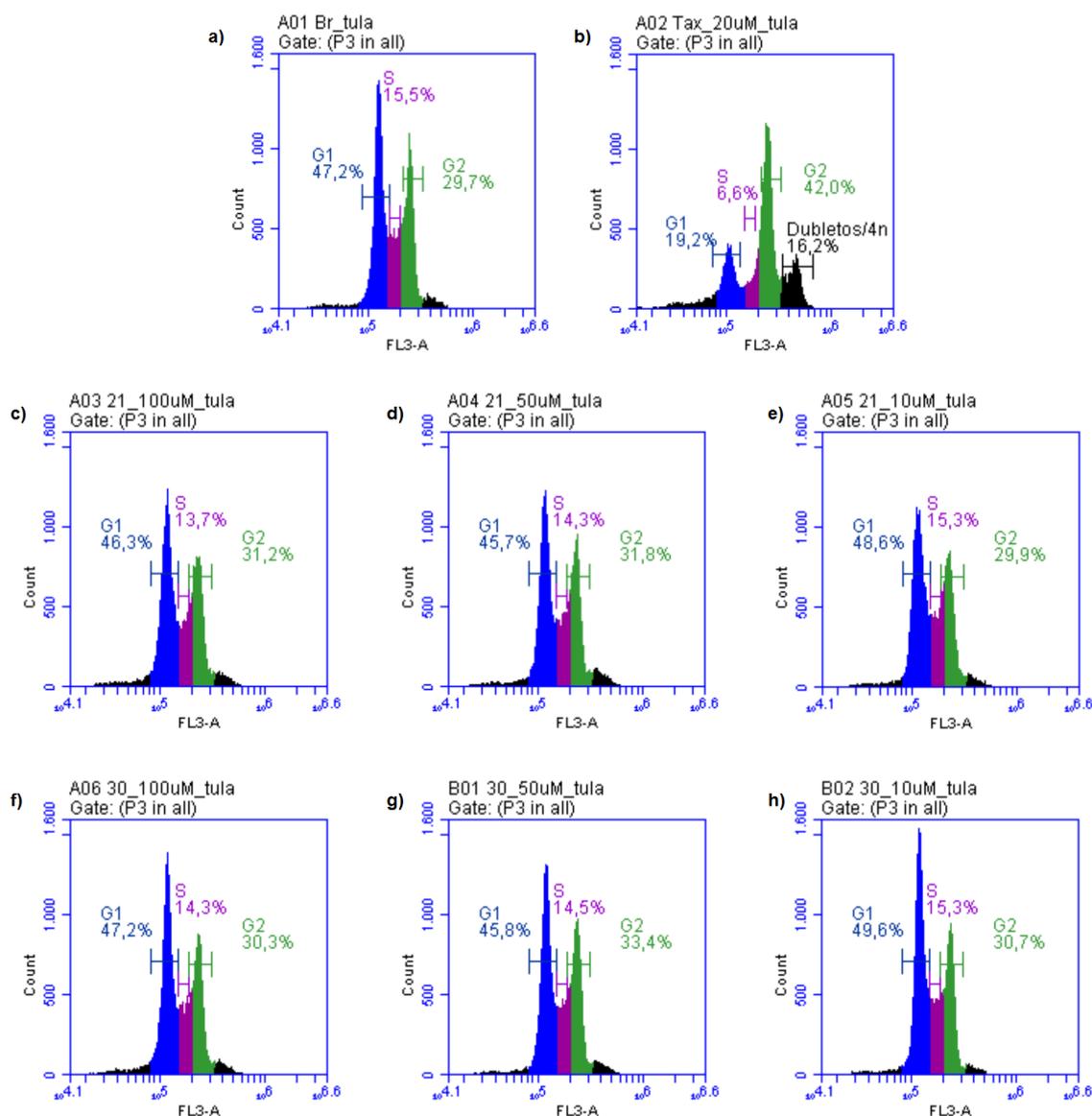
Os compostos que mais eficientemente inibiram a atividade enzimática da cruzaina foram **73** (sem incubação, 53% a 100 µM e 87% a 200 µM) e **80** (com incubação, 53% a 100 µM e 87% a 200 µM). Apesar de ambos os compostos apresentaram nenhuma atividade frente a epimastigotas de *T. cruzi* da cepa Tulahuen C2C4 e atividade moderada frente a epimastigotas da cepa Dm28c (CI<sub>50</sub> = 14,9±1,2 µM para **73** e CI<sub>50</sub> = 19,5±1,2 µM para **80**), as moléculas são potencialmente ativas frente a outras formas evolutivas do parasito uma vez que a protease cruzaina também está envolvida nos processos de invasão celular e de diferenciação entre formas evolutivas.

O composto **82** (CI<sub>50</sub> = 33,4±1,1 µM para Tulahuen C2C4 e CI<sub>50</sub> = 9,4±1,1 µM para Dm28c) apresentou valores de inibição de 46% e 64%, respectivamente para os ensaios sem e com incubação prévia, à concentração de 100 µM, no entanto o fato de se ter sido observada intensa fluorescência na concentração de 200 µM faz-nos inferir quanto a possíveis interferências nos resultados decorrentes dessa característica. Dessa forma faz-se necessária uma avaliação do comportamento fotoquímico de **82** nas condições do experimento e uma comparação com os resultados obtidos para uma melhor compreensão do seu perfil inibitório.

### 3.6.2. Avaliação das alterações sobre o ciclo celular do *T. cruzi*

A piperina (**8**), em cujo arcabouço estrutural inspiramo-nos para o desenho da série de 1,2,4-oxadiazóis descritos neste trabalho, atua sobre o ciclo celular do *T. cruzi*. Observou-se que parasitos tratados com piperina a 10 µg/mL por 5 dias apresentaram indícios de ação sobre o processo replicativo, como por exemplo indivíduos com material genético e estruturas celulares (flagelo e organelas) duplicadas e com o corpo celular arredondado (FREIRE-DE-LIMA *et al*, 2008). Essas observações podem ser atribuídas a alterações no processo de polimerização da tubulina, importante na formação de microtúbulos, componentes do fuso mitótico e do esqueleto subpelicular de tripanosomatídeos (DE SOUZA & MEYER, 1974).

Foi realizada então uma análise citométrica de fluxo de parasitos (epimastigotas de *T. cruzi*, cepa Tulahuen C2C4) tratados com os compostos **70** e **74**, a 100, 50 e 10 µM, e com o inibidor tubulínico taxol (**5**, controle positivo, 20 µM) por 48h em comparação com o controle negativo (tratamento com 0,3% v/v DMSO) para se avaliar as alterações no ciclo celular. A interpretação dos dados se baseia na proporção entre os números de células nas diferentes fases do ciclo, G1, S e G2, de modo que, para os parasitos sem tratamento, se espera observar a maior parte dos indivíduos na fase G1, uma frequência menor de indivíduos na fase G2 e a minoria dos indivíduos na fase S. Ao se tratar a cultura de células com inibidores tubulínicos passa a se observar uma inversão na proporção do número de indivíduos nas fases G1 e G2, sinal de que o processo replicativo celular fora interrompido. A **Figura 31** apresenta os histogramas de fluorescência mostrando o conteúdo de DNA correspondentes às fases G1, S e G2 dos parasitos nas situações descritas.

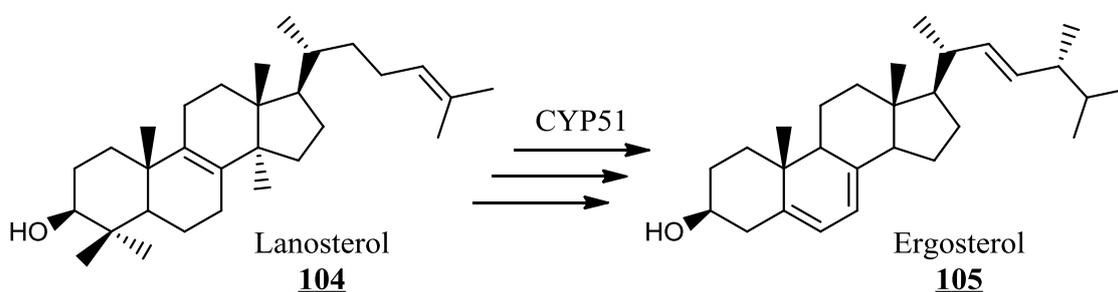


**Figura 31.** Histogramas de fluorescência mostrando o conteúdo de DNA correspondentes às fases G1, S e G2 dos parasitos tratados com: **a)** 0,3% DMSO (controle negativo). **b)** taxol (**5**) a 20 μM (controle positivo). **c)** **70** a 100 μM. **d)** **70** a 50 μM. **e)** **70** a 10 μM. **f)** **74** a 100 μM. **g)** **74** a 50 μM. **h)** **74** a 10 μM.

Observa-se para os controles negativo e positivo comportamento dentro das expectativas, com inversão dos picos correspondentes às fases G1 e G2 na comparação entre ambas as situações. Como os histogramas referentes às situações tratadas com **70** e **74** se assemelham ao perfil do histograma referente ao controle negativo, conclui-se que o mecanismo de ação dos oxadiazóis tem pouca ou nenhuma influência de alterações no ciclo celular do parasito.

### 3.6.3. Alterações no processo biossintético de lipídeos de membrana

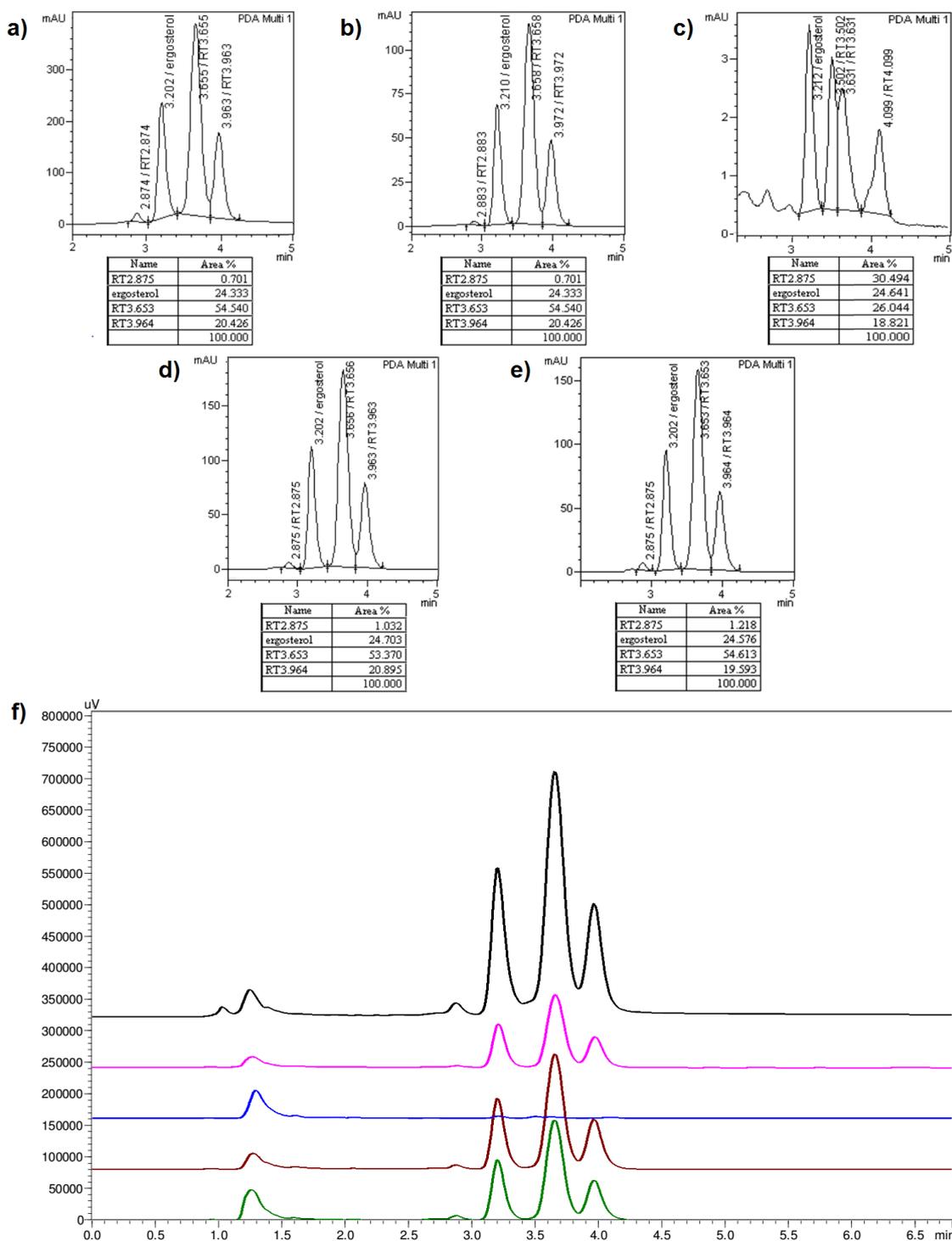
No *T. cruzi*, os lipídeos (esteróis) de membrana possuem papel fundamental na viabilidade celular e na regulação da atividade enzimática (URBINA, 1997). Apesar de estar presente em seres de diversos reinos, a rota biossintética de esteróis de membrana apresenta peculiaridades inerentes a cada espécie, especialmente em relação às isoformas da enzima CYP51, que comumente apresentam baixa similaridade entre si (entre 22 e 33% na sequência primária de aminoácidos). Dessa forma a inibição da atividade enzimática da CYP51 no *T. cruzi* desponta como um alvo interessante na pesquisa por antichagásicos, uma vez que um fármaco com essa propriedade tende a apresentar boa seletividade em relação à isoforma da enzima humana. A CYP51 tem importância no processo de desmetilação ao longo da rota sintética que converte o lanosterol (**104**) em ergosterol (**105**), apresentados na **Figura 32** (LEPESHEVA *et al*, 2003).



**Figura 32.** Estruturas químicas dos esteróis lanosterol (**101**) e ergosterol (**102**).

O método de análise da influência dos 1,2,4-oxadiazóis descritos nesse trabalho sobre a biossíntese de lipídeos de membrana foi adaptada do trabalho de Pinto e colaboradores (2011). Formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) foram cultivadas em meio de cultura BHI em tubos cônicos em diferentes situações: tratados em concentrações próximas aos respectivos valores de  $CI_{50}$  dos derivados **74** e **82**; tratados à concentração de 1,0  $\mu$ M do inibidor de CYP51 Cetoconazol (**3**); tratado com o veículo (DMSO 0,03% v/v); sem tratamento. Após 7 dias, os tubos foram submetidos à centrifugação e o conteúdo depositado no fundo sob a forma de *pellets* foi submetido à saponificação com solução alcoólica de hidróxido de potássio (25% m/v). A etapa de saponificação faz com que os fosfolipídios de membrana, com grupamentos ácidos, sejam ionizados enquanto os esteróis mantêm-se na forma molecular, uma vez que não possuem prótons suficientemente ácidos. Ao realizar-se uma partição com n-hexano os lipídios não-saponificáveis, como o ergosterol (**104**) e o lanosterol (**105**), são extraídos

pela fase orgânica e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os cromatogramas referentes ao experimento descrito estão agrupados na **Figura 33**.



**Figura 33.** Cromatogramas obtidos por CLAE referentes às respectivas frações lipídicas não saponificáveis extraídas de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) nas seguintes situações: **a)** sem tratamento; **b)** tratamento com DMSO 0,03% v/v; **c)** cetozonazol (**3**) a 0,5 µM; **d)** tratamento com **74** a 10 µM; **e)** tratamento com **82** a 8 µM; **f)** cromatogramas sobrepostos: sem tratamento (preto), DMSO (rosa), cetozonazol a 0,5 µM (azul), **74** a 10 µM (marrom) e **82** a 8 µM (verde).

O controle do veículo não apresentou alterações significativas em relação ao controle não tratado, ao passo que o controle positivo tratado com cetoconazol (**3**) apresentou redução drástica na quantidade de esteróis de maneira geral. Esse resultado denota que a concentração de inibidor utilizado foi mais alta que o adequado para se observar com clareza o efeito sobre a biossíntese de esteróis, pois os parasitos foram provavelmente muito debilitados pelo tratamento. No entanto a alteração na proporção do pico referente ao ergosterol em relação aos demais esteróis indica que há alteração em seu processo biossintético. Já nas situações tratadas com **74** e **82** não observou-se alteração apreciável em relação ao controle não tratado, indicando que os mesmos não são inibidores da rota biossintética de esteróis de membrana.

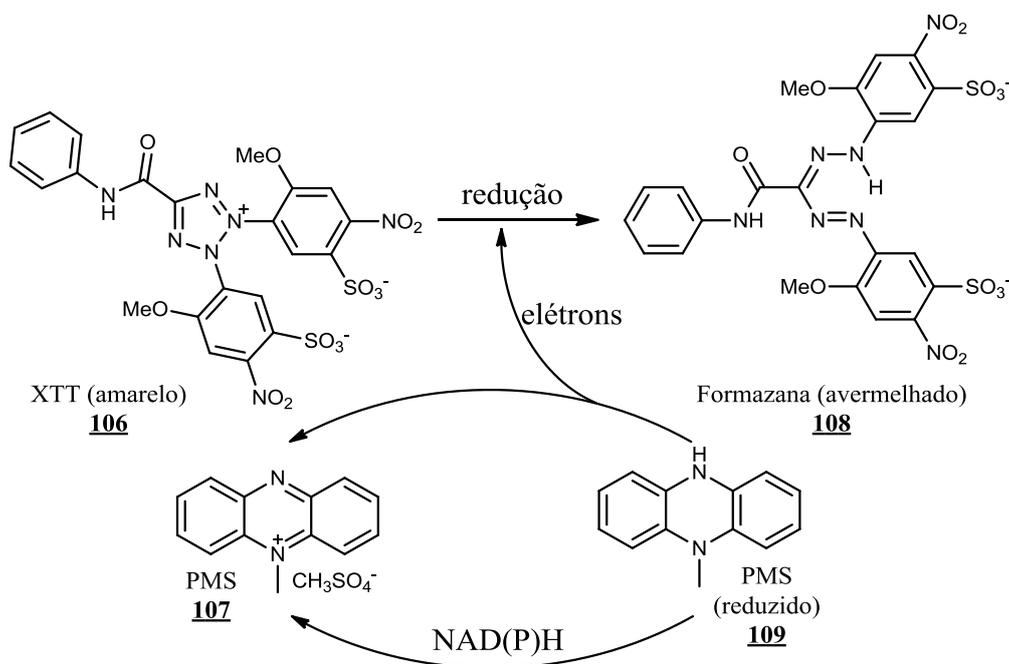
### **3.7. Determinação da atividade biológica dos 1,2,4-oxadiazóis frente a macrófagos peritoneais e esplenócitos totais de camundongos**

Um bom candidato a fármaco para a doença de Chagas deve não somente apresentar atividade tóxica ou inibitória sobre o *T. cruzi*, mas também apresentar baixa toxicidade frente a células do hospedeiro mamífero. Dessa forma, é importante que se conheça a dose letal das moléculas de teste para células primárias mamíferas ( $DL_{50}$ ). Um dado importante nesse contexto é o índice de seletividade (SI), definido como a razão entre a  $DL_{50}$  frente a células de mamíferos pela  $CI_{50}$  frente ao parasito, conforme mostrado na equação (2).

$$SI = \frac{DL_{50}}{CI_{50}} \quad (2)$$

Os ensaios em células primárias de mamíferos foram realizados em macrófagos peritoneais e esplenócitos totais de camundongos BALB/c, machos, com 8-10 semanas de vida. Os macrófagos foram coletados a partir do lavado peritoneal dos camundongos, onde foram então plaqueados e tratados em triplicata nas concentrações de 150, 100, 50 e 10 $\mu$ M, bem como os esplenócitos totais extraídos do baço de um dos animais. As culturas tratadas foram comparadas com os controles Vivo (triplicata, sem tratamento), de veículo (triplicata, DMSO 0,3%) e do fármaco de referência (Benzonidazol **1**, 150, 100, 50 e 10 $\mu$ M). A viabilidade celular foi medida após tratamento com solução de sal monossódico de XTT (2,3-Bis-(2-Metoxi-4-Nitro-5-Sulfofenil)-2H-Tetrazol-5-Carboxanilida), **106**, concentração final de 0,4 mg/mL) e PMS (N-metil dibenzopirazina metil sulfato, **107**, concentração final de 26,5  $\mu$ g/mL) indiretamente por meio de leitura

fotocolorimétrica no comprimento de onda de  $\lambda = 490\text{nm}$ . O sal de XTT, **106**, (de coloração amarelo-pálida) reage na superfície mitocondrial das células, sendo reduzido e dando origem ao derivado formazana (**108**), de coloração vermelha. O PMS (**107**) catalisa essa reação atuando como carreador de elétrons para a reação de oxirredução, adquirindo elétrons do NAD(P)H, passando à sua forma reduzida (**109**) e cedendo elétrons para a reação de redução do XTT (**106**) à formazana (**108**) ao mesmo tempo que retorna à sua forma original (**107**) (**Esquema 21**) (ROEHM *et al*, 1991; PAULL *et al*, 1988).



**Esquema 21.** Reação colorimétrica de formação do derivado formazana (**108**) a partir do sal de XTT (**106**) catalisada pelo PMS (**107**) (ROEHM *et al*, 1991; PAULL *et al*, 1988).

Os valores de  $DL_{50}$  frente a macrófagos peritoneais e esplenócitos totais de camundongo BALB/c calculados para os compostos **69-82** se encontram na **Tabela 8**.

**Tabela 8.** Valores de DL<sub>50</sub> frente a macrófagos peritoneais e esplenócitos totais de camundongo BALB/c calculados para os compostos **69-82**.

Composto	DL <sub>50</sub> ± σ' (µM) (Macrófagos)	DL <sub>50</sub> ± σ' (µM) (Esplenócitos)
<u>1</u> <sup>2</sup>	>150 <sup>3</sup>	>150
<u>69</u>	>150	>150
<u>70</u>	>150	>150
<u>71</u>	>150	>150
<u>72</u>	>150	>150
<u>73</u>	>150	133,7 ± 9,1
<u>74</u>	>150	120,8 ± 17,6
<u>75</u>	52,1 ± 1,9	73,8 ± 0,8
<u>76</u>	>150	>150
<u>77</u>	>150	>150
<u>78</u>	>150	>150
<u>79</u>	>150	>150
<u>80</u>	>150	>150
<u>81</u>	>150	>150
<u>82</u>	>150	>150

<sup>1</sup> Desvio padrão <sup>2</sup> Benzonidazol, fármaco de referência <sup>3</sup> Inativos à maior concentração testada

Os resultados obtidos revelaram os compostos da série apresentam de moderada a baixa toxidez frente a macrófagos peritoneais e esplenócitos totais de camundongo. Contra macrófagos peritoneais, apenas o composto **75** (DL<sub>50</sub> = 52,1 + 1,9 µM), e contra esplenócitos totais apenas os compostos **73** (DL<sub>50</sub> = 133,7 + 9,1 µM), **74** (DL<sub>50</sub> = 120,8 + 17,6 µM) e **75** (DL<sub>50</sub> = 73,8 + 0,8 µM), apresentaram valores de DL<sub>50</sub> menores que a concentração máxima do experimento (150µM). Esse resultado é interessante uma vez que as próximas etapas da investigação envolvem os ensaios *in vitro* com células mamíferas infectadas, para se verificar a atividade dos compostos frente a formas amastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi*, e de infecção *in vivo*. Em ambos os casos uma baixa toxicidade frente a células mamíferas representa a possibilidade de se observar os efeitos toxicológicos dos compostos com o mínimo de interferência por danos colaterais.

De posse dos valores de DL<sub>50</sub> frente a macrófagos e esplenócitos juntamente com os dados de CI<sub>50</sub> contra epimastigotas de *T. cruzi* nas cepas Tulahuen C2C4 e Dm28c é possível calcular valores dos IS's para as respectivas situações, cujos valores são apresentados na **Tabela 9**. Derivados cujos valores de CI<sub>50</sub> frente ao parasito excederam a maior concentração testada (100µM) não tiveram seu valor de IS determinado.

**Tabela 9.** Valores dos respectivos índices de seletividade (IS) para os derivados **69-82** para epimastigotas de cruzi (cepas Tulahuen C2C4 e Dm28c) frente a macrófagos e esplenócitos murinos primários.

Composto	Índice de Seletividade			
	Frente a Macrófagos		Frente a Esplenócitos	
	Tulahuen C2C4	Dm28c	Tulahuen C2C4	Dm28c
<u>1</u> <sup>1</sup>	>27,8	>46,9	>27,8	>46,9
<u>69</u>	N.C. <sup>2</sup>	>13,4	N.C.	>13,4
<u>70</u>	>1,6	>12,5	>1,6	>12,5
<u>71</u>	N.C.	>10,3	N.C.	>10,3
<u>72</u>	N.C.	>3,2	N.C.	>3,2
<u>73</u>	N.C.	>10,1	N.C.	9,0
<u>74</u>	>7,7	>19,2	>6,2	15,5
<u>75</u>	0,5	>2,4	0,8	3,4
<u>76</u>	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
<u>77</u>	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
<u>78</u>	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
<u>79</u>	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
<u>80</u>	N.C.	>7,7	N.C.	>7,7
<u>81</u>	N.C.	>8,2	N.C.	>8,2
<u>82</u>	>4,5	>16,0	>4,5	>16,0

<sup>1</sup> Benzonidazol, fármaco de referência <sup>2</sup> Não calculado para valores de  $CI_{50} > 100\mu M$ .

## **4. PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.1. Materiais e métodos**

#### **4.1.1. Instrumentos utilizados nas caracterizações espectrométricas**

- Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz) e <sup>13</sup>C (125 MHz) foram obtidos em espectrômetros de marca Brüker, modelo Ultrashield Plus (PPGQ – UFRRJ). Foi utilizado como referência interna o tetrametilsilano (TMS) e os solventes: clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) e dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO-*D*<sub>6</sub>) na solubilização das amostras. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram medidos em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (*J*) em Hertz (Hz);
- Os espectros de Infravermelho (IV) foram obtidos em espectrofotômetro da marca Bruker, modelo Vertex 70 (PPGQ-UFRRJ).
- Os espectros de massa de baixa resolução (EMBR) foram obtidos no cromatógrafo em fase gasosa, acoplado ao espectrofotômetro de massas GCMS-QP2010 Plus da Shimadzu (PPGQ-UFRRJ). Condições de análise: Coluna: vf-

5MS (30 m x 0,25 x 0,25 mm); Temperatura: 200°C/1' - 10°C - 290°C/40 min;  
Injetor: 270°C;

- Os espectros de massas de alta resolução (EMAR) foram obtidos no equiMicromass Q-TOF (Waters, UK) do Instituto de Química da UNICAMP.

#### **4.1.2. Instrumentos e reagentes utilizados nas análises, sínteses e purificações**

- Cromatofolhas de sílica gel 60 F254 (camada de 0,2 mm), da marca Merck para o acompanhamento por CCDA (Cromatografia de Camada Delgada Analítica) das reações;
- Solventes: acetato de etila, acetona, clorofórmio, diclorometano, etanol, éter etílico e metanol, fornecidos pela Vetec e/ou Tédia Brazil. O diclorometano, utilizado como solvente nas reações que necessitavam de meio anidro, foi previamente seco por destilação com hidreto de cálcio (VOGEL, 1978);
- Reagentes: Os ácidos 3-arylacrílicos e a benzamidoxima, precursores dos oxadiazóis planejados, estavam disponíveis na quimioteca do *LaQuiMed-UFRRJ*, e os demais reagentes, como o cloreto de oxalila, bem como os adsorventes, como a sílica-gel, foram obtidos da Sigma-Aldrich.

#### **4.1.3. Instrumentos e reagentes utilizados nos ensaios biológicos**

- Placas para cultura de células de 96 poços, de fundo chato, estéril em poliestireno da marca TPP<sup>TM</sup> (Suíça).
- Meios de cultura de células LIT (*Liver Infusion Tryptose*), RMPI (*Roswell Park Memorial Institute*) e PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) da marca Sigma-Aldrich.
- Reagentes colorimétricos CPRG (*Chlorophenol Red-β-Galactopyranoside*) e sal monossódico de XTT da marca Sigma-Aldrich.
- Leitor de placas iMark (*BioRad*)
- Fluorímetro de placa VICTOR3<sup>TM</sup> (*PerkinElmer*).
- Citômetro BD Accuri C5 (*Becton Dickinson Company*)
- Cromatógrafo LC-20AT (*Shimadzu*)

#### **4.1.4. Outros equipamentos**

- Reator de microondas - Modelo *Discover* - *CEM Inc*;
- Evaporadores rotatórios das marcas Ika e Fisaton - Modelo 802;

- Placas de agitação e aquecimento da marca Ika.

#### 4.2. Experimental geral para a preparação dos ácidos 3-arylacrílicos

Em um balão de 25 mL de capacidade com agitador magnético e equipado com condensador de refluxo, foram adicionados 7,35 mmol do aldeído adequadamente substituído, 15,38 mmol (1,6 g) do ácido malônico e 100 µL da piperidina (catalítico) juntamente com 5 mL da piridina. A reação foi mantida sob agitação e aquecimento em banho de óleo pré-estabilizado em 80°C por 1-2 h, observando-se liberação de CO<sub>2</sub> (vide **Esquema 9**, página 30). Após esse período a temperatura da reação foi elevada até a ebulição da piridina, mantendo-se em refluxo por 15-180 min. O andamento da reação foi acompanhado por CCF em cromatofolhas de sílica como fase estacionária e hexano/acetato 25% como fase móvel. Para tal, adicionou-se uma alíquota do meio reacional em 0,5 mL de HCl 10% v/v, realizando-se, em seguida, uma microextração com AcOEt, utilizando-se a fase orgânica na análise. Observou-se que produto (ácido cinâmico) apresentou caráter mais polar que o reagente (aldeído).

Verificado o completo consumo do aldeído de partida, a reação foi vertida em 100 mL de uma solução de HCl 10% v/v gelada para neutralização da piridina e protonação do carboxilato de ácido cinâmico, observando-se a imediata precipitação de um sólido branco neste processo. O sólido foi filtrado a vácuo em funil de Büchner e Kitassato, lavado com água destilada e seco ao ar e temperatura ambiente, apresentando rendimentos entre 77 e 98%. A **Tabela 10** relaciona as quantidades de reagentes utilizados na síntese de cada um dos precursores, as massas obtidas nas síntese, bem como os respectivos rendimentos observados.

**Tabela 10.** Reagentes e rendimentos das reações de formação dos ácidos 3-arylacrílicos.

Ácido 3-arylacrílico	Aldeído (Massa - g)	Massa de Ácido Malônico (g)	Volume de Piperidina (µL)	Volume de Piridina (mL)	Massa do Produto (mg)	Rendimento
<b>84</b>	<b>84a</b> (1,1 g) 7,35 mmol	1,600	100	5,0	1379,9	98 %
<b>86</b>	<b>86a</b> (0,5g) 3,05 mmol	0,664	42	2,1	483,5	77 %
<b>90</b>	<b>90a</b> (0,5 g) 3,56 mmol	0,775	49	2,4	582,6	90 %
<b>91</b>	<b>91a</b> (0,5 g) 3,30 mmol	0,718	45	2,2	504,7	79 %

A caracterização dos ácidos 3-arilacrílicos, foi realizada por meio da determinação pontos de fusão (P.F.) experimentais observados em comparação com os pontos de fusão experimentais informados na literatura e por EM (IE, 70eV). Os fragmentos característicos observados, e os P.F. observados em comparação com os dados da literatura se encontram listados na **Tabela 11**.

**Tabela 11.** Caracterização dos ácidos 3-arilacrílicos: P.F. observados em comparação com dados da literatura e fragmentos característicos do EM (IE, 70eV).

Ácido 3-arilacrílico	P.F. (°C)	P.F. (°C) Referência	EMBR (IE, 70eV) ( <i>m/z</i> )
<b><u>84</u></b>	117-119	118-119 (VENIT <i>et al</i> , 1989)	178 (M <sup>+</sup> 100%); 161 (30%); 133 (25%)
<b><u>86</u></b>	247-250	247 (PEARL <i>et al</i> , 1951)	192 (M <sup>+</sup> 100%); 175 (30%); 147 (10%)
<b><u>90</u></b>	209-211	208-209 (ČERVINKA & KŘÍŽ, 1983)	166 (M <sup>+</sup> 100%); 149 (45%); 121 (55%)
<b><u>91</u></b>	252	249-250 (SCHRAUZER, 1961)	182/184 (M <sup>+</sup> 60%/20%); 165/167 (30%/10%); 137/139 (30%/10%)

#### 4.3. Experimental geral para a preparação das benzamidoximas

Em um balão de 25 mL de capacidade foi preparada uma solução contendo 9,6 mmol de benzonitrila, 5 mg de 8-hidroxiquinolina e 8,0 mL de EtOH, que foi mantida sob agitação. Em seguida, foram preparadas soluções de NH<sub>2</sub>OH.HCl (1,4 g) e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,1 g) em 4 mL de água destilada, cada, que foram adicionadas gota a gota, concomitantemente, à solução contendo a benzonitrila ao longo de um período de 10 minutos. A reação se deu, então, sob refluxo por um período de 90-120 min, sendo acompanhada por CCF. Verificado o completo consumo da benzonitrila, o solvente foi removido do meio reacional em rotavapor e o sólido resultante ressuspendido em 150 mL de acetato de etila e lavado com água destilada (4 x 250 mL). O pH da fase aquosa foi mantido em torno 9, sendo acompanhado por fita de pH. A fase orgânica foi, então, seca em 300 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e evaporada em rotavapor obtendo-se um óleo marrom-esverdeado viscoso que solidificou após ser mantido em repouso ao ar em temperatura ambiente. As benzamidoximas **94** (P.F. = 77-79°C (76-78°C, SHARMA *et al*, 2009); EM (IE, 70eV): *m/z* 136 (M<sup>+</sup>, 100%) e *m/z* 119 (95%)) e **95** (P.F. = 175-178°C (não há relatos de ponto de fusão experimental para esta molécula na literatura); E.M.: *m/z* 226 (M<sup>+</sup>, 100%) e *m/z* 209 (85%)) foram obtidas com 1,1387 g ( $\eta = 86\%$ ) e 1,1033 g ( $\eta = 94\%$ ).

#### 4.4. Experimental geral para a preparação dos derivados 1,2,4-oxadiazólicos

Em um balão de 10 mL de capacidade, acoplado a um borbulhador, foram adicionados 1,37 mmol do ácido carboxílico e 2,0 mL (excesso: 2,95 g ; 22,81 mmol) de cloreto de oxalila (COCl)<sub>2</sub>. A reação foi mantida à temperatura ambiente e agitação magnética, sendo acompanhada por CCF (do éster metílico correspondente, formado por meio da reação instantânea de uma alíquota do cloreto de acila com metanol) e pelo desprendimento de CO<sub>(g)</sub> e CO<sub>2(g)</sub>, durante 15-60 minutos. O excesso de (COCl)<sub>2</sub> foi removido em evaporador rotatório, restando apenas o cloreto de acila que foi utilizado na etapa seguinte sem tratamento prévio, devido à sua instabilidade em atmosfera úmida.

Paralelamente, em outro balão de 10 mL, foram adicionados 3mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(anidro), 0,350 g (2,54 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 1,14 mmol da benzamidoxima, mantidos sob agitação magnética, atmosfera inerte de nitrogênio e temperatura ambiente. Solubilizou-se então o cloreto de ácido em 2mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (anidro) e adicionou-se, com o auxílio de uma seringa, esta solução contendo o cloreto de acila àquela contendo a benzamidoxima. Houve a liberação de gás HCl, assim como o aquecimento do meio reacional (reação exotérmica), que foi controlado com um banho de água fria. Após 15-90 minutos, observou-se por CCF o completo consumo dos reagentes e formação de uma mancha com perfil diferente dos reagentes, relativamente mais polar, que ficou evidenciado ser o intermediário *O*-acilado. Em seguida, foi adicionada uma pequena quantidade de sílica gel 0,063-200 mm ao meio reacional (0,7g/mmol de ácido de partida) e o solvente foi completamente removido. A reação de ciclização se deu em fase sólida sob aquecimento por micro-ondas à pressão ambiente, com temperatura entre 100-103°C, potência na faixa de 50-80W, por um período de 5-60 minutos. Após verificação por CCF do término da reação o produto foi purificado por filtração em sílica com hexano/acetato 10%, estando o produto desejado nas primeiras frações obtidas da eluição. As quantidades de reagentes respectivamente utilizadas nas reações são apresentadas na **Tabela 12**.

**Tabela 12.** Quantidades dos reagentes usados nas reações de formação dos oxadiazóis.

Oxadiazol	Ácido 3- arilacrílico	Benzamidoxima	(COCl) <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
<u>69</u>	<u>83</u> 300,0 mg 2,03 mmol	<u>94</u> 230,0 mg 1,69 mmol	3,0 mL	4,5 + 3,0 mL	519 mg
<u>70</u>	<u>84</u> 139,1 mg 0,78 mmol	<u>94</u> 82,0 mg 0,60 mmol	2,1 mL	3,3 + 2,1 mL	378 mg
<u>71</u>	<u>85</u> 244,0 mg 1,37 mmol	<u>94</u> 155,0 mg 1,14 mmol	2,0 mL	3,0 + 2,0 mL	350 mg
<u>72</u>	<u>86</u> 263,0 mg 1,37 mmol	<u>94</u> 155,0 mg 1,14 mmol	2,0 mL	4,5 + 3,0 mL	350 mg
<u>73</u>	<u>87</u> 206,0 mg 1,00 mmol	<u>94</u> 114 mg 0,84 mmol	1,5 mL	2,2 + 1,5 mL	256 mg
<u>74</u>	<u>88</u> 95 mg 0,69 mmol	<u>94</u> 69 mg 0,51 mmol	1,0 mL	1,5 + 1,0 mL	175 mg
<u>75</u>	<u>89</u> 150,0 mg 1,00 mmol	<u>94</u> 103,0 mg 0,84 mmol	1,4 mL	2,1 + 1,4 mL	230 mg
<u>76</u>	<u>90</u> 150,0 mg 0,90 mmol	<u>94</u> 103,0 mg 0,76 mmol	1,4 mL	2,1 + 1,4 mL	230 mg
<u>77</u>	<u>91</u> 125,0 mg 0,69 mmol	<u>94</u> 69,0 mg 0,51 mmol	1,0 mL	1,5 + 1,0 mL	175 mg
<u>78</u>	<u>92</u> 150,0 mg 0,78 mmol	<u>94</u> 90,0 mg 0,65 mmol	1,2 mL	1,8 + 1,2 mL	200 mg
<u>79</u>	<u>83</u> 203,0 mg 1,37 mmol	<u>95</u> 155,0 mg 1,14 mmol	2,0 mL	3,0 + 2,0 mL	350 mg
<u>80</u>	<u>84</u> 244,0 mg 1,37 mmol	<u>95</u> 155,0 mg 1,14 mmol	2,0 mL	3,0 + 2,0 mL	350 mg
<u>81</u>	<u>86</u> 82,0 mg 0,42 mmol	<u>95</u> 80,0 mg 0,35 mmol	0,7 mL	1,0 + 0,7 mL	108 mg
<u>82</u>	<u>93</u> 326,0 mg 1,37 mmol	<u>94</u> 155,0 mg 1,14 mmol	2,0 mL	3,0 + 2,0 mL	350 mg

Os oxadiazóis 69-82 foram sintetizados com rendimentos entre 40 e 79%. A caracterização se deu por determinação experimental dos pontos de fusão, espectrometria no infra-vermelho (IV), espectrometria de massas (EM) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN<sup>1</sup>H) e de carbono treze (RMN<sup>13</sup>C). A **Tabela 13** traz informações quanto aos rendimentos obtidos em cada reação, pontos de fusão e um

resumo dos sinais característicos de RMN<sup>13</sup>C e EM que confirmaram o sucesso da reação.

**Tabela 13.** Massas obtidas, rendimento das reações de formação, pontos de fusão e sinais característicos de RMN<sup>13</sup>C e EM para os oxadiazóis **69-82**.

Oxadiazol	Massa/ Rendimento	Ponto de fusão (°C)	RMN <sup>13</sup> C	EMBR (70eV) (m/z)	EMAR (M+H) <sup>++</sup> % Variação
<b>69</b>	282,7 mg 68%	85-87	170,51 (N=C=N) 163,99 (N=C-O)	248 (M <sup>+</sup> 30%); 129 (50%)	249,1028 0,0002%
<b>70</b>	125,0 mg 75%	88-90	175,19 (N=C=N) 168,74 (N=C-O)	278 (M <sup>+</sup> 100%); 159 (65%)	279,1133 0,0002%
<b>71</b>	128,1 mg 40%	119-121	175,64 (N=C=N) 164,63 (N=C-O)	178 (M <sup>+</sup> 100%); 159 (50%)	279,1133 0,0002%
<b>72</b>	212 mg 64%	157-159	175,44 (N=C=N) 164,63 (N=C-O)	292 (M <sup>+</sup> 100%); 145 (35%)	293,0926 0,0002%
<b>73</b>	178,2 mg 70%	143-145	175,50 (N=C=N) 168,63 (N=C-O)	306 (M <sup>+</sup> 100%); 189 (60%)	307,1083 0,0002%
<b>74</b>	89,6 mg 61%	83-85	175,28 (N=C=N) 168,63 (N=C-O)	238 (M <sup>+</sup> 75%); 119 (100%)	239,0820 0,0002%
<b>75</b>	120,0 mg 57%	93-95	175,02 (N=C=N) 168,70 (N=C-O)	254 (M <sup>+</sup> 90%); 135 (90%)	255,0592 0,0002%
<b>76</b>	110,0 mg 55%	105-107	175,10 (N=C=N) 168,72 (N=C-O)	266 (M <sup>+</sup> 60%); 147 (60%)	267,0934 0,0002%
<b>77</b>	41,5 mg 50%	151-153	174,96 (N=C=N) 168,77 (N=C-O)	282/284 (M <sup>+</sup> 60%/20%); 119 (50%)	283,0638 0,0002%
<b>78</b>	150 mg 79%	205-208	174,25 (N=C=N) 168,99 (N=C-O)	293 (M <sup>+</sup> 75%); 119 (100%)	294,0879 0,0002%
<b>79</b>	282,5 mg 73%	138-140	175,20 (N=C=N) 168,56 (N=C-O)	338 (M <sup>+</sup> 100%); 131 (80%)	339,1345 0,0002%
<b>80</b>	253,0 mg 60%	117-119	175,12 (N=C=N) 168,55 (N=C-O)	368 (M <sup>+</sup> 100%); 161 (60%)	369,1451 0,0002%
<b>81</b>	253,0 mg 60%	177-180	175,39 (N=C=N) 168,47 (N=C-O)	392 (M <sup>+</sup> 100%); 175 (50%)	383,1243 0,0001%
<b>82</b>	135,0 mg 70%	132-135	175,22 (N=C=N) 168,70 (N=C-O)	338 (M <sup>+</sup> 100%); 221 (30%)	339,1358 0,0006%

O detalhamento completo da caracterização dos compostos **69-82** é mostrado a seguir.

## 4.5. Caracterização dos derivados 1,2,4-oxadiazólicos 69-82

### 4.5.1. Derivado 69 (3-fenil-5-[(Z)-2-fenilvinil]-1,2,4-oxadiazol)

Produto isolado como um sólido branco, com 68% de rendimento e P.F. = 85-87°C.

EMBR (IE, 70eV) (m/z): 103(70%); 117(40%); 119(50%); 129(50%); 131(15%); 145(10%); 247 ([M-H]<sup>+</sup>, 100%); 248(M<sup>+</sup>, 30%).

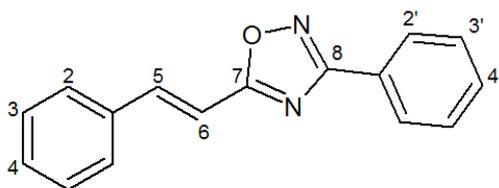
EMAR (ES+) (m/z): 249,1028 ([C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O+1H]<sup>+</sup>, m/z calculado = 249,10224, variação = 0,0002%)

IV (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3028,15-3062,86 cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{C-H}$  (deformação axial ligação C-H, C<sub>aromático</sub>); 1772,53-1965,4 cm<sup>-1</sup>:  $\delta_{Ar}$  (harmônicas de deformação aromática, padrão mono-substituído);  $\nu_{C=C}$  = 1641,37 cm<sup>-1</sup> (deformação axial da ligação dupla vinílica, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{C=N}$  = 1539,15 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente C=N do núcleo oxadiazólico, Csp<sup>2</sup>); 1440,78-1577,72 cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{C=C}$  (vibração do esqueleto aromático);  $\nu_{C-O}$  = 1359,77 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente C-O do núcleo oxadiazólico, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{N-O}$  = 960,52 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente N-O do núcleo oxadiazólico, Nsp<sup>2</sup>); 690,49-908,44 cm<sup>-1</sup>:  $\sigma_{C-H}$  (dobramentos de ligações C-H, C<sub>aromático</sub>),  $\sigma_{C-H}$  = 758 cm<sup>-1</sup> e 690,49 cm<sup>-1</sup> (padrão de substituição do anél aromático, 5H vizinhos, C<sub>aromático</sub>).

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ (ppm): 8,15-8,17 (m, 2H: H<sub>2</sub>); 7,92 (d, J 16 Hz, 1H: H<sub>3</sub>); 7,64-7,66 (m, 2H: H<sub>2</sub>); 7,53-7,56 (m, 3H: H<sub>3</sub>; H<sub>4</sub>); 7,46-7,48 (m, 3H: H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>); 7,11 (d, J 16 Hz, 1H: H<sub>6</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ (ppm): 175,26 (C<sub>8</sub>); 168,74 (C<sub>7</sub>); 142,74 (C<sub>5</sub>); 134,43 (C<sub>1</sub>); 131,19 (C<sub>4</sub>); 130,56 (C<sub>4</sub>); 129,10 (C<sub>2</sub>); 128,88 (C<sub>2</sub>); 127,96 (C<sub>3</sub>); 127,47(C<sub>3</sub>); 126,95 (C<sub>1</sub>); 110,25 (C<sub>6</sub>);

**Tabela 14.** Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C para o oxadiazol **69**.



Posição	Oxadiazol <b>69</b> (CDCl <sub>3</sub> ) 400 MHz	
	$\delta$ H(ppm); J(Hz)	$\delta$ C(ppm)
<b>1</b>	-	134,43 (C)
<b>2</b>	7,64-7,66 (m, 2H)	128,88 (CH)
<b>3</b>	7,46-7,48 (m, 2H)	127,47 (CH)
<b>4</b>	7,46-7,48 (m, 1H)	130,56 (CH)
<b>5</b>	7,92 (d, <i>J</i> 16 Hz, 1H)	142,74 (CH)
<b>6</b>	7,11 (d, <i>J</i> 16 Hz, 1H)	110,25 (CH)
<b>7</b>	-	168,74 (C)
<b>8</b>	-	175,26 (C)
<b>1'</b>	-	126,95 (C)
<b>2'</b>	8,15-8,17 (m, 2H)	129,10 (CH)
<b>3'</b>	7,53-7,56 (m, 2H)	127,96 (CH)
<b>4'</b>	7,53-7,56 (m, 1H)	131,19 (CH)

#### 4.5.2. Derivado **70** (5-[(Z)-2-(3-metóxfenil)vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol)

Produto isolado como um sólido branco, com 75% de rendimento e P.F. = 88-90°C.

EMBR (IE, 70eV) (m/z): 103(25%); 117(10%); 119(10%); 133(20%); 159(65%); 161(30%); 175 (65%); 278(M<sup>+</sup>, 100%).

EMAR (ES+) (m/z): 279,1133 ([C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+1H]<sup>+</sup>, m/z calculado = 279,11280, variação = 0,0002%)

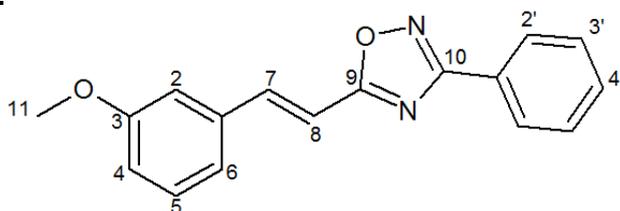
IV (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3010,79-3084,08 cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{C-H}$  (deformação axial ligação C-H, C<sub>aromático</sub>); 2835,27-2956,78 cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{C-H}$  (deformação axial ligação C-H, Csp<sup>3</sup>);  $\nu_{C=C}$  = 1637,51 cm<sup>-1</sup> (deformação axial da ligação dupla vinílica, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{C=N}$  = 1556,51 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente C=N do núcleo oxadiazólico, Csp<sup>2</sup>); 1442,71-1606,65 cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{C=C}$  (vibração do esqueleto aromático);  $\nu_{C-O}$  = 1363,63 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente C-O do núcleo oxadiazólico, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{Ar-OCH_3}$  = 1265,26 cm<sup>-1</sup> (vibração da ligação C-O do grupo metoxila com anel aromático, C<sub>aromático</sub>);  $\nu_{C-O}$  = 1049,24 cm<sup>-1</sup> (vibração da ligação C-O do grupo metoxila, Csp<sup>3</sup>);  $\nu_{N-O}$  = 966,31 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente N-O do núcleo oxadiazólico, Nsp<sup>2</sup>); 694,35-918 cm<sup>-1</sup>:  $\sigma_{C-H}$  (dobramentos de ligações C-H no anel aromático, C<sub>aromático</sub>);  $\sigma_{C-H}$  = 918 cm<sup>-1</sup>

(dobramento de C-H no anel aromático, 1H isolado,  $C_{\text{aromático}}$ );  $\sigma_{\text{C-H}} = 839,01\text{cm}^{-1}$   
(dobramento de C-H no anel aromático, 2H vizinhos,  $C_{\text{aromático}}$ );  $\sigma_{\text{C-H}} = 775,36\text{cm}^{-1}$   
(dobramento de C-H no anel aromático, 3H vizinhos,  $C_{\text{aromático}}$ );  $\sigma_{\text{C-H}} = 738,71\text{cm}^{-1}$  e  
 $694,35\text{cm}^{-1}$  (dobramento de C-H no anel aromático, 5H vizinhos,  $C_{\text{aromático}}$ ).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta(\text{ppm})$ : 8,15 (dd,  $J_1$  2Hz,  $J_2$  8Hz, 2H:  $\text{H}_2$ ); 7,89 (d,  $J$  15 Hz, 1H:  $\text{H}_7$ ); 7,51-7,55 (m, 3H:  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_4$ ); 7,38 (t,  $J$  8Hz, 1H:  $\text{H}_5$ ); 7,24 (dd,  $J_1$  8 Hz,  $J_2$  2Hz, 1H:  $\text{H}_6$ ); 7,15 (t,  $J$  2Hz, 1H:  $\text{H}_2$ ); 7,09 (d,  $J$  15Hz, 1H:  $\text{H}_8$ ); 7,00 (dd,  $J_1$  8Hz,  $J_2$  2Hz, 1H:  $\text{H}_4$ ); 3,89 (s, 3H:  $\text{H}_{11}$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta(\text{ppm})$ : 175,19 ( $\text{C}_{10}$ ); 168,74 ( $\text{C}_9$ ); 160,03 ( $\text{C}_3$ ); 142,65 ( $\text{C}_7$ ); 135,77 ( $\text{C}_{1'}$ ); 131,19 ( $\text{C}_4'$ ); 130,10 ( $\text{C}_5$ ); 128,88 ( $\text{C}_2'$ ); 127,46 ( $\text{C}_3'$ ); 126,92 ( $\text{C}_1$ ); 120,63 ( $\text{C}_2$ ); 116,41 ( $\text{C}_6$ ); 112,83 ( $\text{C}_4$ ); 110,53 ( $\text{C}_8$ ); 55,37 ( $\text{C}_{11}$ ).

**Tabela 15.** Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN $^1\text{H}$  e RMN $^{13}\text{C}$  para o oxadiazol **70**.



Posição	Oxadiazol <b>70</b> ( $\text{CDCl}_3$ ) 400 MHz	
	$\delta\text{H}(\text{ppm}); J(\text{Hz})$	$\delta\text{C}(\text{ppm})$
<b>1</b>	-	126,92 (C)
<b>2</b>	7,15 (t, $J$ 2Hz, 1H)	120,63 (CH)
<b>3</b>	-	160,03 (C)
<b>4</b>	7,00 (dd, $J_1$ 8Hz, $J_2$ 2Hz, 1H)	112,83 (CH)
<b>5</b>	7,38 (t, $J$ 8Hz, 1H)	130,10 (CH)
<b>6</b>	7,24 (dd, $J_1$ 8 Hz, $J_2$ 2Hz, 1H)	116,41 (CH)
<b>7</b>	7,88 (d, $J$ 15 Hz, 1H)	142,65 (CH)
<b>8</b>	7,09 (d, $J$ 15Hz, 1H)	110,53 (CH)
<b>9</b>	-	168,74 (C)
<b>10</b>	-	175,19 (C)
<b>11</b>	3,89(s, 3H)	55,37 ( $\text{CH}_3$ )
<b>1'</b>	-	135,77 (C)
<b>2'</b>	8,15 (dd, $J_1$ 2Hz, $J_2$ 8Hz 2H)	128,88 (CH)
<b>3'</b>	7,51-7,55 (m, 2H)	127,46 (CH)
<b>4'</b>	7,51-7,55 (m, 1H)	131,19 (CH)

#### 4.5.3. Derivado 71 (5-[(Z)-2-(4-metóxfenil)vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol)

Produto isolado como um sólido branco, com 68% de rendimento e P.F. = 119-121°C.

EMBR (IE, 70eV) (m/z): 103(30%); 117(10%); 119(5%); 133(50%); 159(60%); 161(50%); 175(5%); 278(M<sup>+</sup>, 100%).

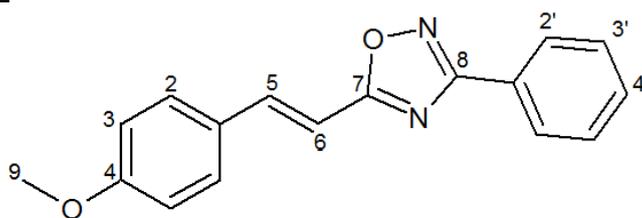
EMAR (ES+) (m/z): 279,1133 ([C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+1H]<sup>+</sup>, m/z calculado = 279,11280, variação = 0,0002%)

IV (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3005,71-3069,35 cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{C-H}$  (deformação axial ligação C-H, C<sub>aromático</sub>); 2840,82-2972,92 cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{C-H}$  (deformação axial ligação C-H, Csp<sup>3</sup>);  $\nu_{C=C}$  = 1639,3 cm<sup>-1</sup> (deformação axial da ligação dupla vinílica, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{C=N}$  = 1537,09 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente do núcleo oxadiazólico, Csp<sup>2</sup>); 1441,62-1599,77 cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{C=C}$  (vibração do esqueleto aromático);  $\nu_{C-O}$  = 1361,59 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente C-O do núcleo oxadiazólico, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{Ph-OCH_3}$  = 1245,87 cm<sup>-1</sup> (vibração da ligação C-O do grupo metoxila com anel aromático, C<sub>aromático</sub>);  $\nu_{N-O}$  = 966,22 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente N-O do núcleo oxadiazólico, Nsp<sup>2</sup>); 690,44-822,54 cm<sup>-1</sup>:  $\sigma_{C-H}$  (dobramentos de ligações C-H no anel aromático, C<sub>aromático</sub>);  $\sigma_{C-H}$  = 822,54 cm<sup>-1</sup> (dobramento de C-H no anel aromático, 2H vizinhos, C<sub>aromático</sub>);  $\sigma_{C-H}$  = 741,54 cm<sup>-1</sup> e 690,44 cm<sup>-1</sup> (dobramento de C-H no anel aromático, 5H vizinhos, C<sub>aromático</sub>).

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ (ppm): 8,14-8,16 (m, 2H: H<sub>2</sub>); 7,87 (d, *J* 15 Hz, 1H: H<sub>7</sub>); 7,51-7,54 (m, 3H: H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>); 7,145 (d, *J* 2Hz, 1H: H<sub>2</sub>); 7,12 (dd, *J*<sub>1</sub> 8 Hz, *J*<sub>2</sub> 2 Hz, 1H: H<sub>6</sub>); 6,91 (d, *J* 15 Hz, 1H: H<sub>8</sub>); 6,885 (d, *J* 8 Hz, 1H: H<sub>5</sub>); 6,06 (s, 2H, H<sub>11</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ (ppm): 175,44 (C<sub>10</sub>); 164,63 (C<sub>9</sub>); 149,88 (C<sub>4</sub>); 148,56 (C<sub>3</sub>); 142,37 (C<sub>7</sub>); 131,13 (C<sub>4'</sub>); 128,91 (C<sub>1'</sub>); 128,85 (C<sub>2'</sub>); 127,44 (C<sub>3'</sub>); 127,01 (C<sub>1</sub>); 124,53 (C<sub>6</sub>); 108,74 (C<sub>2</sub>); 108,20 (C<sub>5</sub>); 106,22 (C<sub>8</sub>); 101,70 (C<sub>11</sub>).

**Tabela 16.** Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C para o oxadiazol **71**.



Posição	Oxadiazol <b>71</b> (CDCl <sub>3</sub> ) 400 MHz	
	$\delta$ H(ppm); J(Hz)	$\delta$ C(ppm)
1	-	127,06 (C)
2	7,595 (d, <i>J</i> 5 Hz, 2H)	129,65 (CH)
3	6,985 (d, <i>J</i> 5 Hz, 2H)	114,54 (CH)
4	-	161,60 (C)
5	7,87 (d, <i>J</i> 15 Hz, 1H)	142,37 (CH)
6	6,96 (d, <i>J</i> 15 Hz, 1H)	107,75 (CH)
7	-	164,63 (C)
8	-	175,64 (C)
9	3,89 (s, 3H)	55,46 (CH <sub>3</sub> )
1'	-	127,19 (C)
2'	8,14-8,16 (m, 2H)	128,86 (CH)
3'	7,52-7,54 (m, 2H)	127,44 (CH)
4'	7,52-7,54 (m, 1H)	131,11 (CH)

#### 4.5.4. Derivado **72** (5-[(*E*)-2-(1,3-benzodioxan-5-il)vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol)

Produto isolado como um sólido branco, com 64% de rendimento e P.F. = 157-159°C.

EMBR (IE, 70eV) (m/z): 103(10%); 117(10%); 117(25%); 145(35%); 172(45%); 292(M<sup>+</sup>, 100%).

EMAR (ES+) (m/z): 293,0926 ([C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+1H]<sup>+</sup>, m/z calculado = 293,09207, variação = 0,0002%)

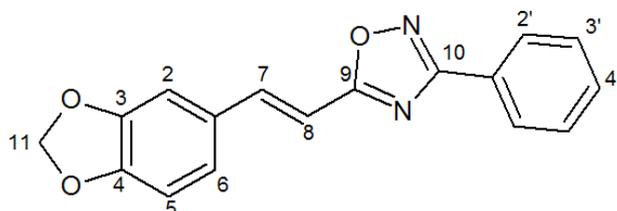
IV (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3021,14-3066,46 cm<sup>-1</sup> :  $\nu_{C-H}$  (deformação axial ligação C-H, C<sub>aromático</sub>); 2850,46-2950,74 cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{C-H}$  (deformação axial ligação C-H, Csp<sup>3</sup>);  $\nu_{C=C}$  = 1635,45 cm<sup>-1</sup> (deformação axial da ligação dupla vinílica, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{C=N}$  = 1553,48 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente C=N do núcleo oxadiazólico, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{C=C}$  = 1441,62-1596,87 cm<sup>-1</sup> (vibração do esqueleto aromático, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{C-O}$  = 1349,05 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente C-O do núcleo oxadiazólico, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{Ar-OCH_2}$  = 1245,87 cm<sup>-1</sup> (vibração da ligação C-O do ciclo dioxano com anel aromático, C<sub>aromático</sub>);  $\nu_{C-O}$  = 1032,76 cm<sup>-1</sup> (vibração da ligação C-O do ciclo dioxano, Csp<sup>3</sup>);  $\nu_{N-O}$  = 967,19 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente N-O do núcleo oxadiazólico, Nsp<sup>2</sup>); 685,61-

921,87  $\text{cm}^{-1}$ :  $\sigma_{\text{C-H}}$  (dobramentos de ligações C-H no anel aromático,  $\text{C}_{\text{aromático}}$ );  $\sigma_{\text{C-H}} = 921,87 \text{ cm}^{-1}$  (dobramento de C-H no anel aromático, 1H isolado,  $\text{C}_{\text{aromático}}$ );  $\sigma_{\text{C-H}} = 816,76 \text{ cm}^{-1}$  (dobramento de C-H no anel aromático, 2H vizinhos,  $\text{C}_{\text{aromático}}$ );  $\sigma_{\text{C-H}} = 737,69 \text{ cm}^{-1}$  e  $685,61 \text{ cm}^{-1}$  (dobramento de C-H no anel aromático, 5H vizinhos,  $\text{C}_{\text{aromático}}$ ).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ (ppm): 8,13-8,15 (m, 2H:  $\text{H}_2$ ); 7,815 (d,  $J$  15 Hz, 1H:  $\text{H}_7$ ); 7,51-7,54 (m, 3H:  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_4$ ); 7,145 (d,  $J$  2Hz, 1H:  $\text{H}_2$ ); 7,12 (dd,  $J_1$  8 Hz,  $J_2$  2 Hz, 1H:  $\text{H}_6$ ); 6,91 (d,  $J$  15 Hz, 1H:  $\text{H}_8$ ); 6,885 (d,  $J$  8 Hz, 1H:  $\text{H}_5$ ); 6,06 (s, 2H,  $\text{H}_{11}$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ (ppm): 175,44 ( $\text{C}_{10}$ ); 164,63 ( $\text{C}_9$ ); 149,88 ( $\text{C}_4$ ); 148,56 ( $\text{C}_3$ ); 142,37 ( $\text{C}_7$ ); 131,13 ( $\text{C}_4'$ ); 128,91 ( $\text{C}_{1'}$ ); 128,85 ( $\text{C}_2'$ ); 127,44 ( $\text{C}_3'$ ); 127,01 ( $\text{C}_1$ ); 124,53 ( $\text{C}_6$ ); 108,74 ( $\text{C}_2$ ); 108,20 ( $\text{C}_5$ ); 106,22 ( $\text{C}_8$ ); 101,70 ( $\text{C}_{11}$ ).

**Tabela 17.** Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN $^1\text{H}$  e RMN $^{13}\text{C}$  para o oxadiazol **72**.



Posição	Oxadiazol <b>72</b> ( $\text{CDCl}_3$ ) 400 MHz	
	$\delta\text{H}(\text{ppm}); J(\text{Hz})$	$\delta\text{C}(\text{ppm})$
<b>1</b>	-	127,01 (C)
<b>2</b>	7,145 (d, $J$ 2Hz, 1H)	108,74 (CH)
<b>3</b>	-	148,56 (C)
<b>4</b>	-	149,88 (C)
<b>5</b>	6,885 (d, $J$ 8 Hz, 1H)	108,20 (CH)
<b>6</b>	7,12 (dd, $J_1$ 8 Hz, $J_2$ 2 Hz, 1H)	124,53 (CH)
<b>7</b>	7,815 (d, $J$ 15 Hz, 1H)	142,37 (CH)
<b>8</b>	6,91 (d, $J$ 15 Hz, 1H)	106,22 (CH)
<b>9</b>	-	164,63 (C)
<b>10</b>	-	175,44 (C)
<b>11</b>	6,06 (s, 2H)	101,70 ( $\text{CH}_2$ )
<b>1'</b>	-	128,91 (C)
<b>2'</b>	8,13-8,15 (m, 2H)	128,85 (CH)
<b>3'</b>	7,51-7,54 (m, 2H)	127,44 (CH)
<b>4'</b>	7,51-7,54 (m, 1H)	131,13 (CH)

#### 4.5.5. Derivado **73** (5-[(*E*)-2-(2,3-benzodioxin-6-il)vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol):

Produto isolado como um sólido branco, com 68% de rendimento e P.F. = 143-145°C.

EMBR (IE, 70eV) (m/z): 103(45%); 117(25%); 119(35%); 161(45%); 187(50%); 189(60%); 306(M<sup>+</sup>, 100%).

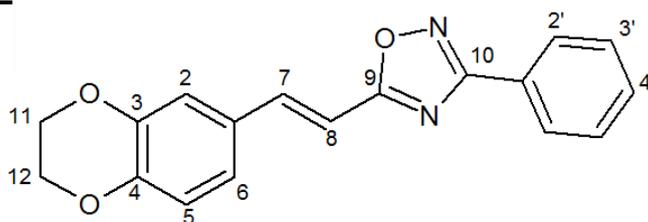
EMAR (ES+) (m/z): 307,1083 ([C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+1H]<sup>+</sup>, m/z calculado = 307,10772, variação = 0,0002%)

IV (KBr) cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{C-H}$  (Csp<sup>2</sup>) = 3040,52-3058,75 cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{C-H}$  (deformação axial ligação C-H, C<sub>aromático</sub>); 2876,49-2978,71 cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{C-H}$  (deformação axial ligação C-H, Csp<sup>3</sup>);  $\nu_{C=C}$  = 1644,12 cm<sup>-1</sup> (deformação axial da ligação dupla vinílica, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{C=N}$  = 1538,05 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente C=N do núcleo oxadiazólico, Csp<sup>2</sup>); 1443,55-1604,59 cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{C=C}$  (vibração do esqueleto aromático);  $\nu_{C-O}$  = 1360,62 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente C-O do núcleo oxadiazólico, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{Ar-OCH_2}$  = 1284,44 cm<sup>-1</sup> e 1244,91 cm<sup>-1</sup> (vibração das ligações C-O do ciclo dioxano com anel aromático, C<sub>aromático</sub>);  $\nu_{C-O}$  = 1057,83 cm<sup>-1</sup> (vibração de ligação C-O do ciclo dioxano, Csp<sup>3</sup>);  $\nu_{N-O}$  = 980,69 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente N-O do núcleo oxadiazólico, Nsp<sup>2</sup>); 691,4-918,01 cm<sup>-1</sup>:  $\sigma_{C-H}$  (dobramentos de ligações C-H no anel aromático, C<sub>aromático</sub>);  $\sigma_{C-H}$  = 918,01 cm<sup>-1</sup> (dobramento de C-H no anel aromático, 1H isolado, C<sub>aromático</sub>);  $\sigma_{C-H}$  = 809,04 cm<sup>-1</sup> (dobramento de C-H no anel aromático, 2H vizinhos, C<sub>aromático</sub>);  $\sigma_{C-H}$  = 738,65 cm<sup>-1</sup> e 691,4 cm<sup>-1</sup> (dobramento de C-H no anel aromático, 5H vizinhos, C<sub>aromático</sub>).

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ (ppm): 8,14-8,15 (m, 2H: H<sub>2</sub>); 7,795 (d, *J* 15 Hz, 1H: H<sub>7</sub>); 7,51-7,54 (m, 3H: H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>); 7,17 (d, *J* 2Hz, 1H: H<sub>2</sub>); 7,15 (dd, *J*<sub>1</sub> 8 Hz, *J*<sub>2</sub> 2 Hz, 1H: H<sub>6</sub>); 6,925 (d, *J* 15 Hz, 1H: H<sub>8</sub>); 6,92 (d, *J*<sub>1</sub> 8 Hz, 1H: H<sub>5</sub>); 4,32 (m, 4H: H<sub>11</sub>, H<sub>12</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ (ppm): 175,50 (C<sub>10</sub>); 168,63 (C<sub>9</sub>); 145,92 (C<sub>4</sub>); 143,85 (C<sub>3</sub>); 142,29 (C<sub>7</sub>); 131,12 (C<sub>4'</sub>); 128,85 (C<sub>2'</sub>); 128,12 (C<sub>1'</sub>); 127,44 (C<sub>3'</sub>); 127,03 (C<sub>1</sub>); 121,99 (C<sub>6</sub>); 117,90 (C<sub>2</sub>); 116,55 (C<sub>5</sub>); 108,36 (C<sub>8</sub>); 64,60 (C<sub>11</sub>); 64,24 (C<sub>12</sub>).

**Tabela 18.** Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C para o oxadiazol **73**.



Posição	Oxadiazol <b>73</b> (CDCl <sub>3</sub> ) 400 MHz	
	$\delta\text{H}(\text{ppm}); J(\text{Hz})$	$\delta\text{C}(\text{ppm})$
1	-	127,03 (C)
2	7,17 (d, $J$ 2Hz, 1H)	117,90 (CH)
3	-	143,85 (C)
4	-	145,92 (C)
5	6,92 (d, $J$ 8 Hz, 1H)	116,55 (CH)
6	7,15 (dd, $J_1$ 8 Hz, $J_2$ 2 Hz, 1H)	121,99 (CH)
7	7,795 (d, $J$ 15 Hz, 1H)	142,29 (CH)
8	6,925 (d, $J$ 15 Hz, 1H)	108,36 (CH)
9	-	168,63 (C)
10	-	175,50 (C)
11	4,32 (m, 2H)	64,60 (CH <sub>2</sub> )
12	4,32 (m, 2H)	64,24 (CH <sub>2</sub> )
1'	-	128,12 (C)
2'	8,14-8,15 (m, 2H)	128,85 (CH)
3'	7,51-7,54 (m, 2H)	127,44 (CH)
4'	7,51-7,54 (m, 1H)	131,12 (CH)

#### 4.5.6. Derivado **74** (5-[(*E*)-2(furan-2-il)-vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol)

Produto isolado como um sólido marrom, com 61% de rendimento e P.F. = 83-85°C.

EMBR (IE, 70eV) (m/z): 103(15%); 119 (100%); 121(40%); 135(5%); 238(M<sup>+</sup>, 75%).

EMAR (ES+) (m/z): 239,0820 ([C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+1H]<sup>+</sup>, m/z calculado = 239,08150, variação = 0,0002%)

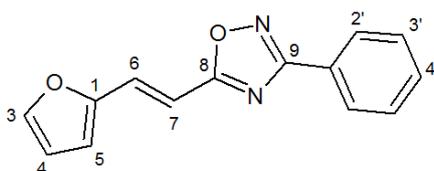
IV (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3066,72-3124,59 cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{\text{C-H}}$  (deformação axial ligação C-H, C<sub>aromático</sub>);  $\nu_{\text{C=C}}$  (Csp<sup>2</sup>) = 1641,37 cm<sup>-1</sup> (deformação axial da ligação dupla vinílica, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{\text{C=N}}$  = 1527,58 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente C=N do núcleo oxadiazólico, Csp<sup>2</sup>); 1442,71-1583,51 cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{\text{C=C}}$  (vibração do esqueleto aromático);  $\nu_{\text{C-O}}$  = 1359,77 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente C-O do núcleo oxadiazólico, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{\text{C-O}}$  = 1261,41 cm<sup>-1</sup> e 1290,34 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de ligação C-O do ciclo furano, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{\text{N-O}}$  = 958,59 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente do núcleo oxadiazólico);  $\sigma_{\text{C-H}}$  (Csp<sup>2</sup>) = 694,35-925,80 cm<sup>-1</sup> (dobramentos de ligações C-H em anel

aromático,  $C_{\text{aromático}}$ );  $\sigma_{\text{C-H}} (C_{\text{sp}^2}) = 694,35 \text{ cm}^{-1}$  e  $738,71 \text{ cm}^{-1}$  (dobramento de C-H no anel aromático, 5H vizinhos,  $C_{\text{aromático}}$ ).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta(\text{ppm})$ : 8,13-8,15 (m, 2H:  $\text{H}_2$ ); 7,65 (d,  $J$  15 Hz, 1H:  $\text{H}_6$ ); 7,575 (d,  $J$  5Hz, 1H:  $\text{H}_3$ ); 7,49,-7,53 (m, 3H:  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_4$ ); 6,97 (d,  $J$  15 Hz, 1H:  $\text{H}_7$ ); 6,725 (d,  $J$  5 Hz, 1H:  $\text{H}_5$ ); 6,55 (t,  $J$  5Hz, 1H:  $\text{H}_4$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta(\text{ppm})$ : 175,28 ( $\text{C}_9$ ); 168,63 ( $\text{C}_8$ ); 150,80 ( $\text{C}_1$ ); 145,14 ( $\text{C}_6$ ); 131,15 ( $\text{C}_3$ ); 128,86 ( $\text{C}_2'$ ); 128,82 ( $\text{C}_4'$ ); 127,44 ( $\text{C}_3'$ ); 126,97 ( $\text{C}_1'$ ); 115,22 ( $\text{C}_5$ ); 112,59 ( $\text{C}_4$ ); 107,85 ( $\text{C}_7$ ).

**Tabela 19.** Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN $^1\text{H}$  e RMN $^{13}\text{C}$  para o oxadiazol **74**.



Posição	Oxadiazol <b>74</b> ( $\text{CDCl}_3$ ) 400 MHz	
	$\delta\text{H}(\text{ppm}); J(\text{Hz})$	$\delta\text{C}(\text{ppm})$
1	-	150,80 (C)
3	7,575 (d, $J$ 5Hz, 1H)	131,15 (CH)
4	6,55 (t, $J$ 5Hz, 1H)	112,59 (CH)
5	6,725 (d, $J$ 5 Hz, 1H)	115,22 (CH)
6	7,65 (d, $J$ 15 Hz, 1H)	145,14 (CH)
7	6,97 (d, $J$ 15 Hz, 1H)	107,85 (CH)
8	-	168,63 (C)
9	-	175,28 (C)
1'	-	126,97 (C)
2'	8,13-8,15 (m, 2H)	128,86 (CH)
3'	7,49,-7,53 (m, 2H)	127,44 (CH)
4'	7,49,-7,53 (m, 1H)	128,82 (CH)

#### 4.5.7. Derivado **75** (5-[(*E*)-2(tiofen-2-il)-vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol)

Produto isolado como um sólido amarelo, com 57% de rendimento e P.F. = 93-95°C.

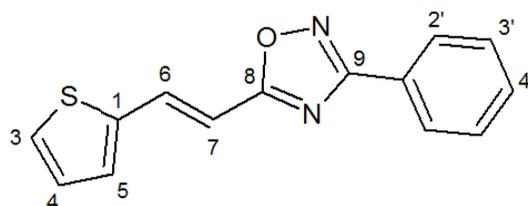
EMBR (IE, 70eV) (m/z): 103(10%); 109(50%); 119(15%); 135(90%); 137(50%); 151(20%); 254( $\text{M}^+$ , 90%).

EMAR (ES+) (m/z): 255,0592 ( $[\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{OS}+1\text{H}]^+$ , m/z calculado = 255,05866, variação = 0,0002%)

IV (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3059,01-3097,58  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu_{\text{C-H}}$  (deformação axial ligação C-H,  $\text{C}_{\text{aromático}}$ );  $\nu_{\text{C=C}} = 1635,59 \text{ cm}^{-1}$  (deformação axial da ligação dupla vinílica,  $\text{Csp}^2$ );  $\nu_{\text{C=N}} = 1552,65 \text{ cm}^{-1}$  (vibração característica de componente C=N do núcleo oxadiazólico,  $\text{Csp}^2$ ); 1444,64-1502,5  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu_{\text{C=C}}$  (vibração do esqueleto aromático);  $\nu_{\text{C-O}} = 1359,77 \text{ cm}^{-1}$  (vibração característica de componente C-O do núcleo oxadiazólico,  $\text{Csp}^2$ );  $\nu_{\text{N-O}} = 956,66 \text{ cm}^{-1}$  (vibração característica de componente N-O do núcleo oxadiazólico,  $\text{Nsp}^2$ ); 690,49-856,37  $\text{cm}^{-1}$ :  $\sigma_{\text{C-H}}$  (dobramentos de ligações C-H no anel aromático,  $\text{C}_{\text{aromático}}$ );  $\sigma_{\text{C-H}} (\text{Csp}^2) = 690,49 \text{ cm}^{-1}$  e  $711,71 \text{ cm}^{-1}$  (dobramento de C-H no anel aromático, 5H vizinhos,  $\text{C}_{\text{aromático}}$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ (ppm): 175,02 ( $\text{C}_9$ ); 168,70 ( $\text{C}_8$ ); 139,07 ( $\text{C}_1$ ); 135,12 ( $\text{C}_6$ ); 131,16 ( $\text{C}_3$ ); 131,03 ( $\text{C}_4$ ); 128,86 ( $\text{C}_5$ ); 128,86 ( $\text{C}_2$ ); 128,82 ( $\text{C}_4$ ); 127,44 ( $\text{C}_3$ ); 126,97 ( $\text{C}_1$ ); 108,99 ( $\text{C}_7$ ).

**Tabela 20.** Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN $^1\text{H}$  e RMN $^{13}\text{C}$  para o oxadiazol 75.



Posição	Oxadiazol <u>75</u> ( $\text{CDCl}_3$ ) 400 MHz	
	$\delta\text{H}(\text{ppm}); J(\text{Hz})$	$\delta\text{C}(\text{ppm})$
1	-	139,07 (C)
3	7,465 (d, $J$ 5 Hz, 1H)	131,16 (CH)
4	7,13 (t, $J$ 5Hz, 1H)	128,82 (CH)
5	7,375 (d, $J$ 5 Hz, 1H)	128,86 (CH)
6	8,015 (d, $J$ 15 Hz, 1H)	135,12 (CH)
7	6,885 (d, $J$ 15 Hz, 1H)	108,99 (CH)
8	-	168,70 (C)
9	-	175,02 (C)
1'	-	126,97 (C)
2'	8,14-8,16 (m, 2H)	128,86 (CH)
3'	7,51-7,54 (m, 2H)	127,44 (CH)
4'	7,51-7,54 (m, 1H)	131,03 (CH)

#### 4.5.8. Derivado **76** (5-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol)

Produto isolado como um sólido branco, com 55% de rendimento e P.F. = 105-107°C.

EMBR (IE, 70eV) (m/z): 119(50%); 121(25%); 147(60%); 149(20%); 163(5%); 266(M<sup>+</sup>, 50%).

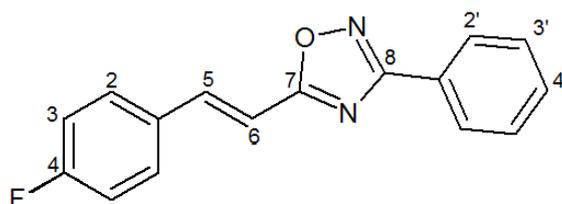
EMAR (ES+) (m/z): 267,0934 ([C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>FN<sub>2</sub>O+1H]<sup>+</sup>, m/z calculado = 267,09282, variação = 0,0002%)

IV (KBr) cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{C-H} = 3049,36 \text{ cm}^{-1}$  (deformação axial ligação C-H, C<sub>aromático</sub>);  $\nu_{C=C} = 1643,3 \text{ cm}^{-1}$  (deformação axial da ligação dupla vinílica, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{C=N} = 1544,93 \text{ cm}^{-1}$  (vibração característica de componente C=N do núcleo oxadiazólico, Csp<sup>2</sup>); 1442,71-1595,08 cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{C=C}$  (vibração do esqueleto aromático);  $\nu_{C-O} = 1359,77 \text{ cm}^{-1}$  (vibração característica de componente C-O do núcleo oxadiazólico, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{C-F} = 1224,76 \text{ cm}^{-1}$  (vibração axial da ligação C-F, C<sub>aromático</sub>);  $\nu_{N-O} = 974,02 \text{ cm}^{-1}$  (vibração característica de componente N-O do núcleo oxadiazólico, Nsp<sup>2</sup>); 688,57-823,58 cm<sup>-1</sup>:  $\sigma_{C-H}$  (dobramentos de ligações C-H no anel aromático, C<sub>aromático</sub>);  $\sigma_{C-H} = 823,58 \text{ cm}^{-1}$  (dobramento de C-H no anel aromático, 2H vizinhos, C<sub>aromático</sub>);  $\sigma_{C-H}(\text{Csp}^2) = 688,57 \text{ cm}^{-1}$  e  $702,07 \text{ cm}^{-1}$  (dobramento de C-H no anel aromático, 5H vizinhos, C<sub>aromático</sub>).

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ (ppm): 8,14-8,16 (m, 2H: H<sub>2</sub>); 7,88 (d, *J* 15 Hz, 1H: H<sub>5</sub>); 7,62-7,65 (dd, *J*<sup>H-F</sup><sub>orto</sub> 8Hz, *J*<sup>H-H</sup> 5Hz, 2H: H<sub>2</sub>); 7,52-7,54 (m, 3H: H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>); 7,16 (dd, *J*<sup>H-F</sup><sub>meta</sub> 5Hz, *J*<sup>H-H</sup> 5Hz, 2H: H<sub>3</sub>); 7,02 (d, *J* 15 Hz, 1H: H<sub>6</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ (ppm): 175,10 (C<sub>8</sub>); 168,72 (C<sub>7</sub>); 164,03 (d, *J*<sup>C-F</sup> 275Hz, C<sub>4</sub>); 141,39 (C<sub>5</sub>); 131,22 (C<sub>4</sub>); 130,685 (d, *J*<sup>C-F</sup> 3Hz, C<sub>1</sub>); 129,845 (d, *J*<sup>C-F</sup> 12Hz, C<sub>2</sub>); 128,89 (C<sub>2</sub>); 127,45 (C<sub>3</sub>); 126,87 (C<sub>1</sub>); 116,29 (d, *J*<sup>C-F</sup> 22Hz, C<sub>3</sub>); 107,75 (C<sub>6</sub>).

**Tabela 21.** Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C para o oxadiazol **76**.



Posição	Oxadiazol <b>76</b> (CDCl <sub>3</sub> ) 400 MHz	
	$\delta$ H(ppm); J(Hz)	$\delta$ C(ppm)
1	-	130,69 (d, $J^{C-F}$ 3Hz, C)
2	7,595 (d, $J$ 5 Hz, 2H)	129,85 (d, $J^{C-F}$ 9Hz, CH)
3	6,985 (d, $J$ 5 Hz, 2H)	116,29 (d, $J^{C-F}$ 22Hz, CH)
4	-	164,03 (d, $J^{C-F}$ 250Hz, C)
5	7,87 (d, $J$ 15 Hz, 1H)	141,39 (CH)
6	6,96 (d, $J$ 15 Hz, 1H)	107,75 (CH)
7	-	168,72 (C)
8	-	175,10 (C)
1'	-	126,87 (C)
2'	8,14-8,16 (m, 2H)	128,89 (CH)
3'	7,52-7,54 (m, 2H)	127,45 (CH)
4'	7,52-7,54 (m, 1H)	131,22 (CH)

#### 4.5.9. Derivado **77** (5-[(*E*)-2-(4-clorofenil)vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol)

Produto isolado como um sólido branco, com 50% de rendimento e P.F. = 151-153°C.

EMBR (IE, 70eV) (m/z): 103(15%); 119(50%); 163(40%); 165(30%); 167(5%); 282/284(M<sup>+</sup>, 60%/20%).

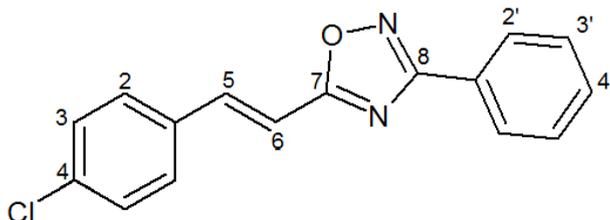
EMAR (ES+) (m/z): 283,0638 ([C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O+1H]<sup>+</sup>, m/z calculado = 283,06327, variação = 0,0002%)

IV (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3037,79-3060,94cm<sup>-1</sup> (deformação axial ligação C-H, C<sub>aromático</sub>);  $\nu_{C=C}$  = 1645,23 cm<sup>-1</sup> (deformação axial da ligação dupla vinílica, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{C=N}$  = 1543,01 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente do núcleo oxadiazólico); 1444,64-1571,94 cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{C=C}$  (vibração do esqueleto aromático);  $\nu_{C-O}$  = 1361,7 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente C-O do núcleo oxadiazólico, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{N-O}$  = 975,95cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente N-O do núcleo oxadiazólico, Nsp<sup>2</sup>);  $\sigma_{C-Cl}$  = 815,86 cm<sup>-1</sup> (vibração axial da ligação C-Cl, C<sub>aromático</sub>); 692,42-912,3 cm<sup>-1</sup>:  $\sigma_{C-H}$  (dobramentos de ligações C-H no anel aromático, C<sub>aromático</sub>);  $\sigma_{C-H}$  (Csp<sup>2</sup>) = 692,42 cm<sup>-1</sup> e 705,92 cm<sup>-1</sup> (dobramento de C-H no anel aromático, 5H vizinhos, C<sub>aromático</sub>).

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>), δ(ppm): 8,14-8,15 (m, 2H: H<sub>2</sub>); 7,86 (d, *J* 15 Hz, 1H: H<sub>5</sub>); 7,52-7,58 (m, 5H: H<sub>3</sub>, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>); 7,44 (d, *J* 8 Hz, 2H: H<sub>2</sub>); 7,07 (d, *J* 15 Hz, 1H: H<sub>6</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>), δ(ppm): 174,96 (C<sub>8</sub>); 168,77 (C<sub>7</sub>); 141,23 (C<sub>5</sub>); 136,49 (C<sub>4</sub>); 132,90 (C<sub>1'</sub>); 131,24 (C<sub>4'</sub>); 129,39 (C<sub>2</sub>); 129,08 (C<sub>2'</sub>); 128,90 (C<sub>3</sub>); 127,45 (C<sub>3'</sub>); 126,84 (C<sub>1</sub>); 110,77 (C<sub>6</sub>).

**Tabela 22.** Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C para o oxadiazol **77**.



Posição	Oxadiazol <b>77</b> (CDCl <sub>3</sub> ) 400 MHz	
	δH(ppm); J(Hz)	δC(ppm)
1	-	126,84(C)
2	7,44 (d, <i>J</i> 8 Hz, 2H)	129,39 (CH)
3	7,52-7,58 (m, 2H)	128,90 (CH)
4	-	136,49 (C)
5	7,86 (d, <i>J</i> 15 Hz, 1H)	141,23 (CH)
6	7,07 (d, <i>J</i> 15 Hz, 1H)	110,77(CH)
7	-	168,77 (C)
8	-	174,96 (C)
1'	-	132,90 (C)
2'	8,14-8,15 (m, 2H)	129,08 (CH)
3'	7,52-7,58 (m, 2H)	127,45 (CH)
4'	7,52-7,58 (m, 1H)	131,24 (CH)

#### 4.5.10. Derivado **78** (5-[(*E*)-2-(4-nitrofenil)vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol)

Produto isolado como um sólido amarelo, com 79% de rendimento e P.F. = 205-208°C.

EMBR (IE, 70eV) (m/z): 91(60%); 119(100%); 173(40%); 246(30%); 293(M<sup>+</sup>, 80%).

EMAR (ES+) (m/z): 294,0879 ([C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>+1H]<sup>+</sup>, m/z calculado = 294,08732, variação = 0,0002%)

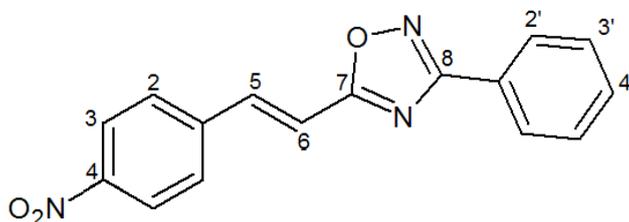
IV (KBr) cm<sup>-1</sup>: = 3034,64-3108,89 cm<sup>-1</sup>: ν<sub>C-H</sub> (deformação axial ligação C-H, C<sub>aromático</sub>); ν<sub>C=C</sub> = 1645,09 cm<sup>-1</sup> (deformação axial da ligação dupla vinílica, Csp<sup>2</sup>); ν<sub>C=N</sub> = 1548,66 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente C=N do núcleo oxadiazólico, Csp<sup>2</sup>); 1445,48-1595,91 cm<sup>-1</sup>: ν<sub>C=C</sub> (vibração do esqueleto aromático); ν<sub>N-O</sub> = 1340,37 cm<sup>-1</sup> e 1512,98 cm<sup>-1</sup> (deformações axiais características de grupo -NO<sub>2</sub>); ν<sub>N-O</sub> = 975,87cm<sup>-1</sup>

(vibração característica de componente N-O do núcleo oxadiazólico,  $N_{sp^2}$ ); 692,36-916,08  $cm^{-1}$ :  $\sigma_{C-H}$  (dobramentos de ligações C-H no anel aromático,  $C_{aromático}$ );  $\sigma_{C-H} = 835,08\text{ cm}^{-1}$  (dobramento de  $2H_{arom. vizinhos}$ );  $\sigma_{C-H}(C_{sp^2}) = 751,19\text{ cm}^{-1}$  e  $692,36\text{ cm}^{-1}$  (padrão de substituição do anel aromático,  $5H_{arom vizinhos}$ ).

RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ ),  $\delta$ (ppm): 8,33 (d,  $J$  8 Hz, 2H:  $H_2$ ); 8,14-8,16 (m, 2H:  $H_2'$ ); 7,955 (d,  $J$  15 Hz, 1H:  $H_5$ ); 7,80 (d,  $J$  8Hz, 1H:  $H_3$ ); 7,52-7,58 (m, 3H:  $H_3', H_4'$ ); 7,325 (d,  $J$  15 Hz, 1H:  $H_6$ ).

RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ),  $\delta$ (ppm): 174,25 ( $C_8$ ); 168,99 ( $C_7$ ); 148,59 ( $C_4$ ); 140,41 ( $C_1$ ); 139,69 ( $C_5$ ); 131,42 ( $C_4'$ ); 128,96 ( $C_2$ ); 128,52 ( $C_2'$ ); 127,47 ( $C_3$ ); 126,59 ( $C_1'$ ); 124,39 ( $C_3'$ ); 114,34 ( $C_6$ ).

**Tabela 23.** Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN $^1H$  e RMN $^{13}C$  para o oxadiazol **78**.



Posição	Oxadiazol <b>78</b> ( $CDCl_3$ ) 400 MHz	
	$\delta H$ (ppm); J(Hz)	$\delta C$ (ppm)
1	-	140,41 (C)
2	8,33 (d, $J$ 8 Hz, 2H)	128,96 (CH)
3	7,80 (d, $J$ 8Hz, 1H)	127,47 (CH)
4	-	148,59 (C)
5	7,955 (d, $J$ 15 Hz, 1H)	139,69 (CH)
6	7,325 (d, $J$ 15 Hz, 1H)	114,34 (CH)
7	-	168,99 (C)
8	-	174,25 (C)
1'	-	126,59 (C)
2'	8,14-8,16 (m, 2H)	128,52 (CH)
3'	7,52-7,58 (m, 2H)	124,39 (CH)
4'	7,52-7,58 (m, 1H)	131,42 (CH)

#### 4.5.11. Derivado **79** (5-[(*E*)-2-fenilvinil]-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2,4-oxadiazol)

Produto isolado como um sólido branco, com 73% de rendimento e P.F. = 138-140°C.

EMBR (IE, 70eV) (m/z): 103(45%); 131 (80%); 193(5%); 209(5%); 338 (M<sup>+</sup>, 100%).

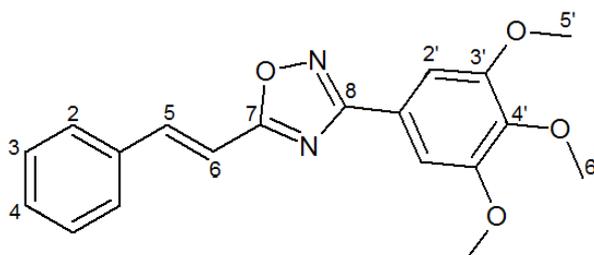
EMAR (ES+) (m/z): 339,1345 ([C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>+1H]<sup>+</sup>, m/z calculado = 339,13393, variação = 0,0002%)

IV (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3037,79-3060,94cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{C-H}$  (deformação axial ligação C-H, C<sub>aromático</sub>); 2832,14-2962,32cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{C-H}$  (deformação axial ligação C-H, Csp<sup>3</sup>);  $\nu_{C=C}$  = 1636,41 cm<sup>-1</sup> (deformação axial da ligação dupla vinílica, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{C=N}$  = 1557,34 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente C=N do núcleo oxadiazólico, Csp<sup>2</sup>); 1413,66-1595,95 cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{C=C}$  (vibração do esqueleto aromático);  $\nu_{C-O}$  = 1363,51cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente C-O do núcleo oxadiazólico, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{Ar-OCH_3}$  = 1229,48 cm<sup>-1</sup> (vibração da ligação C-O do grupo metoxila com anel aromático, C<sub>aromático</sub>);  $\nu_{C-O}$  = 1129,19 cm<sup>-1</sup> (vibração da ligação C-O do grupo metoxila, Csp<sup>3</sup>);  $\nu_{N-O}$  = 995,15cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente N-O do núcleo oxadiazólico, Nsp<sup>2</sup>); 698,15-914,15 cm<sup>-1</sup>:  $\sigma_{C-H}$  (dobramentos de ligações C-H no anel aromático, C<sub>aromático</sub>);  $\sigma_{C-H}$  = 694,35 cm<sup>-1</sup> e 738,71 cm<sup>-1</sup> (dobramento de C-H no anel aromático, 5H vizinhos, C<sub>aromático</sub>).

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ (ppm): 7,92 (d, *J* 16 Hz, 1H: H<sub>5</sub>); 7,63-7,66 (m, 2H: H<sub>2</sub>); 7,46-7,48 (m, 3H: H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>); 7,40 (s, 2H: H<sub>2</sub>); 7,10 (d, *J* 16 Hz, 1H: H<sub>6</sub>); 3,99 (s, 6H, H<sub>5</sub>); 3,95 (s, 3H, H<sub>6</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ (ppm): 175,20 (C<sub>8</sub>); 168,56 (C<sub>7</sub>); 153,37 (C<sub>3</sub>); 142,86 (C<sub>5</sub>); 140,49 (C<sub>4</sub>); 134,39 (C<sub>1</sub>); 130,61 (C<sub>4</sub>); 129,11 (C<sub>2</sub>); 127,95 (C<sub>3</sub>); 122,14 (C<sub>1</sub>); 110,15 (C<sub>6</sub>); 104,52 (C<sub>2</sub>); 60,99 (C<sub>6</sub>); 56,30 (C<sub>5</sub>).

**Tabela 24.** Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C para o oxadiazol **79**.



Posição	Oxadiazol <b>79</b> (CDCl <sub>3</sub> ) 400 MHz	
	$\delta$ H(ppm); J(Hz)	$\delta$ C(ppm)
1	-	134,39 (C)
2	7,63-7,66 (m, 2H)	129,11 (CH)
3	7,46-7,48 (m, 2H)	127,95 (CH)
4	7,46-7,48 (m, 1H)	130,61 (CH)
5	7,92 (d, <i>J</i> 16 Hz, 1H)	142,86 (CH)
6	7,10 (d, <i>J</i> 16 Hz, 1H)	110,15 (CH)
7	-	168,56 (C)
8	-	175,20 (C)
1'	-	122,14 (C)
2'	7,40 (s, 2H)	104,52 (CH)
3'	-	153,37 (C)
4'	-	140,49 (C)
5'	3,99 (s, 6H)	56,30 (CH <sub>3</sub> )
6'	3,95 (s, 3H)	60,99 (CH <sub>3</sub> )

**4.5.12. Derivado **80** (5-[(*E*)-2-(3-metoxifenil)vinil]-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2,4-oxadiazol)**

Produto isolado como um sólido branco, com 60% de rendimento e P.F. = 117-119°C.

EMBR (IE, 70eV) (m/z): 118 (20%); 133(20%); 159(10%); 161(60%); 175(15%); 193(15%); 209(10%); 368 (M<sup>+</sup>, 100%).

EMAR (ES+) (m/z): 369,1451 ([C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>+1H]<sup>+</sup>, m/z calculado = 369,14450, variação = 0,0001%)

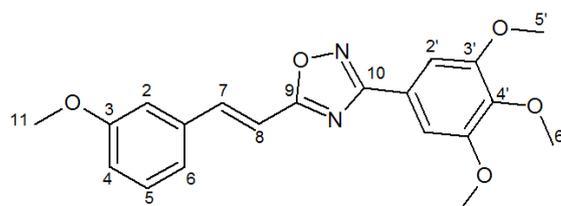
IV (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3033,93-3062,86 cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{C-H}$  (deformação axial ligação C-H, C<sub>aromático</sub>); 2831,41-2925,92 cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{C-H}$  (deformação axial ligação C-H, Csp<sup>3</sup>);  $\nu_{C=C}$  = 1641,37 cm<sup>-1</sup> (deformação axial da ligação dupla vinílica, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{C=N}$  = 1554,58 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente C=N do núcleo oxadiazólico, Csp<sup>2</sup>); 1417,64-1602,08 cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{C=C}$  (vibração do esqueleto aromático);  $\nu_{C-O}$  = 1361,70cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente C-O do núcleo oxadiazólico, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{Ar-OCH_3}$  = 1230,55 e

1261,41  $\text{cm}^{-1}$  (vibrações de ligações C-O de grupo metoxila com anel aromático,  $\text{C}_{\text{aromático}}$ );  $\nu_{\text{C-O}} = 1128,32 \text{ cm}^{-1}$  (vibração da ligação C-O do grupo metoxila,  $\text{Csp}^3$ );  $\nu_{\text{N-O}} = 1006,81 \text{ cm}^{-1}$  (vibração característica de componente N-O do núcleo oxadiazólico,  $\text{Nsp}^2$ ); 675,06-862,15  $\text{cm}^{-1}$ :  $\sigma_{\text{C-H}}$  (dobramentos de ligações C-H no anel aromático,  $\text{C}_{\text{aromático}}$ );  $\sigma_{\text{C-H}} = 771,5 \text{ cm}^{-1}$  (dobramento de C-H no anel aromático, 3H vizinhos,  $\text{C}_{\text{aromático}}$ );.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ (ppm): 7,88 (d,  $J$  16 Hz, 1H:  $\text{H}_7$ ); 7,40 (s, 2H:  $\text{H}_2$ ); 7,38 (t,  $J$  8Hz, 1H:  $\text{H}_5$ ); 7,235 (dd,  $J_1$  8Hz,  $J_2$  2Hz, 1H:  $\text{H}_6$ ); 7,15 (t,  $J$  2Hz, 1H:  $\text{H}_2$ ); 7,08 (d,  $J$  16 Hz, 1H:  $\text{H}_8$ ); 7,005 (dd,  $J_1$  8Hz,  $J_2$  2Hz, 1H:  $\text{H}_4$ ); 3,99 (s, 6H:  $\text{H}_{5'}$ ); 3,95 (s, 3H:  $\text{H}_{6'}$ ); 3,89 (s, 3H:  $\text{H}_{11}$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ (ppm): 175,12 ( $\text{C}_{10}$ ); 168,55 ( $\text{C}_9$ ); 160,03 ( $\text{C}_3$ ); 153,56 ( $\text{C}_{3'}$ ); 142,86 ( $\text{C}_7$ ); 140,49 ( $\text{C}_4$ ); 135,73 ( $\text{C}_1$ ); 130,11 ( $\text{C}_5$ ); 122,12 ( $\text{C}_{1'}$ ); 120,62 ( $\text{C}_6$ ); 116,41 ( $\text{C}_2$ ); 112,85 ( $\text{C}_4$ ); 110,42 ( $\text{C}_8$ ); 104,51 ( $\text{C}_{2'}$ ); 60,99 ( $\text{C}_{6'}$ ); 56,30 ( $\text{C}_{5'}$ ); 55,35 ( $\text{C}_{11}$ ).

**Tabela 25.** Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN $^1\text{H}$  e RMN $^{13}\text{C}$  para o oxadiazol **80**.



Posição	Oxadiazol <b>80</b> ( $\text{CDCl}_3$ ) 400 MHz	
	$\delta\text{H}(\text{ppm}); J(\text{Hz})$	$\delta\text{C}(\text{ppm})$
1	-	135,73 (C)
2	7,15 (t, $J$ 2Hz, 1H)	116,41 (CH)
3	-	160,03 (C)
4	7,005 (dd, $J_1$ 8Hz, $J_2$ 2Hz, 1H)	112,85 (CH)
5	7,38 (t, $J$ 8Hz, 1H)	130,11 (CH)
6	7,235 (dd, $J_1$ 8Hz, $J_2$ 2Hz, 1H)	120,62 (CH)
7	7,88 (d, $J$ 16 Hz, 1H)	142,86 (CH)
8	7,08 (d, $J$ 16Hz, 1H)	110,42 (CH)
9	-	168,55 (C)
10	-	175,12 (C)
11	3,89 (s, 3H)	55,35 ( $\text{CH}_3$ )
1'	-	122,12 (C)
2'	7,40 (s, 2H)	104,51 (CH)
3'	-	153,56 (C)
4'	-	140,49 (C)
5'	3,99 (s, 6H)	56,30 ( $\text{CH}_3$ )
6'	3,95 (s, 3H)	60,99 ( $\text{CH}_3$ )

**4.5.13. Derivado 81 (5-[(E)-2-(1,3-benzodioxin-5-il)vinil]-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2,4-oxadiazol)**

Produto isolado como um sólido branco, com 60% de rendimento e P.F. = 177-180°C.

EMBR (IE, 70eV) (m/z): 166 (20%), 175(50%); 367(40%); 382 (M<sup>+</sup>, 100%).

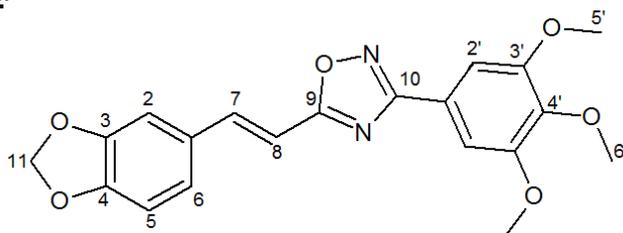
EMAR (ES+) (m/z): 383,1243 ([C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>+1H]<sup>+</sup>, m/z calculado = 383,12376, variação = 0,0001%)

IV (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3009,57-3103,1 cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{C-H}$  (deformação axial ligação C-H, C<sub>aromático</sub>); 2836,96-2983,53 cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{C-H}$  (deformação axial ligação C-H, Csp<sup>3</sup>);  $\nu_{C=C}$  = 1647,02 cm<sup>-1</sup> (deformação axial da ligação dupla vinílica, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{C=N}$  = 1539,98 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente C=N do núcleo oxadiazólico, Csp<sup>2</sup>); 1414,62-1597,84 cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{C=C}$  (vibração do esqueleto aromático);  $\nu_{C-O}$  = 1354,84 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente C-O do núcleo oxadiazólico, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{C-O}$  (Csp<sup>2</sup>) = 1255,51 cm<sup>-1</sup> e 1230,44 cm<sup>-1</sup> (vibrações de ligação C-O de grupos metoxila e anel dioxano com anel aromático, C<sub>aromático</sub>);  $\nu_{C-O}$  (Csp<sup>3</sup>) = 1130,15 cm<sup>-1</sup> (vibrações de ligações C-O de grupos metoxila e anel dioxano, Csp<sup>3</sup>);  $\nu_{N-O}$  = 996,12 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente N-O do núcleo oxadiazólico, Nsp<sup>2</sup>); 717,44-929,58 cm<sup>-1</sup>:  $\sigma_{C-H}$  (dobramentos de ligações C-H no anel aromático, C<sub>aromático</sub>);  $\sigma_{C-H}$  = 929,58 cm<sup>-1</sup> (dobramento de C-H no anel aromático, 1H isolado, C<sub>aromático</sub>).

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ (ppm): 7,81 (d, *J* 16 Hz, 1H: H<sub>7</sub>); 7,38 (s, 2H: H<sub>2</sub>); 7,10-7,13 (m, 2H: H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>); 6,89 (d, *J* 16Hz, 1H: H<sub>8</sub>); 6,88 (d, *J* 8Hz, 1H: H<sub>5</sub>); 6,06 (s, 2H, H<sub>11</sub>); 3,98 (s, 6H, H<sub>5</sub>); 3,94 (s, 3H, H<sub>6</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ (ppm): 175,39 (C<sub>10</sub>); 168,47 (C<sub>9</sub>); 153,55 (C<sub>3</sub>); 149,92 (C<sub>3</sub>); 148,56 (C<sub>4</sub>); 142,37 (C<sub>7</sub>); 140,42 (C<sub>4</sub>); 128,85 (C<sub>1</sub>); 124,57 (C<sub>6</sub>); 122,22 (C<sub>1</sub>); 108,74 (C<sub>2</sub>); 108,07 (C<sub>5</sub>); 106,18 (C<sub>8</sub>); 104,47 (C<sub>2</sub>); 101,70 (C<sub>11</sub>); 60,95 (C<sub>6</sub>); 56,30 (C<sub>5</sub>).

**Tabela 26.** Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C para o oxadiazol **81**.



Posição	Oxadiazol <b>81</b> (CDCl <sub>3</sub> ) 400 MHz	
	$\delta$ H(ppm); J(Hz)	$\delta$ C(ppm)
1	-	122,22 (C)
2	7,10-7,13 (m, 1H)	108,74 (CH)
3	-	149,92 (C)
4	-	148,56 (C)
5	6,88 (d, <i>J</i> 8Hz, 1H)	108,07 (CH)
6	7,10-7,13 (m, 1H)	124,57 (CH)
7	7,81 (d, <i>J</i> 16 Hz, 1H)	142,37 (CH)
8	6,89 (d, <i>J</i> 16Hz, 1H)	106,18 (CH)
9	-	168,47 (C)
10	-	175,39 (C)
11	6,06 (s, 2H)	101,70 (CH <sub>2</sub> )
1'	-	128,85 (C)
2'	7,38 (s, 2H)	104,47 (CH)
3'	-	153,55 (C)
4'	-	140,42 (C)
5'	3,98 (s, 6H)	56,30 (CH <sub>3</sub> )
6'	3,94 (s, 3H)	60,95 (CH <sub>3</sub> )

#### 4.5.14. Derivado **82** (5-[(*E*)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-3-fenil)-1,2,4-oxadiazol)

Produto isolado como um sólido marrom, com 70% de rendimento e P.F. = 132-135°C.

EM (IE, 70eV) (m/z): 77(15%); 176(20%); 221(25%); 323(30%); 338 (M<sup>+</sup>, 100%).

EMAR (ES+) (m/z): 339,1358 ([C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>+1H]<sup>+</sup>, m/z calculado = 339,13393, variação = 0,0006%)

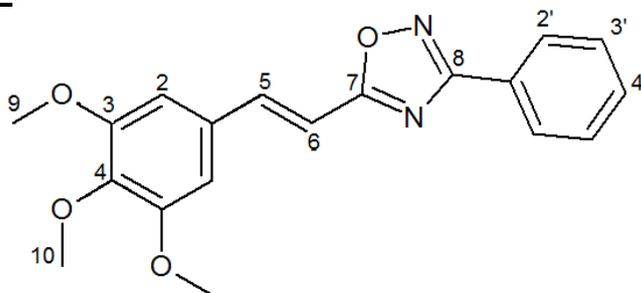
IV (KBr) cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{\text{C-H}}$  (Csp<sup>2</sup>) = 3066,46 cm<sup>-1</sup> (deformação axial ligação C-H, C<sub>aromático</sub>); 2833,10-2991,25 cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{\text{C-H}}$  (deformação axial ligação C-H, Csp<sup>3</sup>);  $\nu_{\text{C=C}}$  = 1625,80 cm<sup>-1</sup> (deformação axial da ligação dupla vinílica, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{\text{C=N}}$  = 1548,66 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente C=N do núcleo oxadiazólico, Csp<sup>2</sup>); 1417,51-1581,44 cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{\text{C=C}}$  (vibração do esqueleto aromático);  $\nu_{\text{C-O}}$  (Csp<sup>2</sup>) = 1336,51 cm<sup>-1</sup> (vibração característica de componente C-O do núcleo oxadiazólico, Csp<sup>2</sup>);  $\nu_{\text{C-O}}$  = 1240,08 cm<sup>-1</sup>

(vibração da ligação C-O do grupo metoxila com anel aromático,  $C_{\text{aromático}}$ );  $\nu_{\text{C-O}} = 1128,23 \text{ cm}^{-1}$  (vibração da ligação C-O do grupo metoxila,  $C_{\text{sp}^3}$ );  $\nu_{\text{N-O}} = 995,15 \text{ cm}^{-1}$  (vibração característica de componente N-O do núcleo oxadiazólico,  $N_{\text{sp}^2}$ );  $694,29 - 819,65 \text{ cm}^{-1}$ :  $\sigma_{\text{C-H}}$  (dobramentos de ligações C-H no anel aromático,  $C_{\text{aromático}}$ );  $\sigma_{\text{C-H}} = 694,29 \text{ cm}^{-1}$  e  $740,58 \text{ cm}^{-1}$  (dobramento de C-H no anel aromático, 5H vizinhos,  $C_{\text{aromático}}$ ).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ (ppm): 8,15 (m, 2H:  $H_2$ ); 7,83 (d,  $J$  16Hz, 1H:  $H_5$ ); 7,53 (m, 3H:  $H_3$ ,  $H_4$ ); 7,01 (d,  $J$  16Hz, 1H:  $H_6$ ); 6,87 (s, 1H:  $H_2$ ); 3,95 (s, 6H,  $H_9$ ); 3,93 (s, 3H,  $H_{10}$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ (ppm): 175,22 (C,  $C_8$ ); 168,70 (C,  $C_7$ ); 153,58 (C,  $C_3$ ); 142,64 (CH,  $C_3$ ); 140,30 (C,  $C_4$ ); 131,21 (CH,  $C_4$ ); 129,93 (C,  $C_{1'}$ ); 128,90 (CH,  $C_{3'}$ ); 127,43 (CH,  $C_{2'}$ ); 126,93 (C,  $C_{1'}$ ); 109,49 (CH,  $C_6$ ); 105,04 (CH,  $C_2$ ); 61,06 ( $\text{CH}_3$ ,  $C_{10}$ ); 56,21 ( $\text{CH}_3$ ,  $C_9$ ).

**Tabela 27.** Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN $^1\text{H}$  e RMN $^{13}\text{C}$  para o oxadiazol **82**.



Oxadiazol <b>82</b> ( $\text{CDCl}_3$ ) 400 MHz		
Posição	$\delta\text{H}(\text{ppm}); J(\text{Hz})$	$\delta\text{C}(\text{ppm})$
1	-	126,93 (C)
2	6,87 (s, 2H)	105,04 (CH)
3	-	153,58 (C)
4	-	140,30 (C)
5	7,83 (d, $J$ 16Hz, 1H)	142,64 (CH)
6	7,01 (d, $J$ 16Hz, 1H)	109,49 (CH)
7	-	168,70 (C)
8	-	175,22 (C)
9	3,95 (s, 6H)	56,21 ( $\text{CH}_3$ )
10	3,93 (s, 3H)	61,06 ( $\text{CH}_3$ )
1'	-	129,93 (C)
2'	8,15 (m, 2H)	127,43 (CH)
3'	7,53 (m, 2H)	128,90 (CH)
4'	7,53 (m, 2H)	131,21 (CH)

#### **4.6. Protocolo experimental para ensaio de atividade biológica frente a epimastigotas de *T. cruzi* (Tulahuen C2C4)**

Os parasitos (epimastigotas de *T. cruzi*, cepa Tulahuen C2C4) foram incubados por 7 dias em placas de 96 poços de fundo chato e material transparente na concentração da  $3 \times 10^5$  parasitos/mL em meio LIT suplementado com hemina (25 mg/L) e 10% de soro fetal bovino e volume final de 100  $\mu$ L/poço. Foi realizado o tratamento com os compostos teste **69-82** e com o fármaco de referência **1** (benzonidazol) nas concentrações de 100, 60, 24, 9,6, 3,8 e 1,5  $\mu$ M em triplicata, pré-solubilizados em DMSO. Triplicatas de parasitos sem tratamento (controle Vivo), tratadas com 0,3% v/v de DMSO (veículo) e sem parasitos (controle branco) serviram como controle do experimento.

Após o período de incubação foram adicionados aos poços de cultura 50  $\mu$ L de solução de CPRG (**96**, 0,3 g/L) + Igepal (0,8% v/v) em PBS. Após incubação por 60 minutos as placas foram lidas em leitor de Elisa com filtro de luz de  $\lambda = 595$ nm. Os valores de absorbância obtidos foram descontados da média das medidas do controle branco e tratados estatisticamente no programa *GraphPad Prism 4* utilizando o teste T de Student, sendo consideradas estatisticamente relevantes quando  $P \leq 0,05$ .

#### **4.7. Protocolo experimental para ensaio de atividade biológica frente a epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c)**

Os parasitos (epimastigotas de *T. cruzi*, cepa Dm28c) foram incubados por 7 dias em placas de 96 poços de fundo chato e material transparente na concentração da  $3 \times 10^5$  parasitos/mL em meio BHI suplementado com hemina (25 mg/L) e 10% de soro fetal bovino e volume final de 100  $\mu$ L/poço. Foi realizado o tratamento com os compostos teste **69-82** e com o fármaco de referência **1** (benzonidazol) nas concentrações de 100, 60, 24, 9,6, 3,8 e 1,5  $\mu$ M em triplicata, pré-solubilizados em DMSO. Triplicatas de parasitos sem tratamento (controle Vivo), tratadas com 0,3% v/v de DMSO (veículo) e sem parasitos (controle branco) serviram como controle do experimento.

Após o período de incubação as placas foram centrifugadas a 1500 rpm e 4°C por 10' e o meio de cultura vertido. Os parasitos foram então ressuspensos em 80  $\mu$ L/poço de PBS suplementado com 2 mg/mL de glicose e 10% SFB e tratados com 20  $\mu$ L/poço de solução de sal de MTT (1,25 mg/mL) com PMS (0,11 mg/mL) em PBS. Após incubação por 4 horas ao abrigo da luz o meio foi vertido após centrifugação

(1500 rpm, 4°C por 10') e os cristais de formazana solubilizados em 150 µL/poço de DMSO. As placas foram então submetidas a agitação ao abrigo da luz por 15' e a absorbância medida em leitor de placas com filtro de luz de  $\lambda = 570$  nm. Os valores de absorbância obtidos foram descontados da média das medidas do controle branco e tratados estatisticamente no programa *GraphPad Prism 4* utilizando o teste T de Student, sendo consideradas estatisticamente relevantes quando  $P \leq 0,05$ .

#### **4.8. Protocolo experimental para ensaio de inibição da protease cruzaina**

(Experimento realizado pela aluna de Doutorado do Instituto de Física da Universidade de São Paulo Mariana Laureano de Souza, sob supervisão do Prof. Dr. Adriano Define Andricopoulo)

Uma suspensão contendo 0,5-1,5nM da protease cruzaina em tampão de de acetato de sódio (100mM, pH = 5,5) em presença de 5 mM ditionitrito (DTT) e 0,01% v/v Triton X-100 foi distribuída em uma placa de preta de 96 poços. Foi realizado tratamento com os compostos **69-82** em 6 replicata nas concentrações de 100 e 200 µM. A adição do substrato Z-Phe-Zrg-AMC (5,0 µM) ocorreu concomitante ao tratamento em 3 das respectivas replicatas e após um período de incubação de 10 minutos nas demais. Triplicatas de controles sem tratamento foram realizados a fim de comparação dos resultados para ambas as situações, com e sem incubação.

O monitoramento da fluorescência foi realizado em fluorímetro de placas VICTOR3™ (Perkin Elmer) ajustado em  $\lambda = 355$  nm para excitação e  $\lambda = 460$  nm para emissão. A partir dos valores de fluorescência lidos nas situações tratadas foram calculadas as porcentagens de inibição em relação os valores lidos para os controles sem tratamento.

#### **4.9. Análise do ciclo celular por meio de citometria de fluxo**

(Experimento realizado pela aluna de Doutorado do Instituto de Física da Universidade de São Paulo Luma Godoy Magalhães, sob supervisão do Prof. Dr. Adriano Define Andricopoulo)

Formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Tulahuen C2C4) foram cultivadas em meio LIT a 28°C na concentração de  $2 \times 10^6$ /mL em placas de cultura de 24 poços (TPP™, Suíça). Os compostos **70** e **74** foram adicionadas em triplicadas nas concentrações de 10, 50 e 100 µM. Os controles utilizados foram o veículo (DMSO 0,03% v/v) e taxol (20 µM). Após 48h de incubação, os parasitos foram fixados em

etanol 70% por 30 min a -20° C. Em seguida, as células foram centrifugadas a 200g por 8 minutos e lavadas com PBS. Então as amostras foram incubadas por 10 minutos com um tampão de permeabilização (0,2M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,005% de Triton-X, pH 7,8). As células novamente foram centrifugadas a 200g por 8 minutos e ressuspensas em uma solução contendo o marcador iodeto de propídio (PI, 50 µg/mL) e 0,2 µg/mL de RNase por 30 minutos à temperatura ambiente. O conteúdo genético foi analisado medindo a fluorescência do PI em um citômetro BD Accuri C5 (Becton Dickinson Company, EUA) a 488 nm de comprimento de onda excitatório e filtro de emissão de 585/40nm.

#### **4.10. Extração dos lipídeos de membrana**

6x10<sup>6</sup> epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) foram cultivadas por 7 dias em tubos de fundo cônico contendo 25 mL de meio BHI a 26° C. Foi realizado o tratamento com os compostos **74** e **82** nas respectivas concentrações de 10 e 8 µM. Controles negativo (sem tratamento), de veículo (0,03% v/v DMSO) e positivo (1,0µM cetoconazol) foram realizados a fim de comparação. Após o período de cultivo, as culturas foram submetidas a centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os pellets contendo *T. cruzi* foram submetidos à extração de lipídios de membrana. 100 mg do conteúdo dos pellets foram suspensos em uma solução alcoólica de hidróxido de potássio (25% m/v) seguindo-se vigorosa agitação por 1 minuto. Após a homogeneização, as suspensões foram mantidas a 80° C e agitação por 1h. Os sistemas foram resfriados e a cada um foi adicionado 1 mL de água destilada gelada. A extração foi realizada adicionando-se 2x1,5 mL de *n*-hexano, seguindo-se agitação vigorosa durante 3 minutos. Após separação das fases, a fase orgânica foi transferida para um frasco previamente tarado e o *n*-hexano removido por fluxo de nitrogênio ultrasseco. Os esteróis foram então redissolvidos em *n*-hexano de grau espectroscópico para análise por CLAE (PINTO *et al*, 2011).

#### **4.11. Análise dos lipídios de membrana por CLAE**

(Experimento realizado pela Prof<sup>a</sup> Dra. Rosane Nora Castro, do Departamento de Química da UFRRJ)

A análise da fração lipídica isolada de epimastigotas de *T. cruzi* foi realizada em aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência da marca *Shimadzu*, modelo LC-20AT, forno CTO 20A, detector PDA (SPD-M20A), autoinjeter Sil-10AF e controlador CBM 20A. A separação ocorreu em uma coluna de fase reversa (C18 *Waters Nova Pak*,

15cm x 43,9 mm x 5 µm) em modo isocrático utilizando metanol (60%) e acetonitrila (40%) como eluentes, em uma vazão de 1,0 mL/min e pressão de 48kgf/cm<sup>2</sup>. A detecção ocorreu a 280 nm (ergosterol) e 240 nm (lanosterol). O volume de injeção foi de 20 µL e a temperatura do forno, 35° C. A identificação dos esteroides ocorreu por comparação com os tempos de retenção e curvas de ultravioleta dos padrões comercialmente disponíveis (*Sigma-Aldrich*)

#### **4.12. Protocolo experimental para ensaio de citotoxicidade frente a macrófagos peritoneais e esplenócitos totais de camundongo**

Macrófagos peritoneais foram obtidos por lavagem peritoneal com RPMI de camundongos BALB/c machos com 8-10 semanas de vida criados com alimento e água *ad libitum* e os esplenócitos totais obtidos dos baços extraídos dos animais. As células foram cultivadas por 48h em placas de 96 poços de fundo chato e material transparente na concentração da 5x10<sup>6</sup> parasitos/mL em meio RMPI e 10% de soro fetal bovino no volume final de 100 µL/poço. Foi realizado o tratamento com os compostos teste **69-82** e com o fármaco de referência **1** (benzonidazol) nas concentrações de 150, 100, 50 e 10 µM em triplicata, pré-solubilizados em DMSO. Triplicatas de células sem tratamento (controle Vivo), tratadas com 0,3% de DMSO (veículo) e sem células (controle branco) serviram como controle do experimento.

Após o período de incubação foram adicionados aos poços de cultura 50 µL de solução de sal monossódico de XTT (**99**, 1,2 mg/mL) + PMS (**101**, 0,077 mg/mL) em PBS. Após incubação por 4h as placas foram lidas em leitor de Elisa com filtro de luz de  $\lambda = 490$  nm. Os valores de absorbância obtidos foram descontados da média das medidas do controle branco e tratados estatisticamente no programa *GraphPad Prism 4* utilizando o teste T de Student, sendo consideradas estatisticamente relevantes quando  $P \leq 0,05$ .

## **5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

A metodologia desenvolvida neste trabalho permitiu a preparação dos 14 derivados oxadiazólicos **69-82** em rendimentos entre 40 e 79%. A utilização de irradiação de micro-ondas para a realização de reação de ciclização suportada em sílica, se mostrou eficiente e permitiu um ganho significativo em tempo de reação, com diminuição da formação de rejeitos e da utilização de solventes tóxicos. Nesse contexto,

consideramos como uma perspectiva desse trabalho a ampliação da série de moléculas, variando-se a natureza e a posição relativa dos substituintes nos valendo de ferramentas de química computacional de modo a levantar dados visando a determinação da relação estrutura atividade para essa família de compostos.

Os ensaios para avaliação da atividade biológica em *T. cruzi* na forma epimastigota foram realizados evidenciando os compostos **74**, com valores de  $CI_{50}$  iguais a  $19,6 \pm 1,3 \mu M$  (Tulahuen C2C4) e  $7,8 \pm 1,1 \mu M$  (Dm28c), e **82**, com valores de  $CI_{50}$  iguais a  $33,4 \pm 1,1 \mu M$  (Tulahuen C2C4) e  $9,4 \pm 1,1 \mu M$  (Dm28c), como os mais ativos da série. Já os ensaios de citotoxicidade frente a células primárias mamíferas (macrófagos peritoneais e esplenócitos totais) revelaram que todos os compostos apresentam de moderada a baixa toxicidade. Esses resultados nos permitiram determinar os valores dos índices de seletividade para os compostos de nossa série, cabendo destaque para os valores de IS das moléculas com maior atividade frente aos parasitos em comparação aos macrófagos: **74**, com  $IS > 7,7$  e (Tulahuen C2C4) e  $IS > 19,2$  (Dm28c), e **82**, com  $IS > 4,5$  (Tulahuen C2C4) e  $IS > 16,0$  (Dm28c).

A investigação quanto a possíveis mecanismos de ação da família de compostos sintetizados indicou que o ciclo celular do parasito não é afetado pelo tratamento. A biossíntese de esteróis de membrana não foi alterada pelo em presença dos 1,2,4-oxadiazóis **74** e **82**, o que é um indicativo de que os compostos não apresentam ação inibitória sobre a enzima CYP51. Já os estudos de inibição frente à protease cruzaina revelou resultados promissores, uma vez que o tratamentos com os compostos **73** e **80** refletiu em percentuais de inibição consideráveis, levando-nos a inferir quanto à possível atividade antiparasitária frente a outras formas evolutivas do *T. cruzi* (tripomastigota e amastigota). Além disso, a partir de um estudo mais minucioso do perfil de inibição enzimática associado a um trabalho de modelagem molecular, é possível conduzir um trabalho de otimização estrutural visando à síntese de inibidores de cruzaina mais potentes a partir das moléculas **73** e **80**.

As perspectivas para este trabalho envolvem ainda o aprofundamento na investigação quanto aos possíveis mecanismos de ação dos derivados e a avaliação *in vitro* da atividade inibitória dos oxadiazóis **69-82** frente ao *T. cruzi* nas formas tripomastigota e amastigota (célula infectada), podendo-se avançar para os ensaio *in vivo* em camundongos infectados se os resultados das avaliações *in vitro* o justificarem.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDER, J., & HANCOCK, A. **Notice of a Collection of Nudibranchiate Mollusca made in India by Walter Elliot, Esq., with Descriptions of several New Genera and Species.** The Transactions of the Zoological Society of London, 5(3), p. 113-147, 1864.
- ANSELL, M. F. **The Chemistry of Acyl-Halides**, S. Patai, Ed., Interscience. London, p. 35-68, 1972.
- AVELAR, L. A. A., CAMILO, C. D., ALBUQUERQUE, S., FERNANDES, W. B., GONÇALEZ, C., KENNY, P. W., LEITÃO, A., MCKERROW, J. H., MONTANARI, C. A., OROZCO, E. V. M., RIBEIRO, J. F. R., ROCHA, J. R., ROSINI, F., SAIDEL, M. E. **Molecular Design, Synthesis and Trypanocidal Activity of Dipeptidyl Nitriles as Cruzain Inhibitors.** PLoS Neglected Tropical Diseases, 9(7): e0003916, 2015.
- BAUM, S. G., WITTNER, M., NADLER, J. P., HORWITZ, S. B., DENNIS, J. E., SCHIFF, P. B., & TANOWITZ, H. B. **Taxol, a microtubule stabilizing agent, blocks the replication of Trypanosoma cruzi.** Proceedings of the National Academy of Sciences, 78(7), p. 4571-4575, 1981.
- BENCHIMOL-BARBOSA, P. R. **Trends on acute Chagas' disease transmitted by oral route in Brazil: Steady increase in new cases and a concealed residual fluctuation.** International Journal of Cardiology, 145, p. 494-496, 2010.
- BOSTROM, J., HOGNER, A., SCHMITT, S. **Do structurally similar ligands bind in a similar fashion?** Journal of Medicinal Chemistry, 49, p. 6716-6725, 2006.
- BRAK, K.; DOYLE, P. S.; MCKERROW, J. H.; ELLMAN, J. A. **Identification of a New Class of Nonpeptidic Inhibitors of Cruzain.** Journal of the American Chemical Society, 130, p. 6404-6410, 2008.
- BRENER, Z., ANDRADE, Z. A. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 17, 1979.
- BRETANHA, L. C., TEIXEIRA, V. E., RITTER, M., SIQUEIRA, G. M., CUNICO, W., PEREIRA C. M. P., FREITAG, R. A. **Ultrasound-promoted synthesis of 3-trichloromethyl-5-alkyl(aryl)-1,2,4-oxadiazoles.** Ultrasonics Sonochemistry, 18, p. 704-707, 2011.
- BRIK, A., ALEXANDRATOS, J., LIN, Y. C., ELDER, J. H., OLSON, A. J., WLODAVER, A., GOODSSELL, D. S., WONG, C. H. **1,2,3-Triazole as a peptide surrogate in the rapid synthesis of HIV-1 protease inhibitors.** ChemBioChem, 6, p. 1167-1169, 2005.

- BROGAN, J. T., STOOPS, S. L., LINDSLEY, C. W. **Total synthesis and biological evaluation of phidianidines A and B uncovers unique pharmacological profiles at CNS targets.** ACS chemical neuroscience, 3, p. 658–664, 2012.
- BUCKNER, F. S., VERLINDE, C. L., LA FLAMME, A. C., & VAN VOORHIS, W. C. **Efficient technique for screening drugs for activity against Trypanosoma cruzi using parasites expressing beta-galactosidase.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 40(11), p. 2592-2597, 1996.
- BUTLER, M. S., ROBERTSON, A. A. B., COOPER, M. A. **Natural products natural product derived drugs in clinical trials.** Natural Products Reports, 31, p. 1612-1660, 2014.
- CADDICK, S. **Microwave assisted organic reaction.** Tetrahedron, 51 (38), p. 10403-10432, 1995.
- CADENA, S. M. S. C., CARNIERI, E. G. S., ECHEVARRIA, A., OLIVEIRA, M. B. M. **Effects of MI-D, a new mesoionic compound, on energy-linked functions of rat liver mitochondria.** FESB Letters, 440, p. 46-50, 1998.
- CARBONE, M., LI, Y., IRACE, C., MOLLO, E., CASTELLUCCIO, F., DI PASCALE, A. **Structure and Cytotoxicity of Phidianidines A and B: First Finding of 1,2,4-Oxadiazole System in a Marine Natural Product.** Organic Letters, 13, p. 2516–2519, 2011.
- CASTRO, J. A., & DIAZ, D. T. E. **Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease).** Biomedical and Environmental Sciences: BES, 1(1), p. 19-33, 1988.
- CASTRO, J. A., MONTALTO DEMECCA, M., & BARTEL, L. C. **Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis).** Human & Experimental Toxicology, 25(8), p. 471-479, 2006.
- ČERVINKA, O., & KŘÍŽ, O. **A contribution to mechanism of addition of hydrogen bromide to the  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated system of 3-phenyl-2-propenoic acid.** Collection of Czechoslovak chemical communications, 48(10), p. 2952-2964, 1983.
- CHAGAS, C. **Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1, p. 159-218, 1909.
- CHEN, Y. T., BRINEN, L. S., KERR, I. D., HANSELL, E., DOYLE, P. S., MCKERROW, J. H., & ROUSH, W. R. **In vitro and in vivo studies of the trypanocidal properties of WRR-483 against Trypanosoma cruzi.** PLoS Neglected Tropical Diseases, 4(9), e825, 2010.

- CHIOU, S., SHINE, H. J. **A simplified procedure for preparing 3,5-disubstituted-1,2,4-oxadiazoles by reaction of amidoximes with acyl chlorides in piridine solution.** Journal of Heterocyclic Chemistry, 26, p. 125-128, 1989.
- CLAPP, L. B. **Advances in Heterocyclic Chemistry**, In.: A.R. Katritzky 1st Ed., Academic Press, New York, 20, p. 65-116, 1976.
- CLAYDEN, J., GREEVES, N., WARREN, S., WOTHERS, P. **Organic Chemistry.** Oxford University Press, 1<sup>st</sup> ed., p. 703, 2000.
- COTTRELL, D. M., CAPERS, J., SALEM, M. M., DeLUCA-FRADLEY, K., CROFT, S. L., WERBOVETS, K. A. **Antikinetoplastid activity of 3-aryl-5-thiocyanatomethyl-1,2,4-oxadiazoles.** Bioorganic and Medicinal Chemistry, 12, p. 2815-2824, 2004.
- COURA, J. R. & BORGES-PEREIRA, J. **Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 106, p. 642-645, 2011.
- COURA, J. R., DE CASTRO, S.L. **A critical review on Chagas disease chemotherapy,** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 97(1), p. 3-24, 2002.
- DAS, B. C., TANG, X. Y., ROGLER, P., EVANS, T. **Design and synthesis of 3,5-disubstituted boron-containing 1,2,4-oxadiazoles as potential combretastatin A-4 (CA-4) analogs.** Tetrahedron Letters, 53, p. 3947-3950, 2012.
- DE SOUZA, W. & MEYER, H. **On the fine structure of the nucleus in *Trypanosoma cruzi* in tissue culture forms. Spindle fibers in the dividing nucleus.** The Journal of protozoology, 21(1), 48-52, 1974.
- DE SOUZA, W. & RODRIGUES, J. C. F. **Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs.** Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, 2009.
- DIAS, L. C., DESSOY, M. A., ANDRICOPULO, A. D., OLIVA, G., SILVA, J. J. N., & THIEMANN, O. H. **Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos.** Química Nova, 32 (9), p. 2444-2457, 2009.
- DIAZ-LUJÁN, C., TRIQUELL, M. F., MEZZANO, L., FRETES, R. E. **Placental infection by *Trypanosoma cruzi*, the causal agente of Chagas' disease.** La Rioja: Intechopen, cap. 7, p. 127-148, 2012.
- DUSCHAK, V. G., COUTO, A. S. **An Insight on Targets and Patented Drugs for Chemotherapy of Chagas Disease.** Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery, 2(1), p. 19-51, 2007.

- EIPPER, B. A. **Rat brain microtubule protein: purification and determination of covalently bound phosphate and carbohydrates.** Proceedings of the National Academy of Sciences, 69(8), p. 2283-2287, 1972.
- ESPENSHADE, P. J., & HUGHES, A. L. **Regulation of sterol synthesis in eukaryotes.** Genetics, 41, 2007.
- FERREIRA, R. S., BRYANT, C., ANG, K. K., MCKERROW, J. H., SHOICHET, B. K., & RENSLO, A. R. **Divergent modes of enzyme inhibition in a homologous structure–activity series.** Journal of medicinal chemistry, 52(16), 5005-5008, 2009.
- FERREIRA, W. S., FREIRE-DE-LIMA, L., SARAIVA, V. B., ALISSON-SILVA, F., MENDONÇA-REVIATO, L., PREVIATO, J. O., ECHEVARRIA, A., LIMA, M. E. F. **Novel 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chlorides derived from natural piperine as trypanocidal agents: Chemical and biological studies.** Bioorganic and Medicinal Chemistry, 16, p. 2984-2991, 2008.
- FREIRE-DE-LIMA, L., RIBEIRO, T. S., ROCHA, G. M., BRANDÃO, B. A., ROMEIRO, A., PREVIATO, J. O., MENDONÇA-PREVIATO, L., LIMA, M. E. F., CARVALHO, T. M. U., HEISE, N. **The toxic effects of piperine against *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural alterations and reversible blockage of cytokinesis in epimastigote forms.** Parasitology Research, 102(5), p. 1059–1067, 2008.
- FREITAS, J. J. R., SILVA, E. E., REGUEIRA, J. L. L. F., DE ANDRADE, S. A., CALVALCANTE, P. M. M., OLIVEIRA, R. N., FREITAS FILHO, J. R. **1,2,4-Oxadiazóis: Síntese e aplicações.** Revista Virtual de Química, 4 (6), p. 670-691, 2012.
- GARELLA, D., BORRETTO, E., DI STILO, A., MARTINA, K., CRAVOTTO, G., CINTAS, P. **Microwave-assisted synthesis of N-heterocycles in medicinal chemistry.** MedChemComm, 4(10), p. 1323–1343, 2013.
- GEDYE, R., SMITH F., WESTAWAY K., ALI H., BALDISERA L., LABERGE L., ROUSELL J. **The use of microwave ovens for rapid organic synthesis.** Tetrahedron Letters, 27(3), p. 279-282, 1986.
- GIGUERE, R. J., BRAY, T. L., DUNCAN, S. M., MAJETICH, G. **Application of commercial microwave ovens to organic synthesis.** Tetrahedron Letters, 27(41), p. 4945–4948, 1986.
- GULL, K. **The cytoskeleton of trypanosomatid parasites.** Annual Reviews in Microbiology, 53(1), p. 629-655, 1999.
- GUPTA, R. R., KUMAR, M., GUPTA, V. **Heterocyclic Chemistry: Volume II: Five membered Heterocycles.** 1st ed. India. Springer Science & Business Media. p. 257-302, 2005.
- HARVEY, A. **Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products.** Drug Discovery Today, 5(7), p. 294-300, 2000.

HOSTETTMANN, K., QUEIROZ, E. F., VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. Série de Textos da Escola de Verão em Química - IV-UFSCar, EDUFSCar, 2003.

KABOUDIN, K., NAVAE, K. **One-pot synthesis of 1,2,4-oxadiazoles mediated by microwave irradiation under solvent-free condition**. *Heterocycles*, 60 (10), 2287-2292, 2003.

KAPIL, A. **Piperine: a potent inhibitor of *Leishmania donovani* promastigotes in vitro**. *Planta Medica*, 59, p. 474-474, 1993.

KIER, L. B., ROCHE, E. B. **Medicinal chemistry of mesoionic compounds**, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56(2), p. 149-168, 1967.

KOUL, S., KOUL, J. L., TANEJA, S. C., DHAR, K. L., JAMWAL, D. S., SINGH, K., REEN, R. K., SING, J. **Structure-activity relationship of piperine and its synthetic analogues for their potentials of rat hepatic microsomal constitutive and inducible cytochrome P450 activities**. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 8(1), p. 251-268, 2000.

LÄHTEENMÄKI, L., SIEVI, E., VAPAATALO, H. **Inhibitory effects of mesoionic 3-aryl substituted oxatriazole-5-imine derivatives on vascular smooth muscle cell mitogenesis and proliferation in vitro**, *British Journal of Pharmacology*, 125, p. 402-408, 1998.

LEITE DIAS, J. V., MOTA QUEIROZ, D. R., DIOTAIUTI, L., & ROCHA PIRES, H. H. **Conhecimentos sobre triatomíneos e sobre a doença de Chagas em localidades com diferentes níveis de infestação vetorial**. *Revista Ciência & Saúde Coletiva*, 21(7), 2016.

LEPESHEVA, G.; VIRUS, C.; WATERMAN, M. R.; **Conservation in the CYP51 family. Role of the B' helix/BC loop and hélices F and G in enzymatic function**. *Biochemistry*, 42, 9091-9101, 2003.

LEPESHEVA, G.; ZAITSEVA, N. G.; NES, W. D.; ZHOU, W.; ARASE, M.; LIU, J.; HILL, G. C.; WATERMAN, N. **CYP51 from *Trypanosoma cruzi* a phyla-specific residue in the B' helix defines substrate preferences of sterol 14 $\alpha$ -demethylase**. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 3577-3585, 2006.

L'HERNAULT, S. W., ROSEMBAUM, J. L. ***Chlamydomonas*  $\alpha$ -tubulin is posttranslationally modified in the flagella during flagellar assembly**. *The Journal of Cell Biology*, 97(1), p. 258-269, 1983.

LIDSTROM, P., TIERNEY, J., WATHEY, B., WESTMAN, J. **Microwave assisted organic synthesis – a review**. *Tetrahedron*, 57(45), p. 9225-9283, 2001.

LIMA, L. M., BARREIRO, E. J. **Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design**. *Current Medicinal Chemistry*, 12(1), p. 23-49, 2005.

- LIU, Q., ZHU, R., GAO, S., MA, S.-H., TANG, H.-J., YANG, J.-J., DIAO, Y.-M., WANG, H.-L. AND ZHU, H.-J. **Structure-based bioisosterism design, synthesis, insecticidal activity and structure-activity relationship (SAR) of anthranilic diamides analogs containing 1,2,4-oxadiazole rings.** Pest Management Science, p. 4363, 2016.
- MACHADO, A. S. C. **Da gênese ao ensino da química verde.** Química Nova, 34(3), p. 535-543, 2011.
- MAFTEI, C. V., FODOR, E., JONES, P. G., DANILIUC, C. G., FRANZ, M. H., KELTER, G., FIEBIG, H. H., TAMM, M., NEDA, I. **Novel 1,2,4-oxadiazoles and trifluoromethylpyridines related to natural products: synthesis, structural analysis and investigation of their antitumor activity.** Tetrahedron, 72, p. 1185-1199, 2016.
- MASON, T. J. **Ultrasound in synthetic organic chemistry.** Chemical Society Reviews, 26(6), p. 443-451, 1997.
- MAVROVA, A. T., WESSELINOVA, D., TSENOV, Y. A., DENKOVA, P. **Synthesis, cytotoxicity and effects of some 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives on immunocompetent cells.** European Journal of Medicinal Chemistry, 44, p. 63-69, 2009.
- MAYA, J. D., CASSELS, B. K., ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P., FERREIRA, J., FAUNDEZ, M., GALANTI, N., FERREIRA, A., MORELLO, A. **Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host.** Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 146(4), p. 601-620, 2007.
- MCKERROW, J. H., ROSENTHAL, P. J., SWENERTON, R., DOYLE, P. **Development of protease inhibitors for protozoan infections.** Current Opinion in Infectious Diseases, 21(6), p. 668, 2008.
- MOSELEY, J. D. **Microwave Chemistry – Green or Not?** Chem. World , 3(8), p. 34, 2011.
- NAM, N. H. **Combretastatin A-4 Analogues as Antimitotic Antitumor Agents.** Current Medicinal Chemistry, 10, p. 1697-1722, 2003.
- NEWMANN, D. J., CRAGG, G. M. **Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014.** Journal of Natural Products, 79, p. 629-661, 2016.
- NINGAIAH, S., BHADRAIAH, U. K., KESHAVAMURTHY, S., JAVARASETTY, C. **Novel pyrazoline amidoxime and their 1,2,4-oxadiazole analogues: Synthesis and pharmacological screening.** Bioorganic & Medicinal Mhemistry Letters, 23, p. 4532-4539, 2013.

NOBELI, I. , PRICE, S. L. , LOMMERSE, J. P. M. , TAYLOR, R. **Hydrogen bonding properties of oxygen and nitrogen acceptors in aromatic heterocycles**. Journal of Computational Chemistry, 18(16), p. 2060-2074, 1997.

OLESEN, P. H., TONDER, J. E., HANSEN, J. B., HOLGER, C. H., RIMVALL, K. **Bioisosteric replacement strategy for the synthesis of 1-azacyclic compounds with high affinity for the central nicotinic cholinergic receptor**. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 8, p. 1443-1450, 2000.

PARK I. K., LEE S. G., SHIN S. C., PARK J. D., AHN Y. J. **Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(7), p. 1866-1870, 2002.

PAULL, K. D., SHOEMAKER, R. H., BOYD, M. R., PARSONS, J. L., RISBOOD, P. A., BARBERA, W. A., SHARMA, M. N., BAKER, D. C., HAND, E., SCUDIERO, D. A., MONKS, A., ALLEY, M. C., GROTE, M. **The synthesis of XTT: A new tetrazolium reagent that is bioreducible to a water-soluble formazan**. Journal of Heterocyclic Chemistry, 25(3), p. 911-914, 1988.

PEARL, I. A., & BEYER, D. L. **Reactions of vanillin and its derived compounds. Xi. 1 cinnamic acids derived from vanillin and its related compounds**. The Journal of Organic Chemistry, 16(2), p. 216-220, 1951.

REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 856, 2001.

RIBEIRO, T. S., FREIRE-DE-LIMA, L., PREVIATO, J. O., MENDONÇA-PREVIATO, L., HEISE, N., LIMA, M. E. F. **Toxic effects of natural piperine and derivatives on epimastigotes and amastigotes forms of *Trypanosoma cruzi***. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 14, p. 3555-3558, 2004.

ROBINSON, D., BEATTIE, P., SHERWIN, T., GULL, K. **Microtubules, tubulin, and microtubule-associated proteins of Trypanosomes**. Methods in Enzymology, 196, p. 285-296, 1991.

ROEHM, N. W., RODGERS, G. H., HATFIELD, S. M., & GLASEBROOK, A. L. **An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT**. Journal of Immunological Methods, 142(2), p. 257-265, 1991.

SAJID, M.; MCKERROW, J. H. **Cysteine proteases of parasitic organisms**. Molecular and Biochemical Parasitology, 120(1), 2002.

SANGSHETTI, J. N., CHABUKSWAR, A. R., SHINDE, D. B. **Microwave assisted one pot synthesis of some novel 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazoles as antifungal agents**. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 21, 444-448, 2011.

SANTAGADA, V., FRECENTESE, F., PERISSUTI, E., CIRILLO, D., TERRACCIANO, S., CALIENDO, G. **A suitable 1,2,4-oxadiazoles synthesis by**

**microwave irradiation.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 14, p. 4491-4493, 2004.

SANTOS-FILHO, J. M., LEITE, A. C. L., OLIVEIRA, B. G., MOREIRA, D. R. M., LIMA, M. S., SOARES, M. B. P., LEITE, L. F. C. C. **Design, synthesis and cruzain docking of 3-(4-substituted-aryl)-1,2,4-oxadiazole-N-acylhydrazones as anti-*Trypanosoma cruzi* agents.** Bioorganic and Medicinal Chemistry, 17, p. 6682-6691, 2009.

SANTOS-FILHO, J. M., SILVA, D. M. A. Q., MACEDO, T. S., TEIXEIRA, H. M. P., MOREIRA, D. R. M., CHALLAL, S., WOLFENDER, J. L., QUEIROZ, E. F., SOARES, M. B. P. **Conjugation of N-acylhydrazone and 1,2,4-oxadiazole leads to the identification of active antimalarial agents.** Bioorganic & Medicinal Chemistry 24, p. 5693–5701, 2016.

SCHRAUZER, G. N. **Ein Beitrag zum Mechanismus der Meerwein-Reaktion.** Chemische Berichte, 94(7),p. 1891-1898, 1961.

SEEBER, F., & BOOTHROYD, J. C. ***Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase as a *in vitro* and *in vivo* reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*.** Gene, 169, p.39–45, 1996.

SEEDBECK, T., HEMPHILL, A., LAWSON, D.. **The cytoskeleton of Trypanosomes.** Parasitology Today, 6, 49–52, 1990.

SEMLER, U., GROSS, G. G. **Distribution of piperine in vegetative parts of *Piper nigrum*.** Phytochemistry, 27(5), p. 1566-1567, 1988.

SHARMA, S., GANGAL, S., & RAUF, A. **An efficient, one-pot synthesis of novel 3, 5-disubstituted-1, 2, 4-oxadiazoles from long-chain carboxylic acid derivatives.** Acta Chim Sol, 56, p. 369-372, 2009.

SHINZATO, T. O., GRYNBERG, N. F., GOMES, R. M., ECHEVARRIA, A., MILLER, J. **Antitumor activity of a new mesoionic compound of the 1,3,4-triazolium-5-thiolate class.** Medical Science Research, 17, p. 865-866, 1989.

SILVA, E. F., CANTO-CAVALHEIRO, M. M., BRAZ, V. R., CYSNE-FINKELSTEIN, L., LEON, L. L., ECHEVARRIA, A. **Synthesis, and biological evaluation of new 1,3,4-thiadiazolium-2-phenilamine derivatives against *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes,** European Journal of Medicinal Chemistry, 37, p. 979-984, 2002.

SINGH, I. P., JAIN, S. K., KAUR, A., SINGH, S., KUMAR, R., GARG, P., SHARMA, S. S., ARORA, S. K. **Synthesis and antileishmanial activity of piperoyl-amino acid conjugates.** European Journal of Medicinal Chemistry, 45, p. 3439-3445, 2010.

- SOARES, B. A. **Síntese e avaliação da atividade antichagásica de novos derivados 1,2,4-oxadiazólicos, derivados e análogos da amida natural piperina**. Dissertação de mestrado. PPGQ-UFRRJ, p. 180, 2009.
- SOARES, C., DE CARVALHO, E. F., URMÉNYI, T. P., CARVALHO, O., FRANCISCO, J., DE CASTRO, F. T., & RONDINELLI, E.  **$\alpha$ -and  $\beta$ -tubulin mRNAs of *Trypanosoma cruzi* originate from a single multicistronic transcript**. FEBS Letters, 250(2), p. 497-502, 1989.
- SOLOMONS, T. W. G., FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**, vol. 2, 9ª edição. Rio de Janeiro, LTC, p. 209-211, 2009.
- SOUZA, W. D., & MEYER, H. **On the fine structure of the nucleus in *Trypanosoma cruzi* in tissue culture forms. Spindle fibers in the dividing nucleus**. The Journal of protozoology, 21(1), 48-52, 1974.
- SRIVASTAVA, R. M., BRINN, I. M., MACHUCA-HERRERA, J. O., FARIA, H. B., CARPENTER, G. B., ANDRADE, D., VENKATESH, C. G., DE MORAIS, L. P. F. **Benzamidoximes: structural, conformational and spectroscopic studies. I**. Journal of Molecular Structure, 406(1), p. 159-167, 1997.
- STAAB, H. A., & WENDEL, K. **1, 1'-Carbonyldiimidazole**. Organic Syntheses, p. 44-44, 1973.
- TAVARES, W. S., CRUZ, I., PETACCI, F., FREITAS, S. S., SERRATILDE, J. E., & ZANUNCIO, J. C. **Insecticide activity of piperine: Toxicity to eggs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) and phytotoxicity on several vegetables**. Journal of Medicinal Plants Research, 5(21), p. 5301-5306, 2011.
- TIEMANN, F., KRUGER, P. **Ueber amidoxime und azoxime**. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 17(2), p. 1685-1698, 1884.
- TIETZE L. F., EICHER, T. **Reactions and Synthesis in the Organic Chemistry Laboratory**. University Science Books, 1st de. USA, p. 379, 1989.
- TRON, G. C., PIRALI, T., BILLINGTON, R. A., CANONICO, P. L., SORBA, G., GENAZZANI, A. A. **Click chemistry reactions in medicinal chemistry: applications of the 1,3-dipolar cycloadditions between azides and alkynes**. Medicinal Research Reviews, 28(2), p. 278-308, 2008.
- UCHIYAMA, N. **Antichagasic activity of natural products against *Trypanosoma cruzi***. Journal of Health Science, 55(1), p. 31-39, p. 2009.
- URBINA, J. A. **Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites**. Parasitology, 114, s91-s99, 1997.
- VAN MEERLOO J, KASPERS GJ, CLOOS J. **Cell sensitivity assays: the MTT assay**. Cancer cell culture: methods and protocols, p.237-245, 2011.

VENIT, J. J., DIPIERRO, M., & MAGNUS, P. **Studies on the synthesis of 1-azaspiro [5.5] undecanes related to histrionicotoxin.** The Journal of Organic Chemistry, 54(18), p. 4298-4301, 1989.

VIEGAS-JUNIOR, C., DANUELLO, A., BOLZANI, V. S., BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M. **Molecular hybridization: A useful tool in the design of new drug prototypes.** Current Medicinal Chemistry, 14, p. 1829, 2007.

VOGEL, A. I. **Química Orgânica - Análise Orgânica Qualitativa.** O Livro Técnico AS, 3ª edição, 1978.

WEB OF SCIENCE DATABASE. Keyword: 1,2,4-oxadiazole, Filters: Chemistry Medicinal or Pharmacology Pharmacy, acesso em 31 de maio de 2016.

WENDEL, S. **Transfusion transmitted Chagas disease: Is it really under control?** Acta Tropica, 115, p. 28-34, 2010.

WERMUTH, C. G. **Molecular Variations Based on Isosteric Replacements.** The Practice of Medicinal Chemistry, Academic Press: London. cap. 13, p. 203-237, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Research priorities for chagas disease, human african trypanosomiasis and leishmaniasis.** 2012. Disponível em <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77472/1/WHO\\_TRS\\_975\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77472/1/WHO_TRS_975_eng.pdf?ua=1)>. Acesso em 20 de maio de 2016.

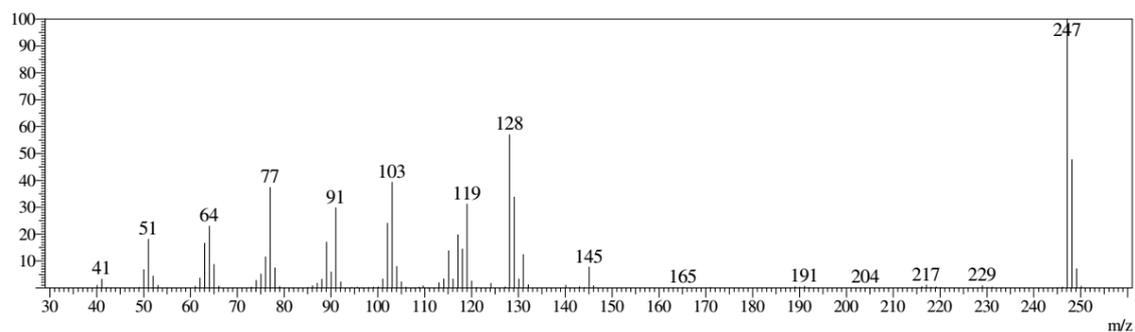
WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Trabalhando para superar o impacto global de doenças tropicais negligenciadas.** 2010. Disponível em <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44440/3/9789248564093\\_por.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44440/3/9789248564093_por.pdf)>. Acesso em 24 de abril de 2016.

<https://www.scopus.com> - Pesquisa na base de dados com o termo "*Trypanosoma cruzi*" junto com os respectivos nomes dos alvos.

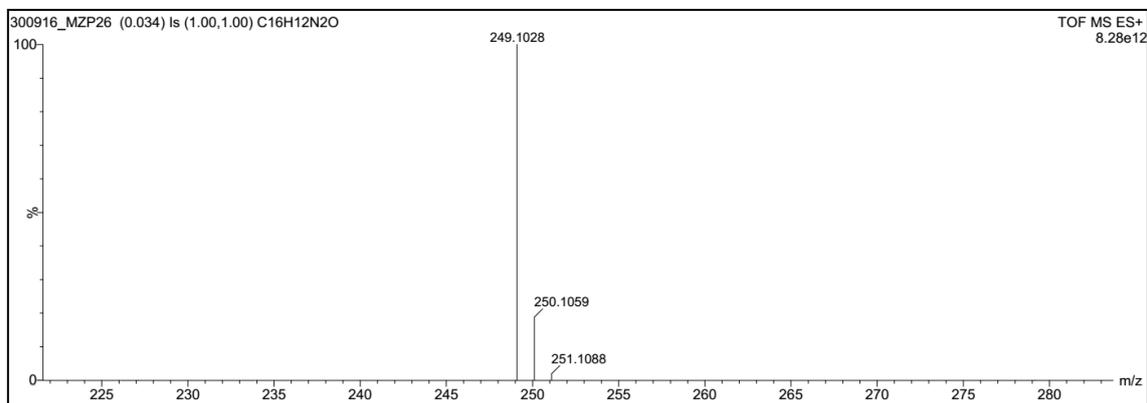
## 7. ANEXOS

### 7.1. Caderno de Espectros

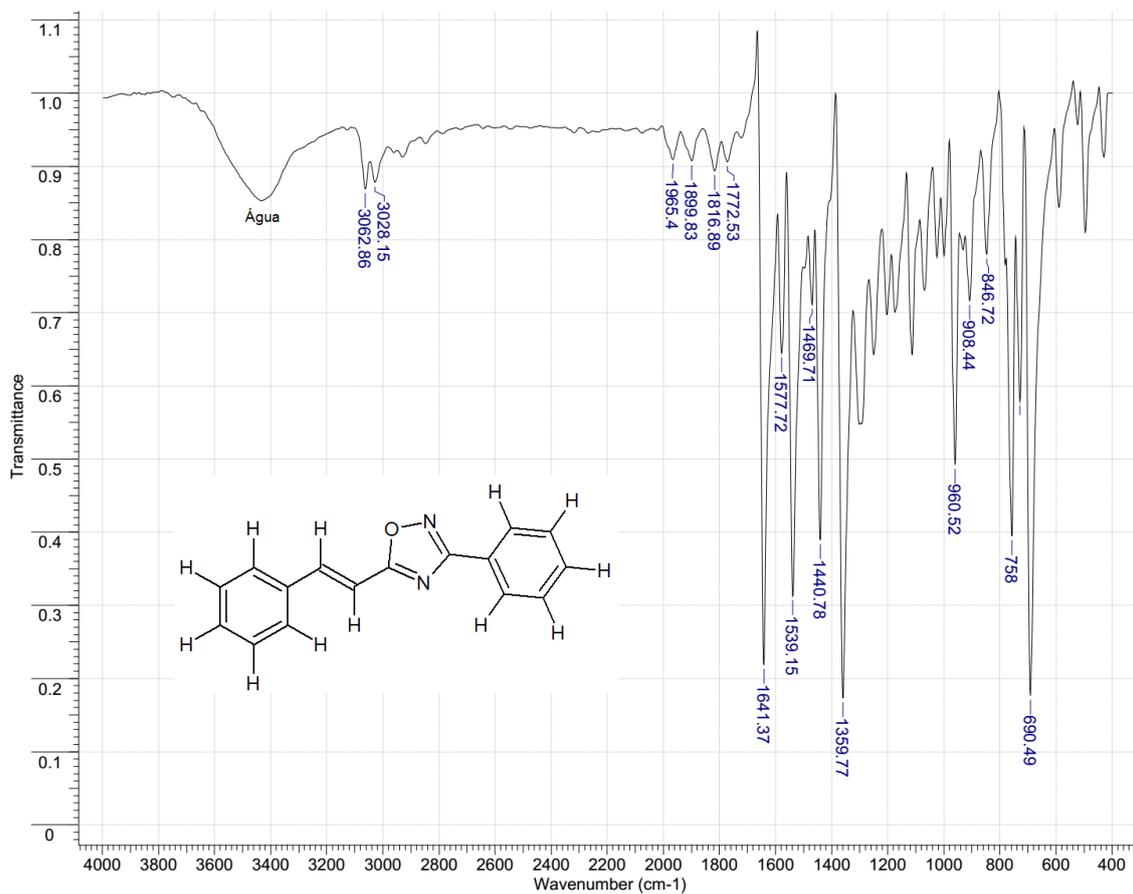
#### Derivado 69: 3-fenil-5-[(Z)-2-fenilvinil]-1,2,4-oxadiazol



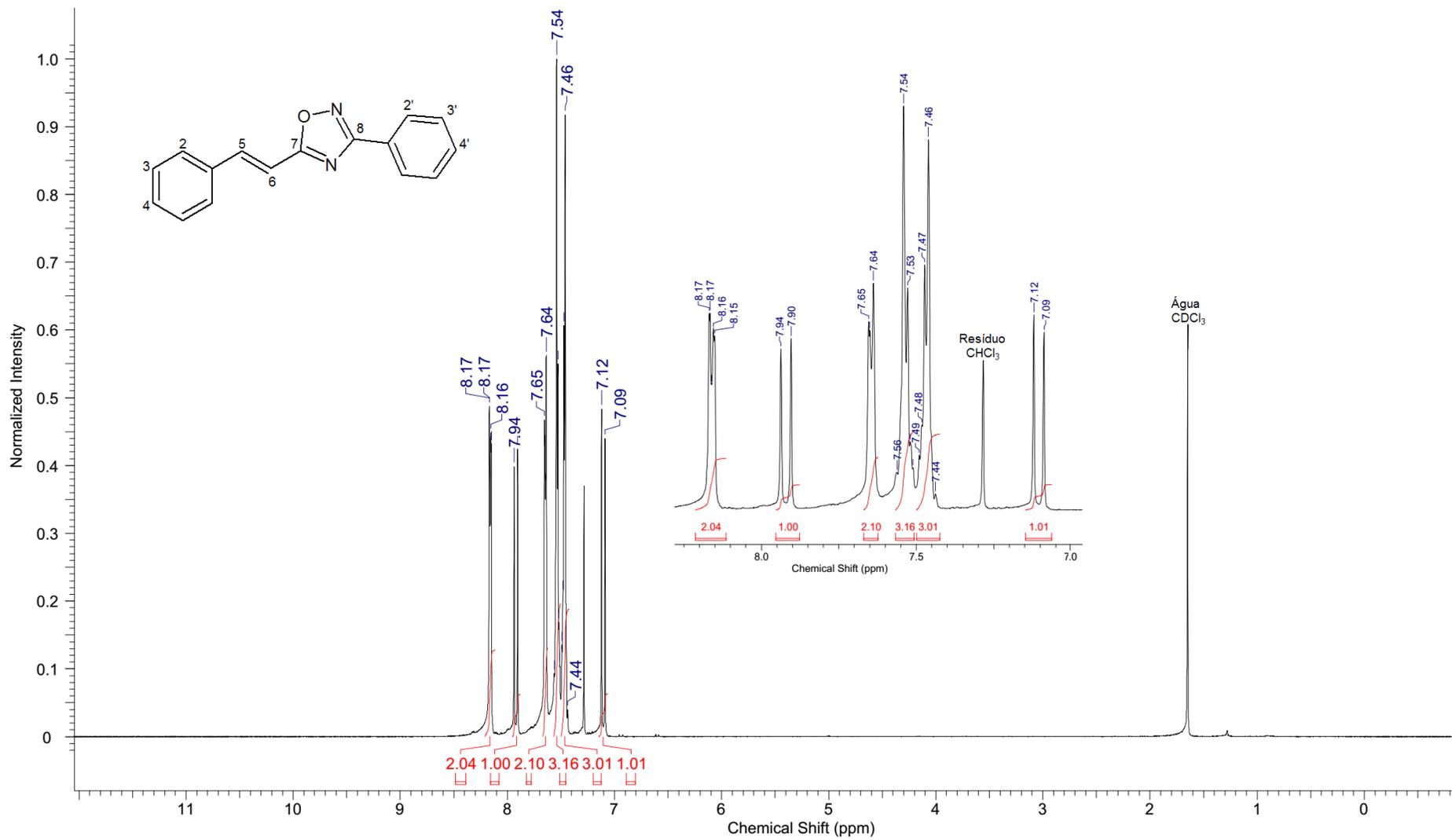
EMBR (IE, 70eV) para 69.



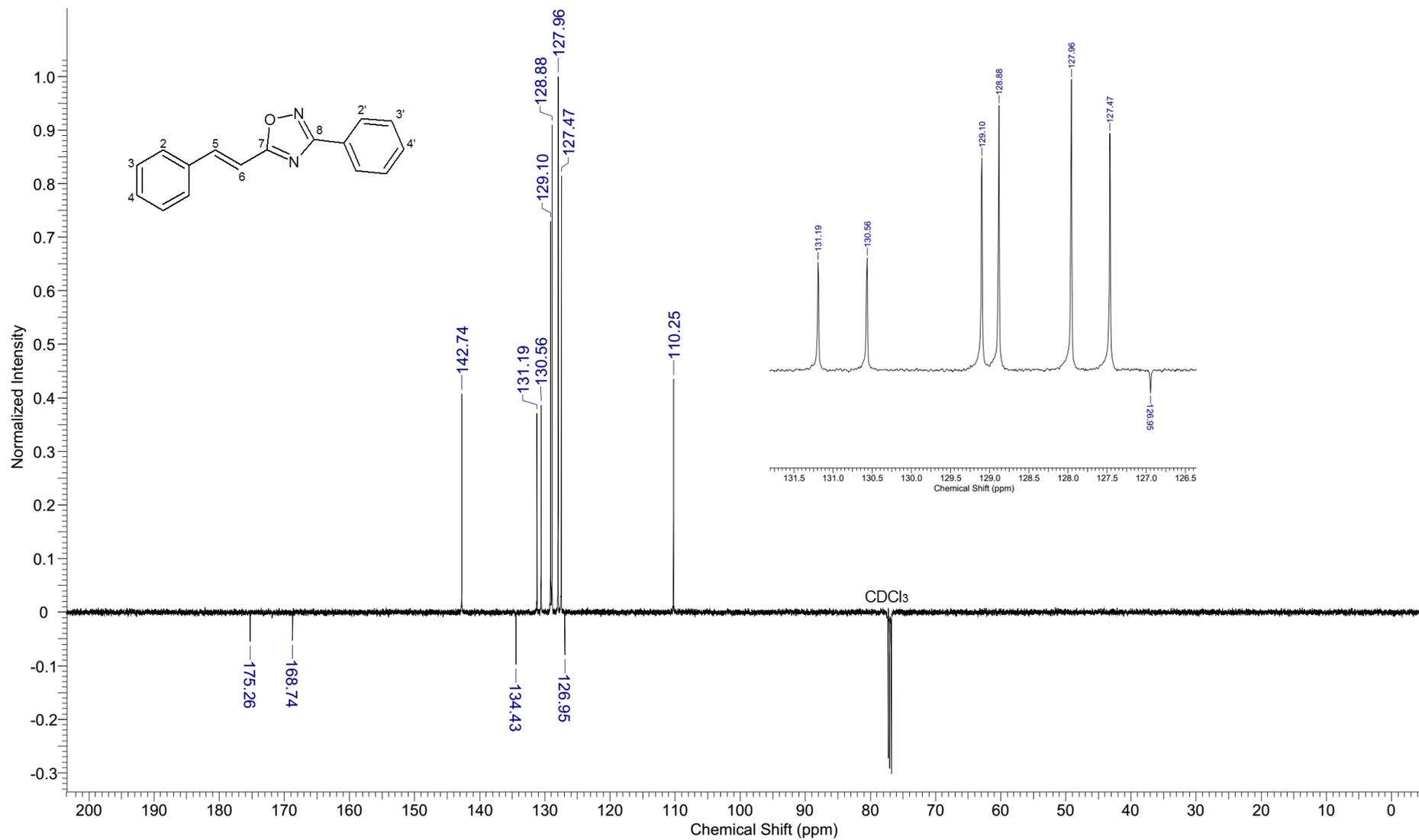
EMAR (ES+) para 69.



Espectro de IV (KBr) para **69**.

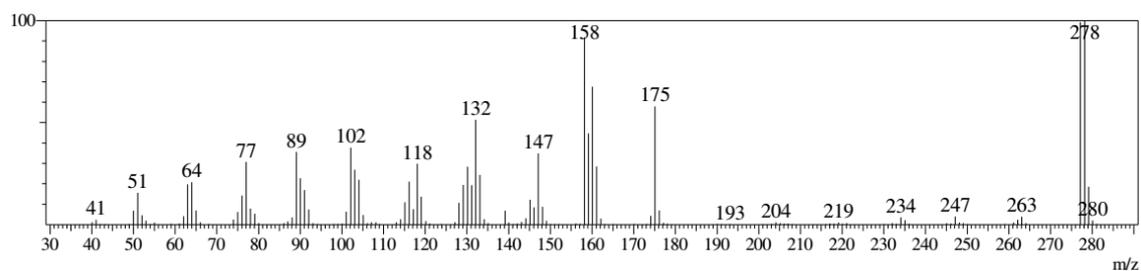


RMN<sup>1</sup>H (500MHz) para **69**.

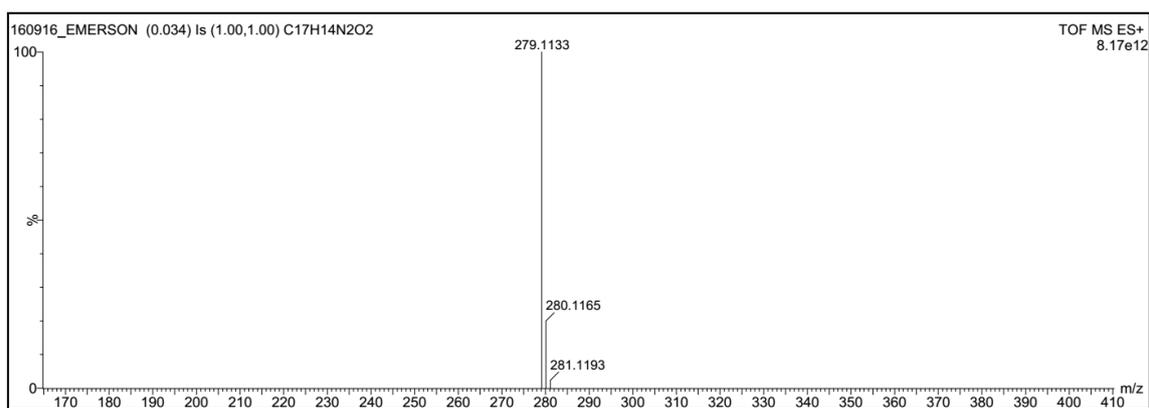


RMN<sup>13</sup>C (500MHz) para **69**.

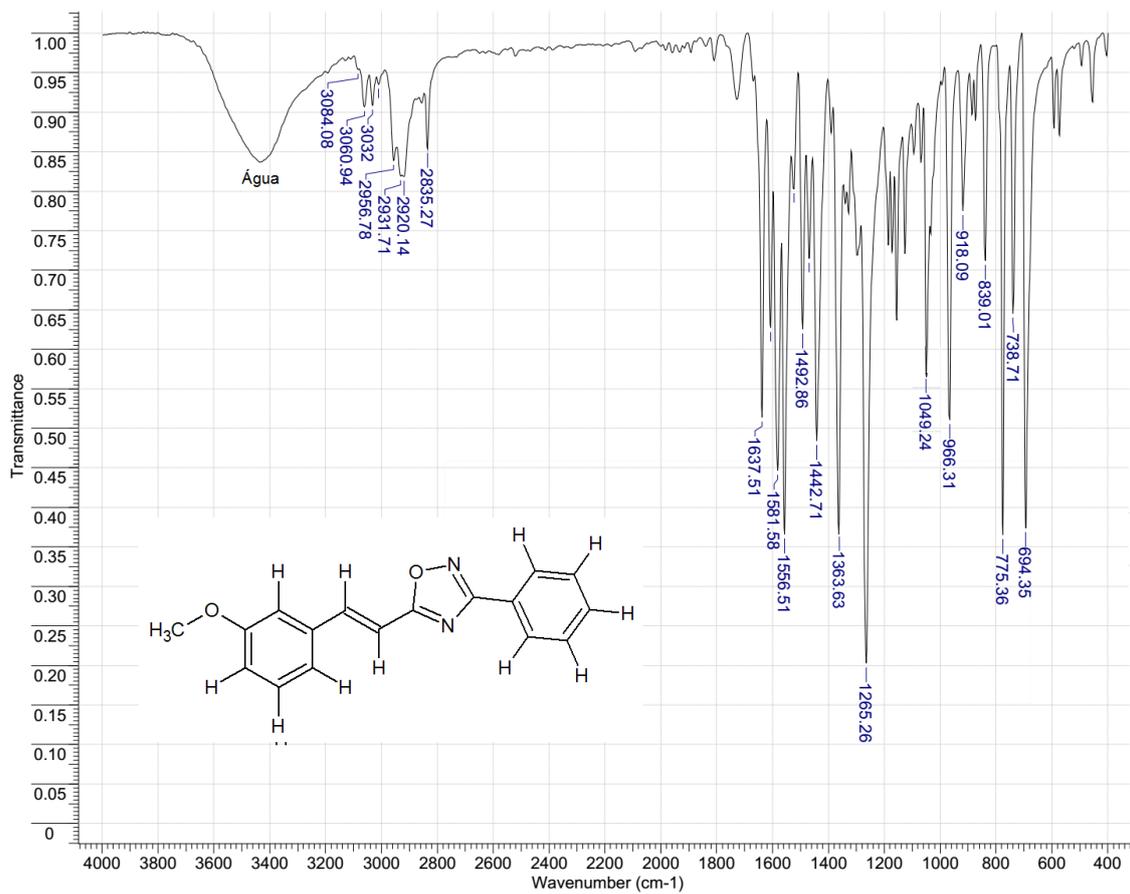
Derivado **70**: 5-[(Z)-2-(3-metóxfenil)vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol



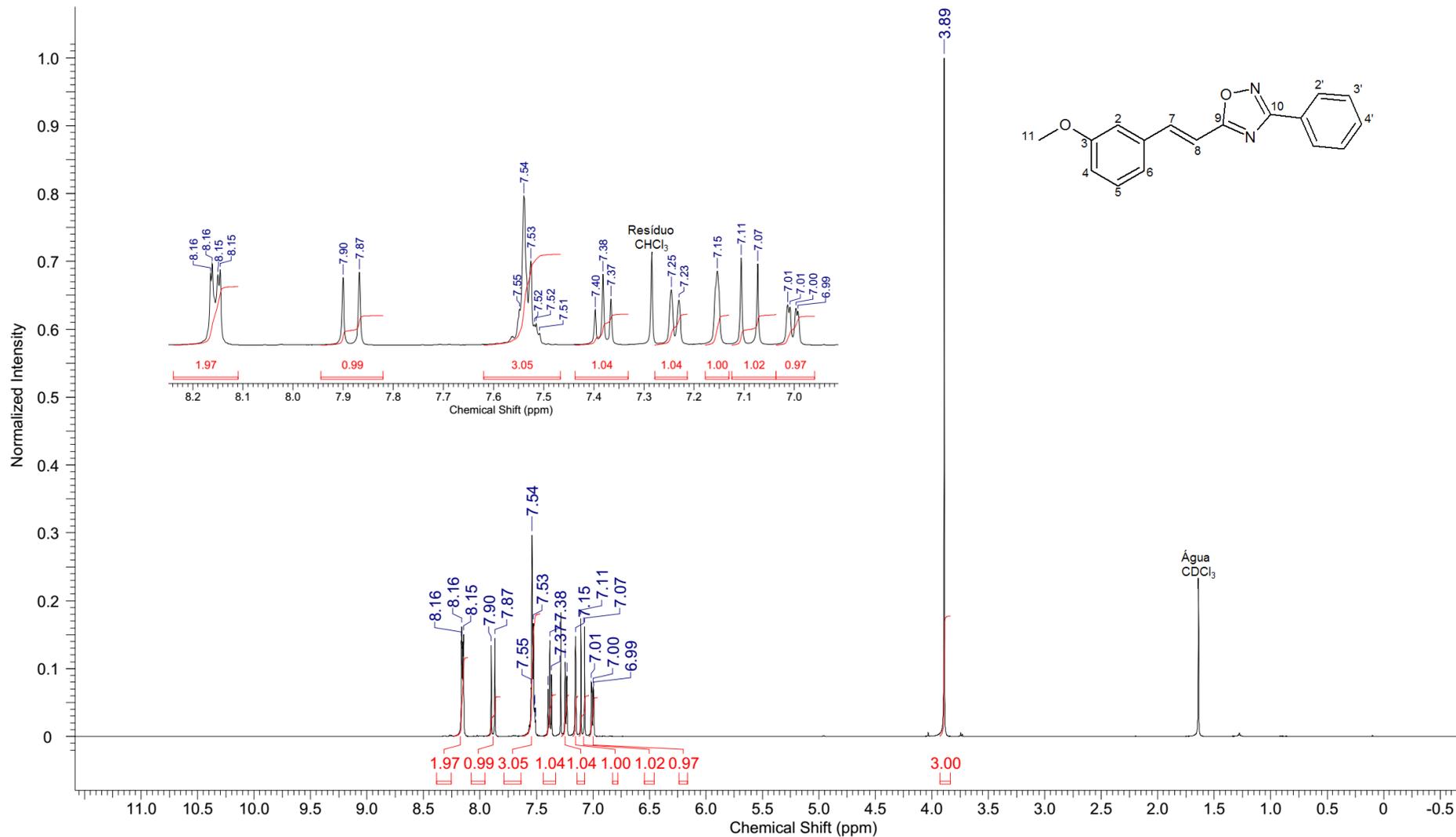
EMBR (IE, 70eV) para **70**.



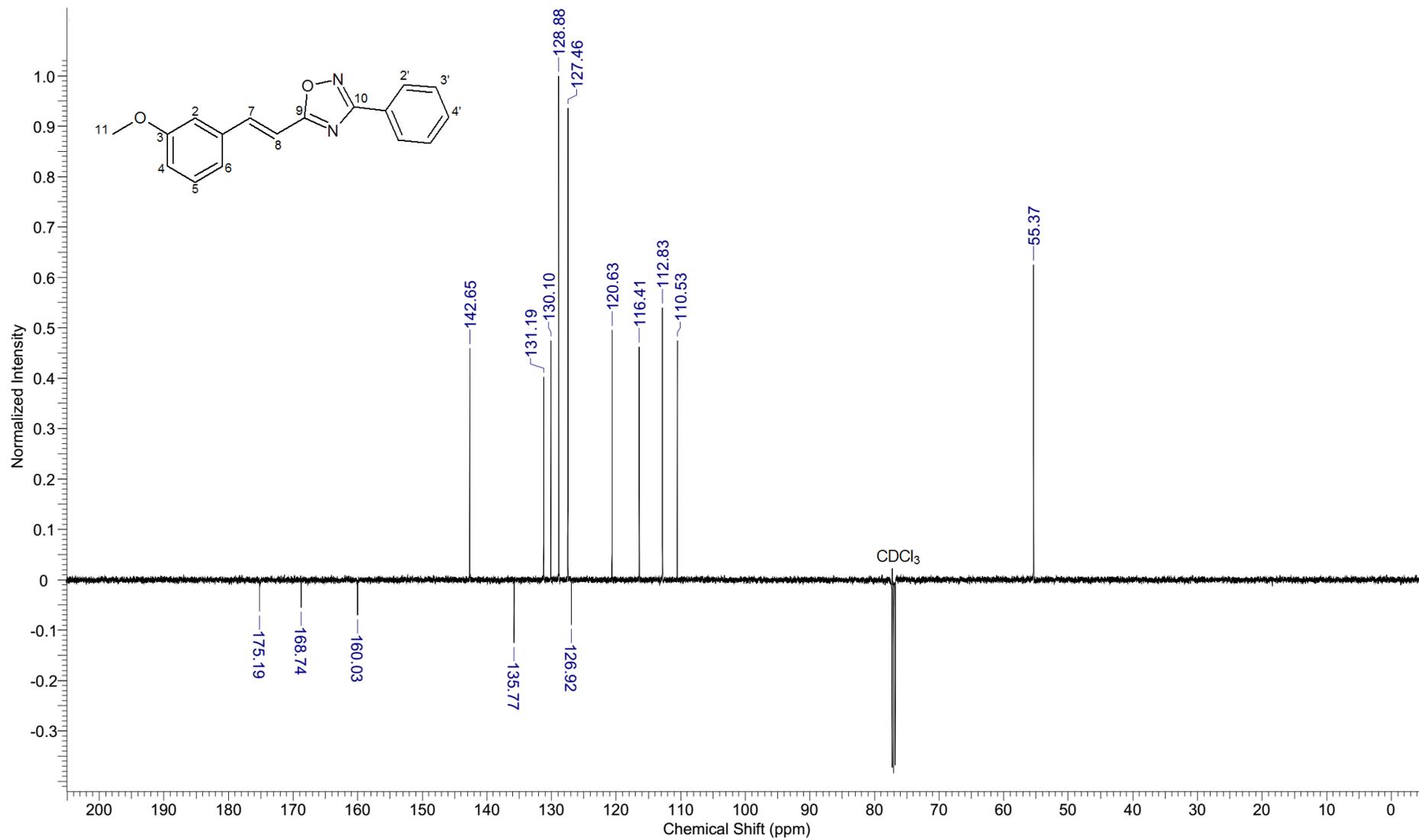
EMAR (ES+) para **70**.



Espectro de IV (KBr) para **70**.

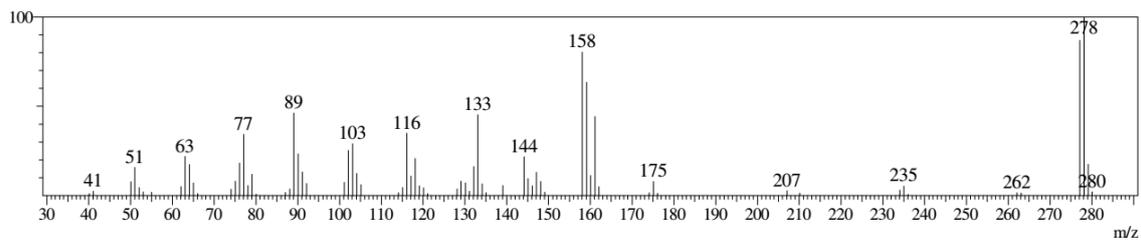


RMN<sup>1</sup>H (500MHz) para **70**.

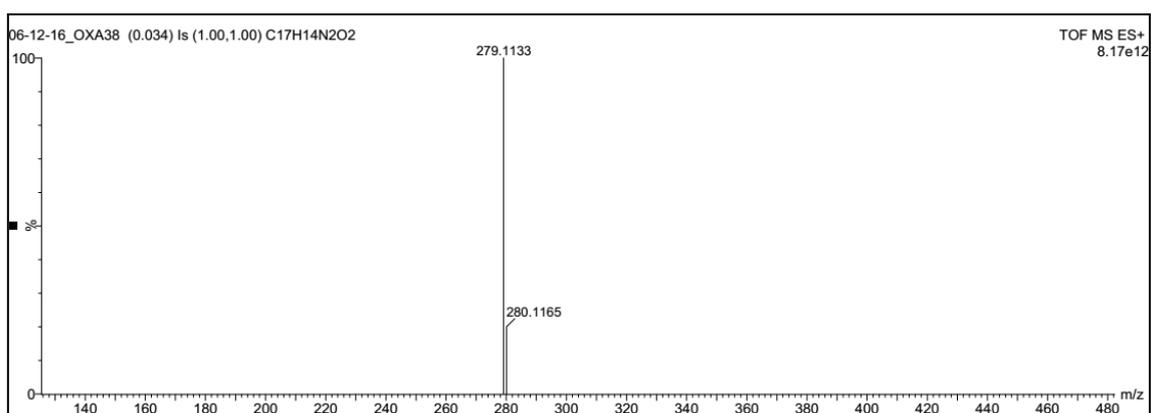


RMN $^{13}\text{C}$  (500MHz) para 70.

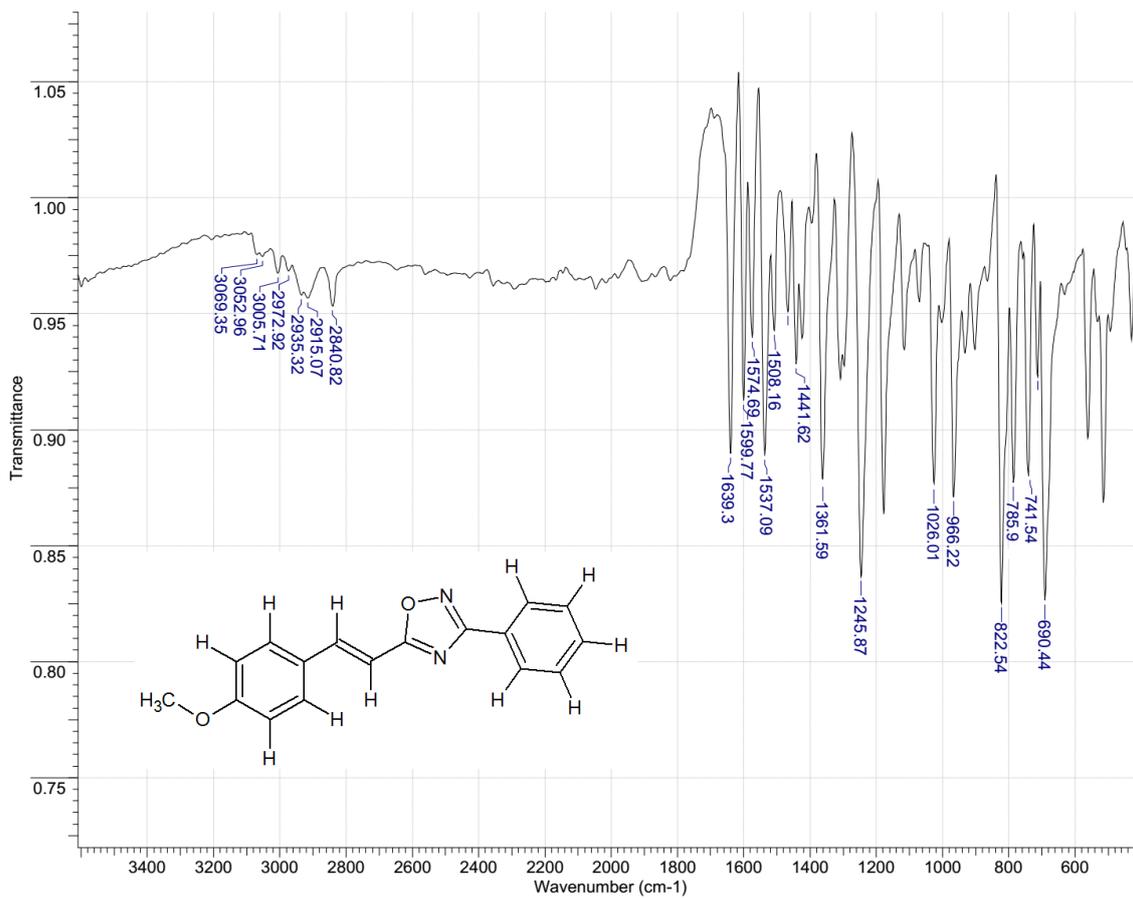
Derivado **71**: 5-[(Z)-2-(4-metóxifenil)vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol



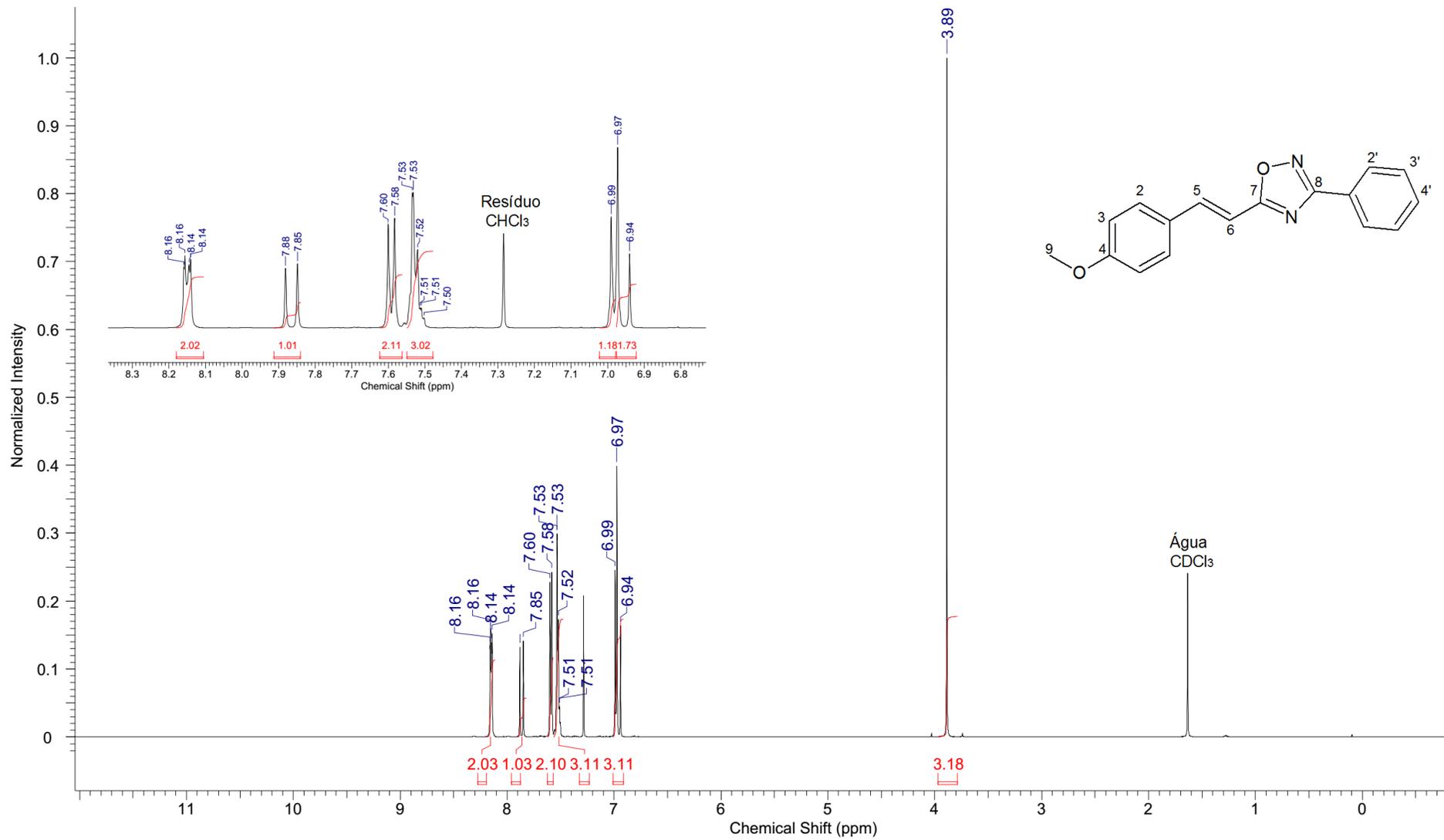
EMBR (IE, 70eV) para **71**.



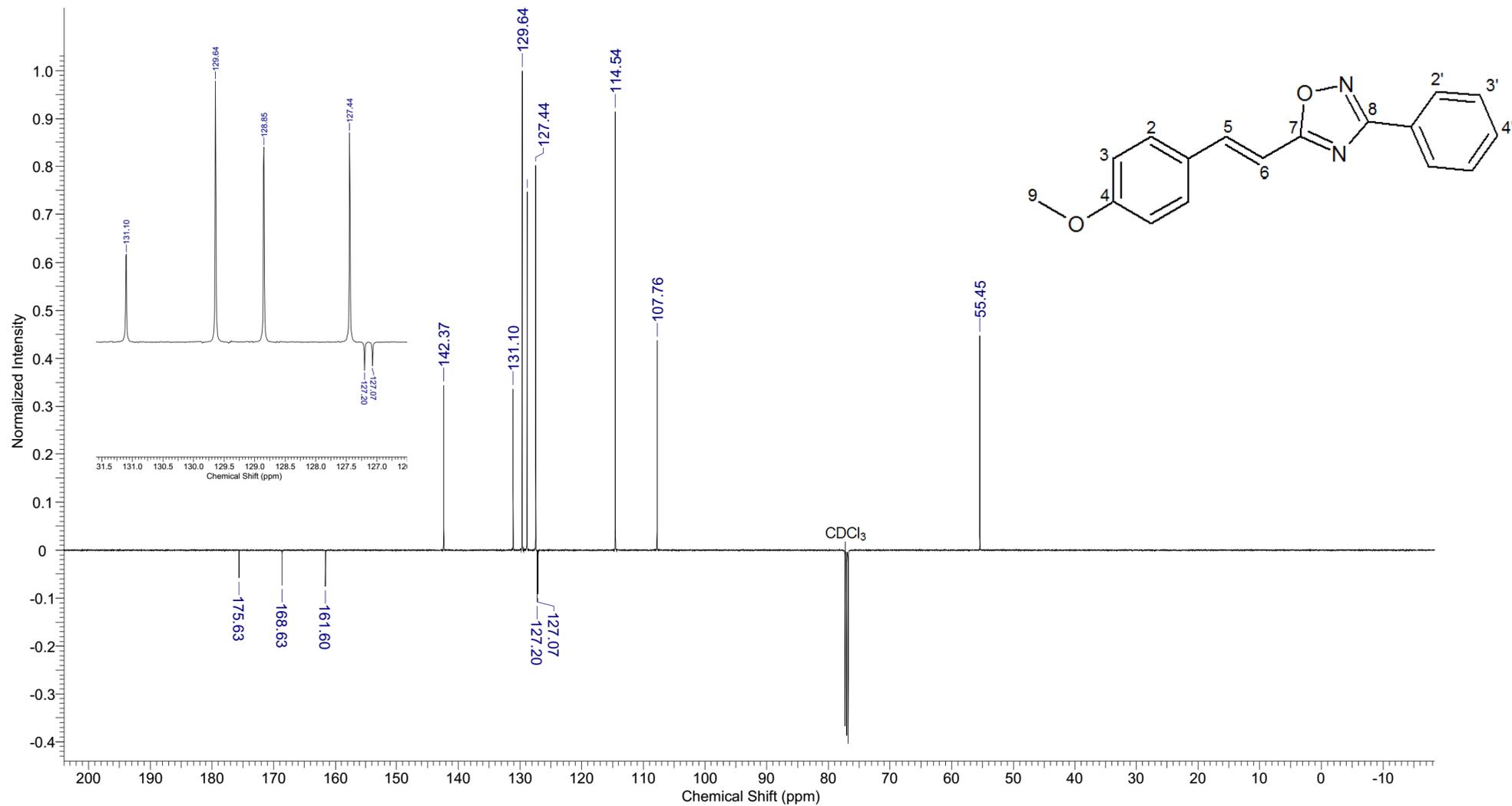
EMAR (ES+) para **71**.



Espectro de IV (KBr) para **71**.

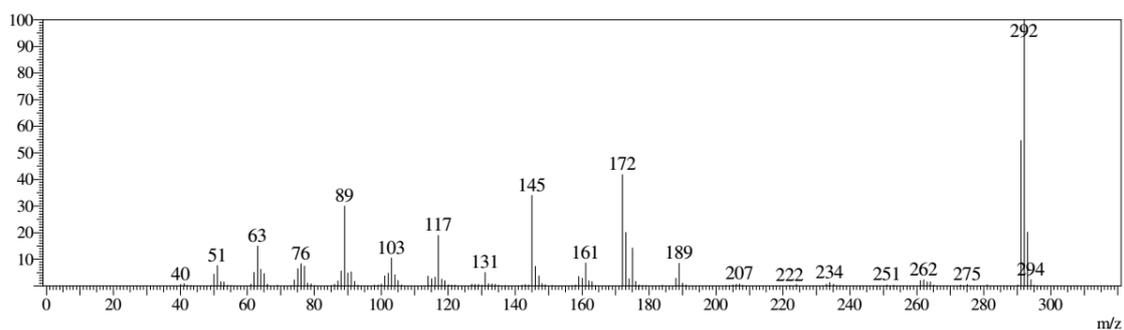


RMN<sup>1</sup>H (500MHz) para **71**.

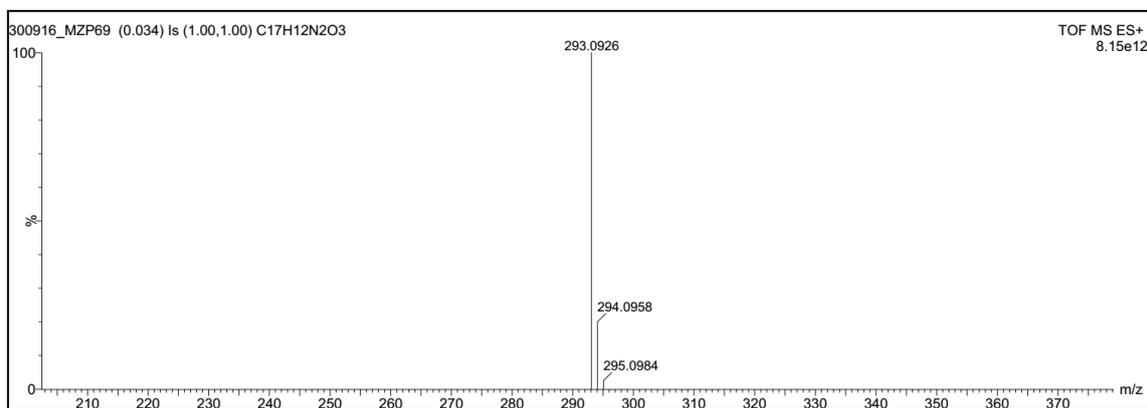


RMN<sup>13</sup>C (500MHz) para 71.

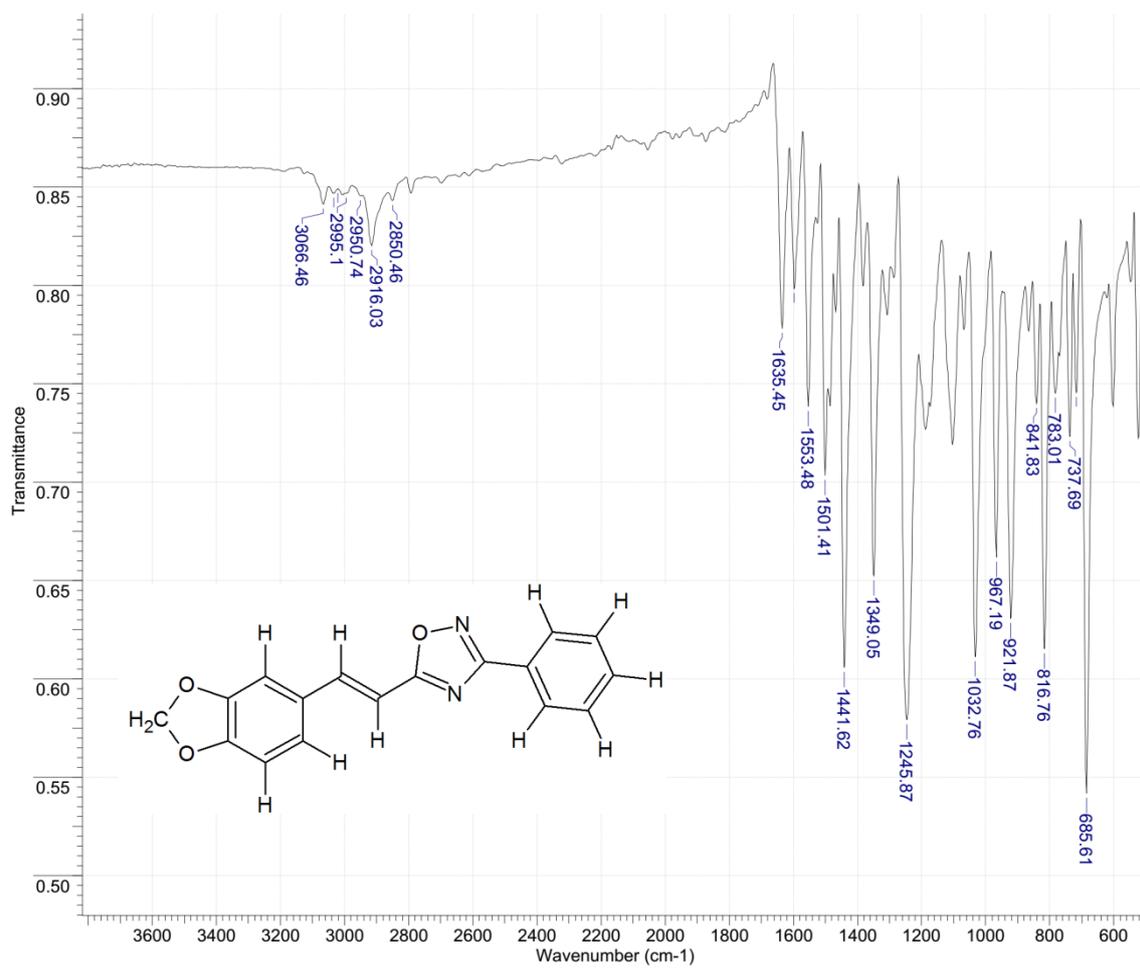
Derivado **72**: 5-[(*E*)-2-(1,3-benzodioxan-5-il)vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol



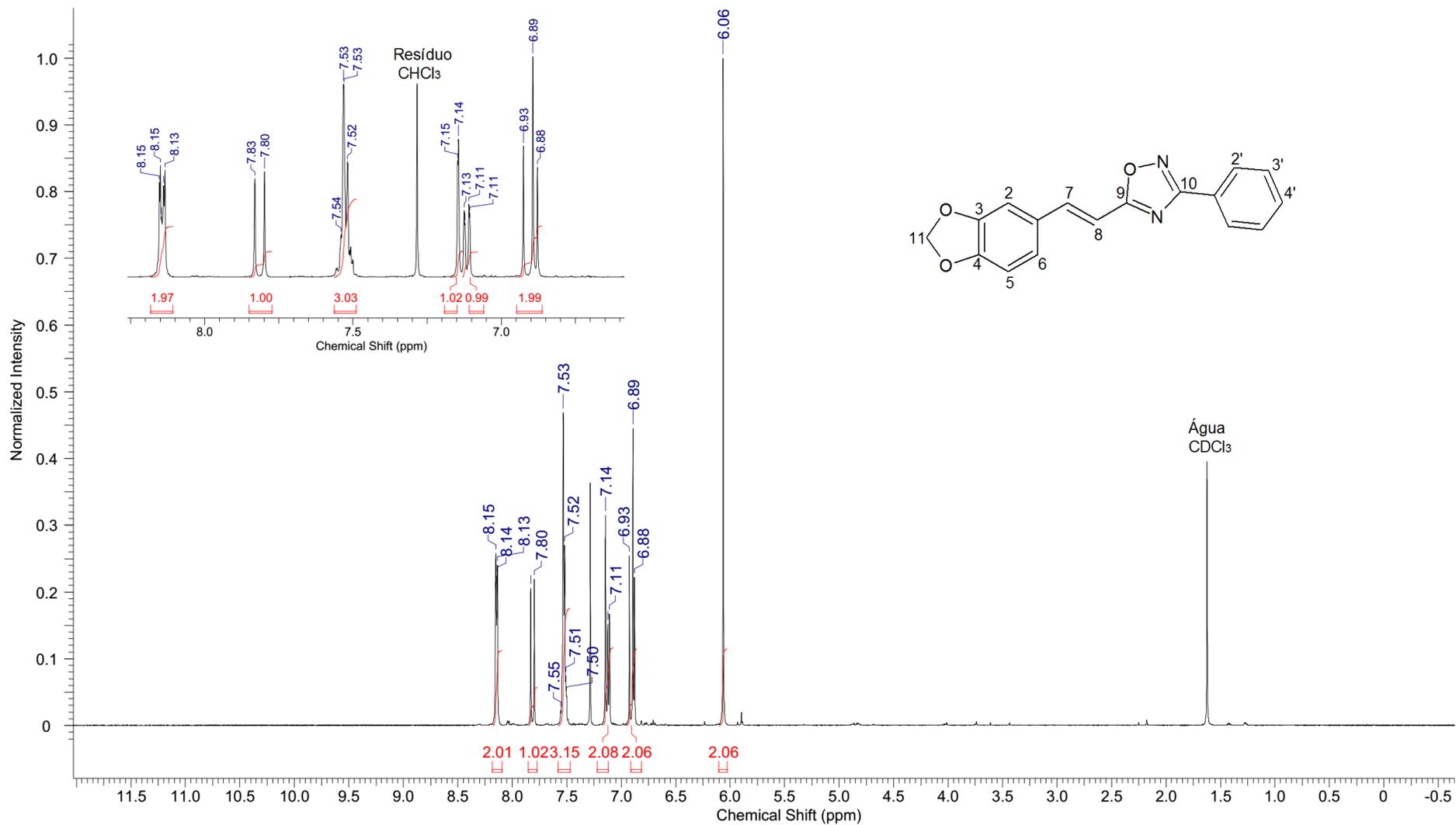
EMBR (IE, 70eV) para **72**.



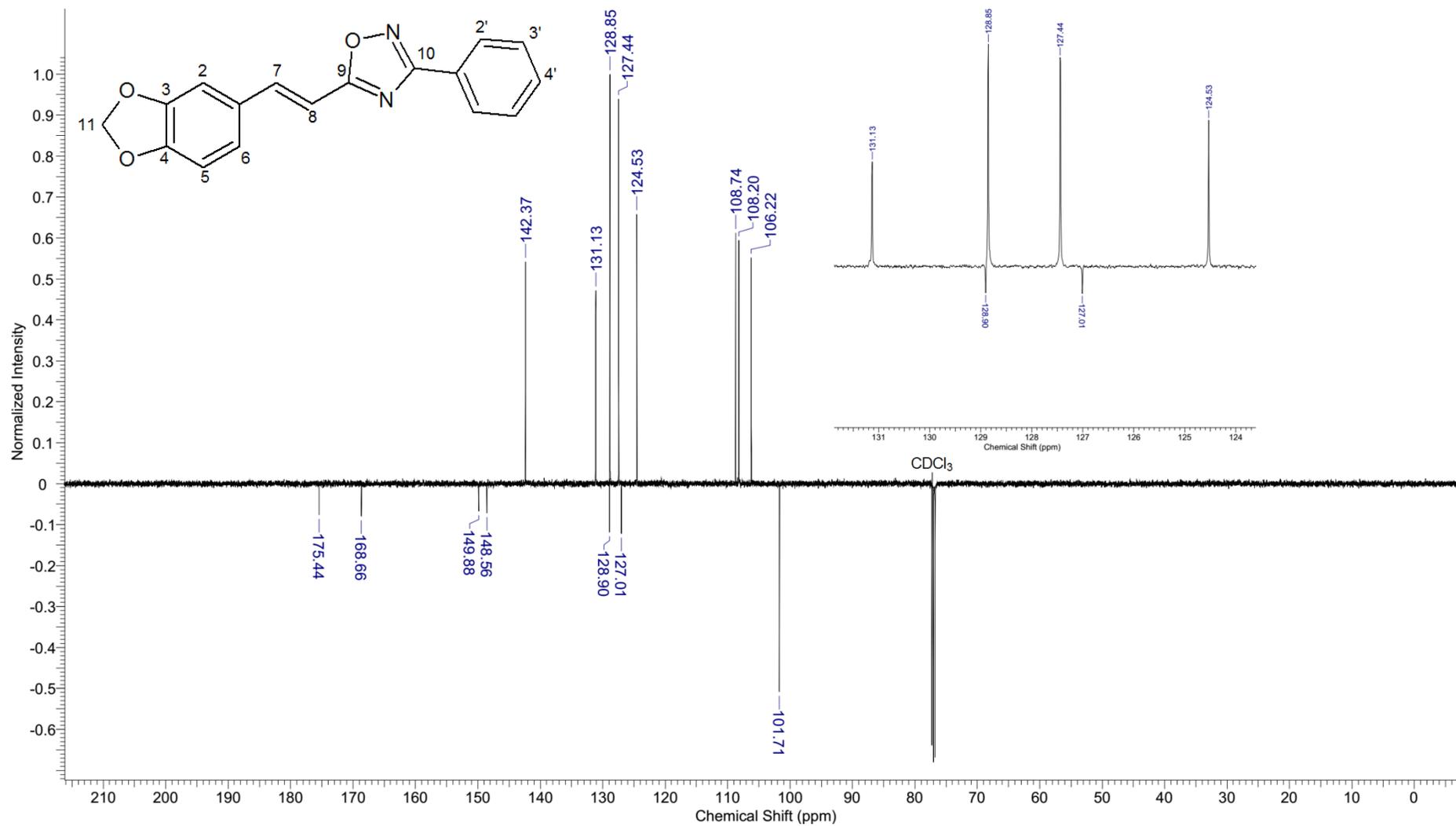
EMAR (ES+) para **72**.



Espectro de IV (KBr) para 72.

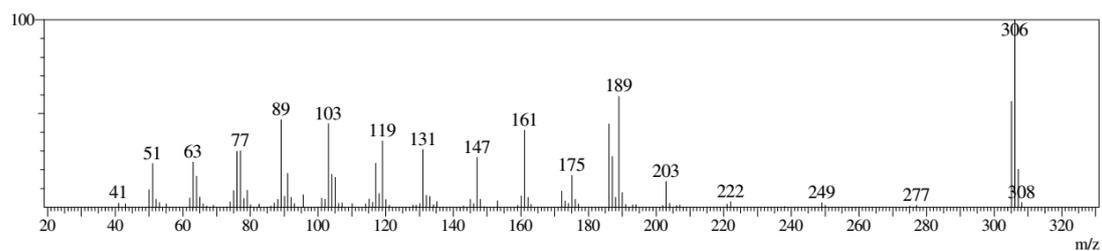


RMN<sup>1</sup>H (500MHz) para **72**.

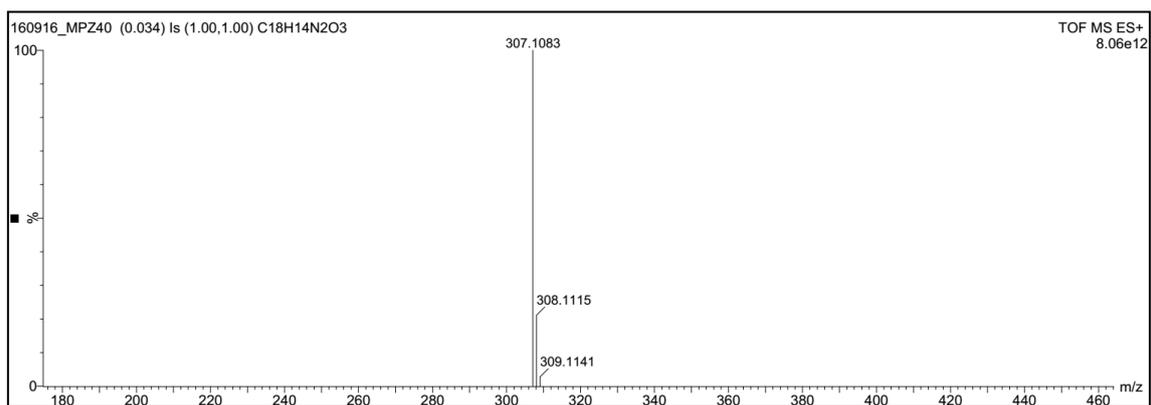


RMN<sup>13</sup>C (500MHz) para **72**.

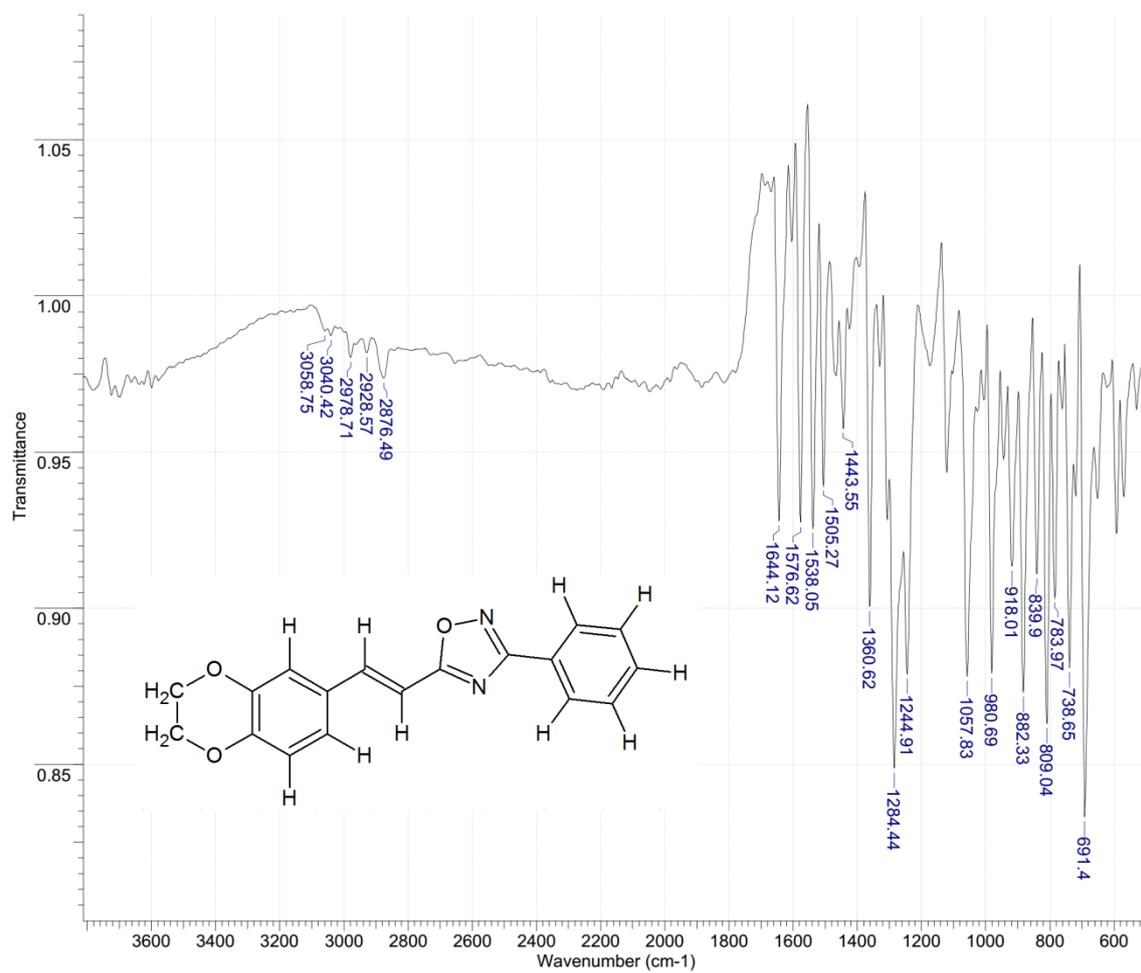
Derivado **73**: 5-[(*E*)-2-(1,3-benzodioxan-5-il)vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol



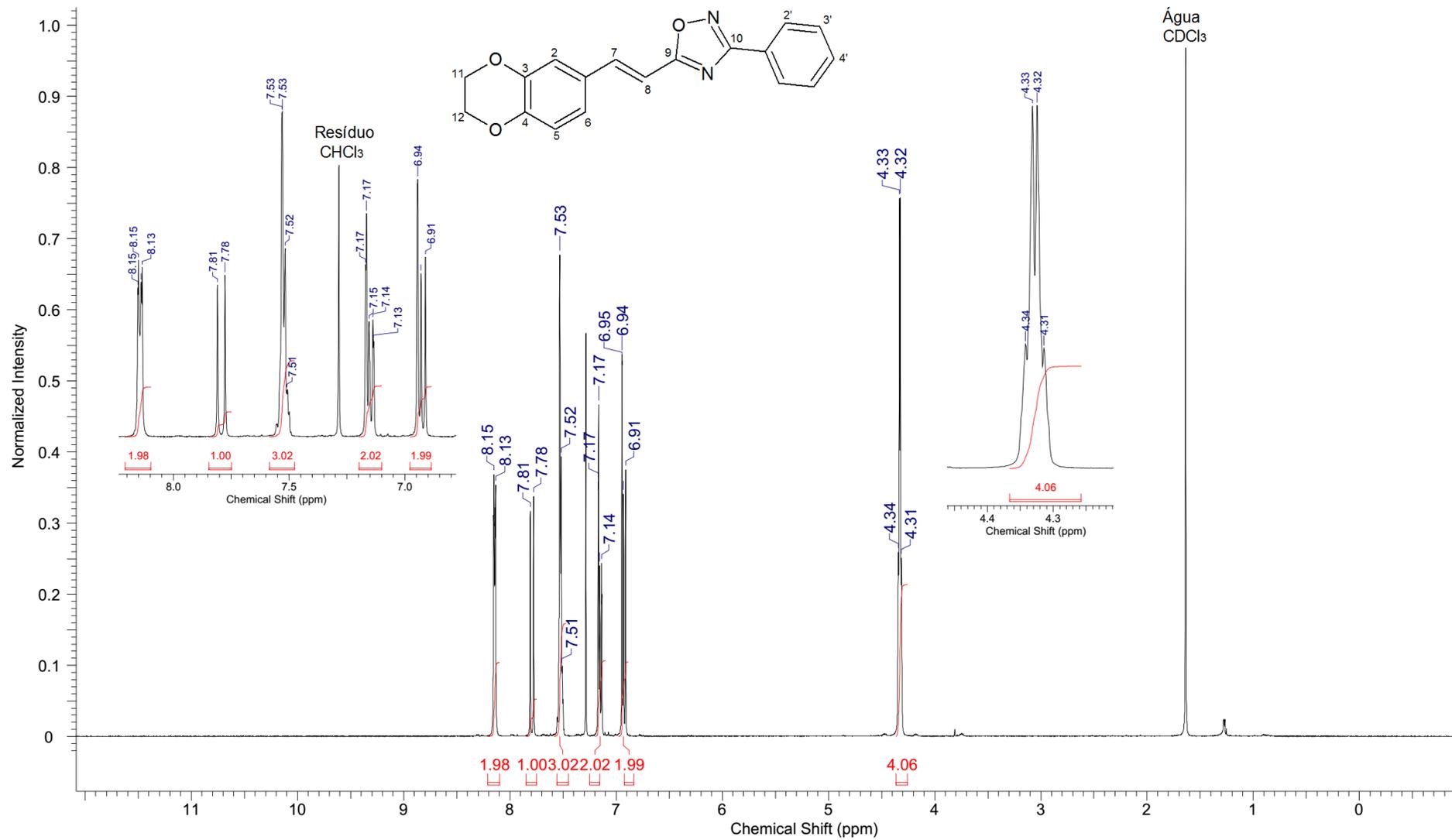
EMBR (IE, 70eV) para **73**.



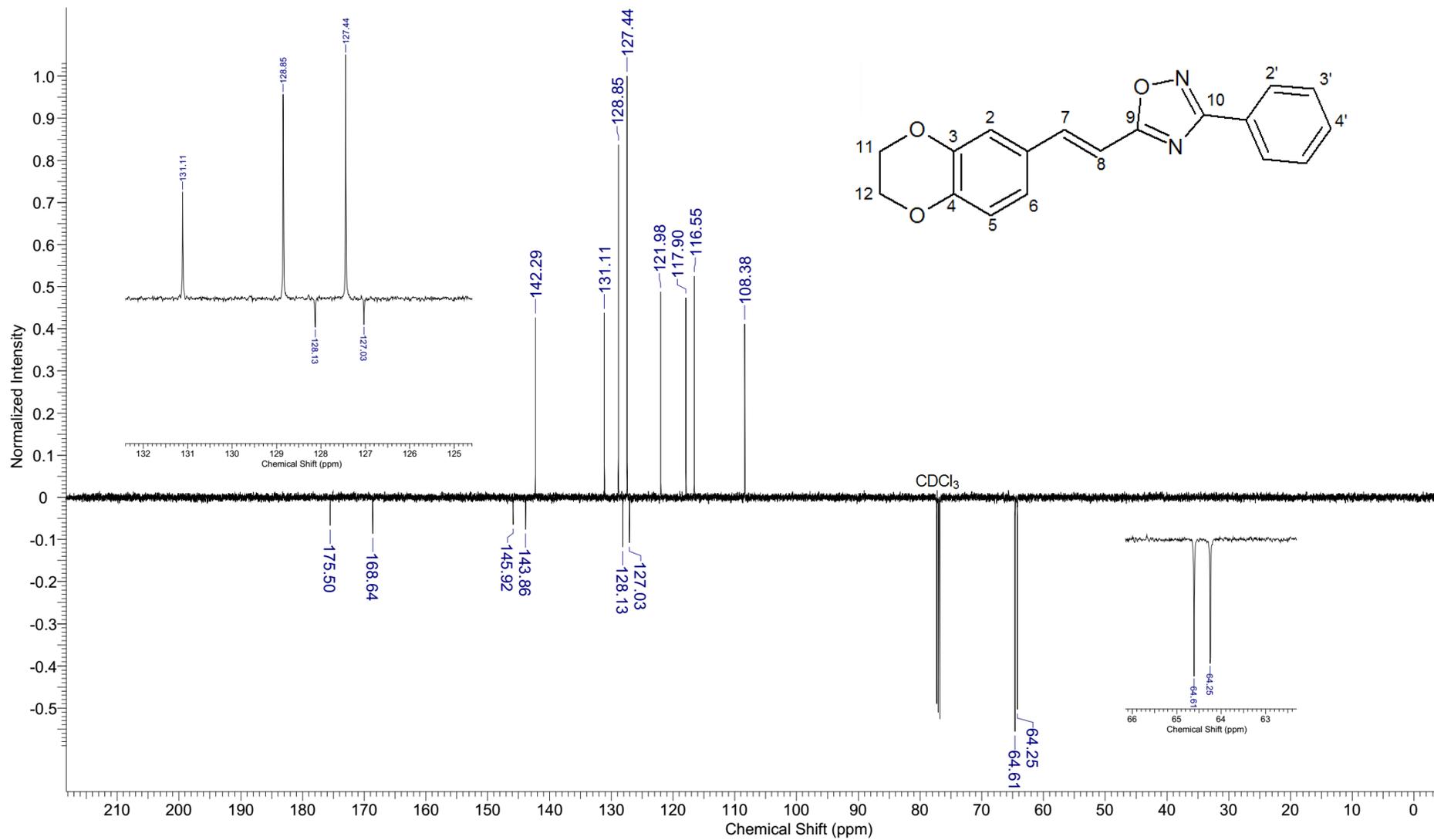
EMAR (ES+) para **73**.



Espectro de IV (KBr) para **73**.

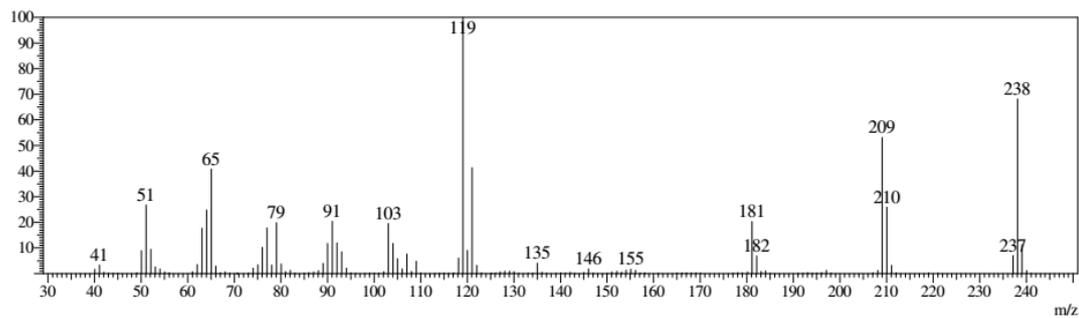


RMN<sup>1</sup>H (500MHz) para **73**.

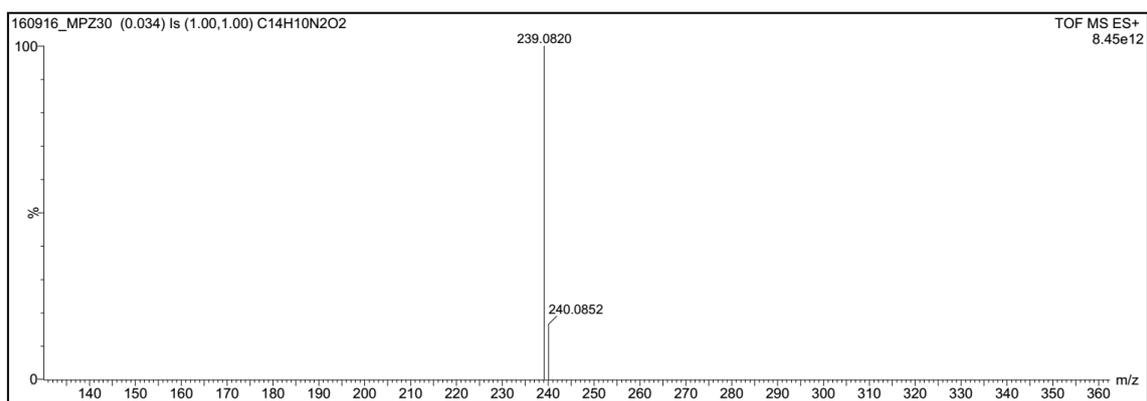


RMN<sup>13</sup>C (500MHz) para 73.

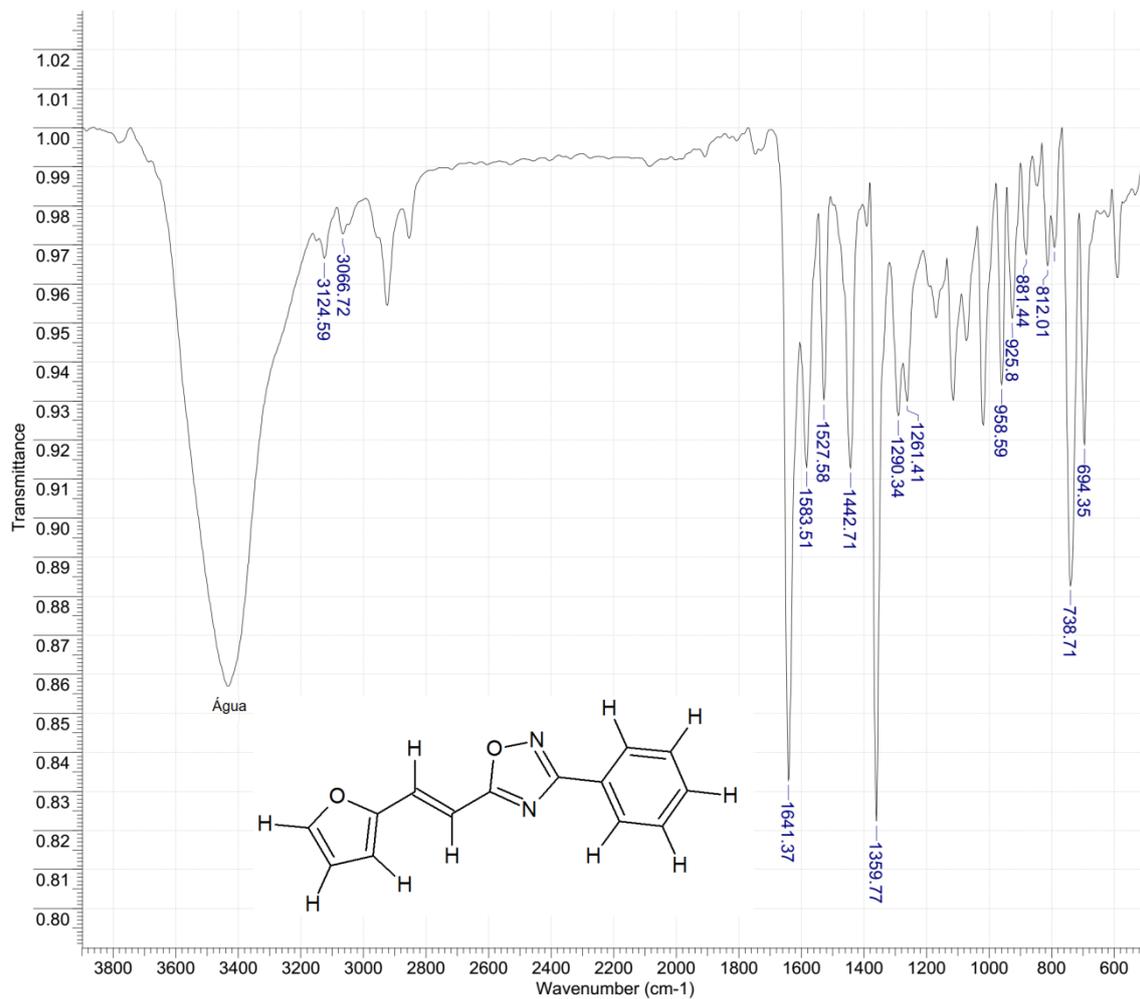
Derivado **74**: 5-[(*E*)-2(furan-2-il)-vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol



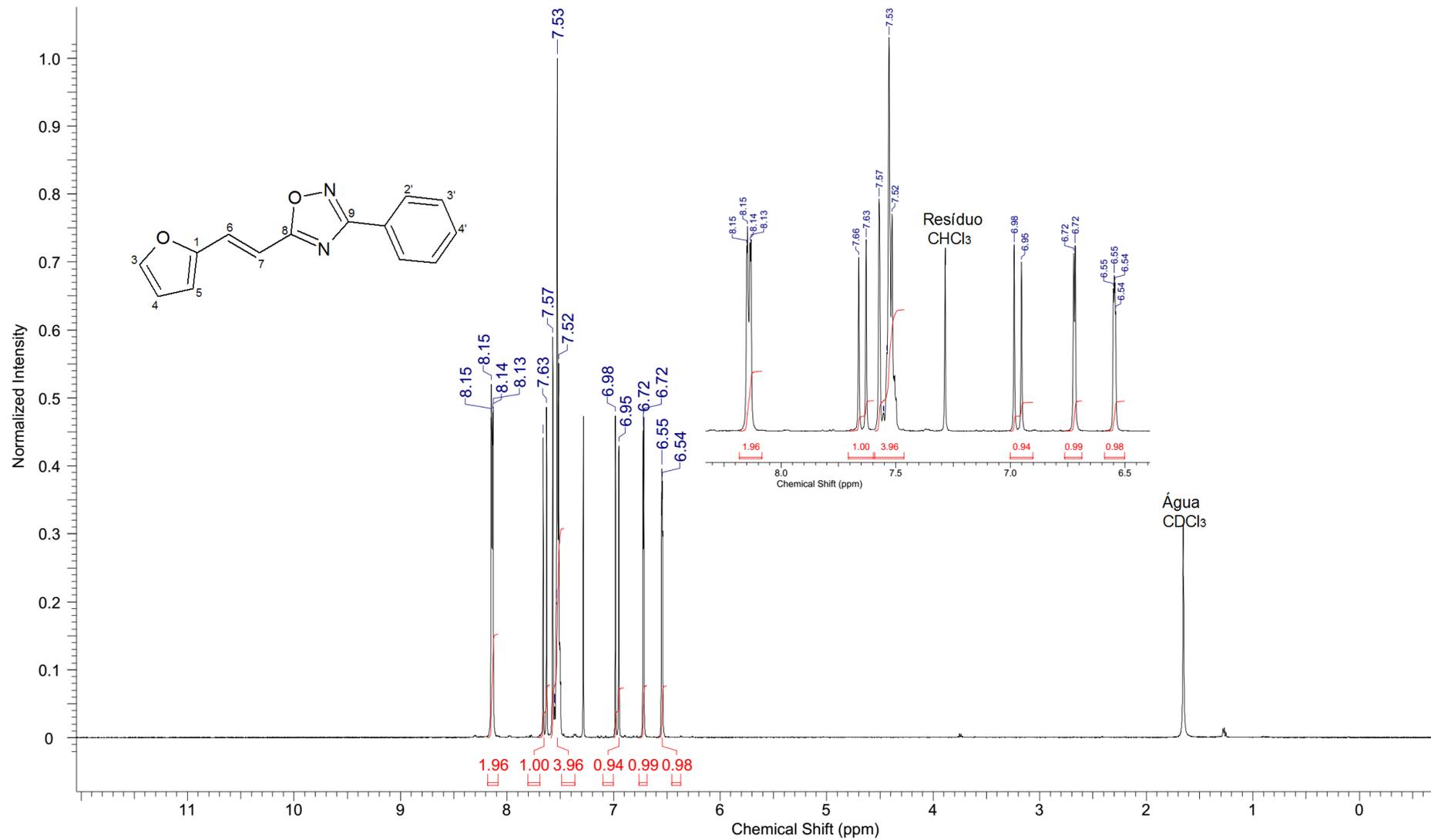
EMBR (IE, 70eV) para **74**.



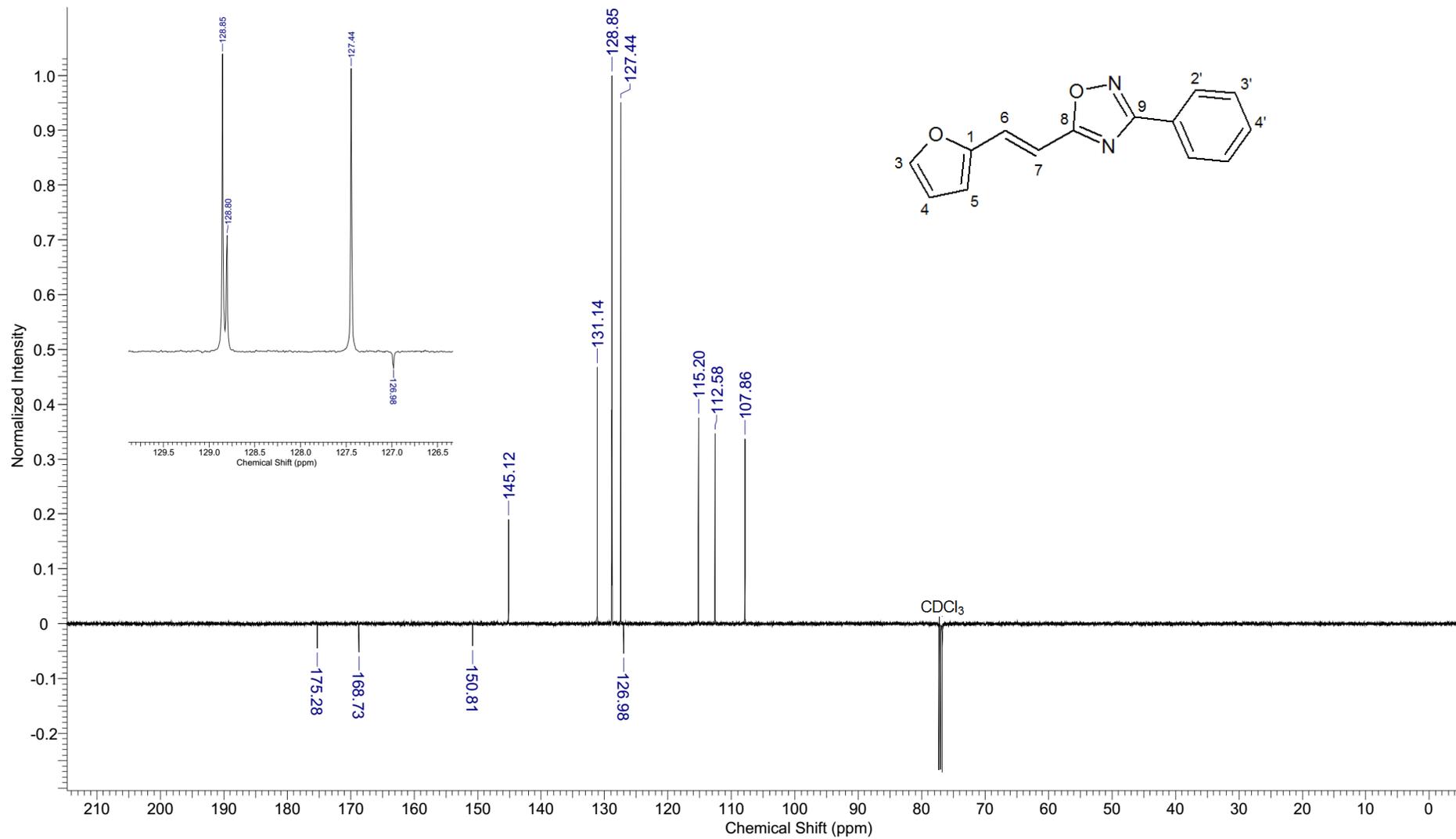
EMAR (ES+) para **74**.



Espectro de IV (KBr) para **74**.

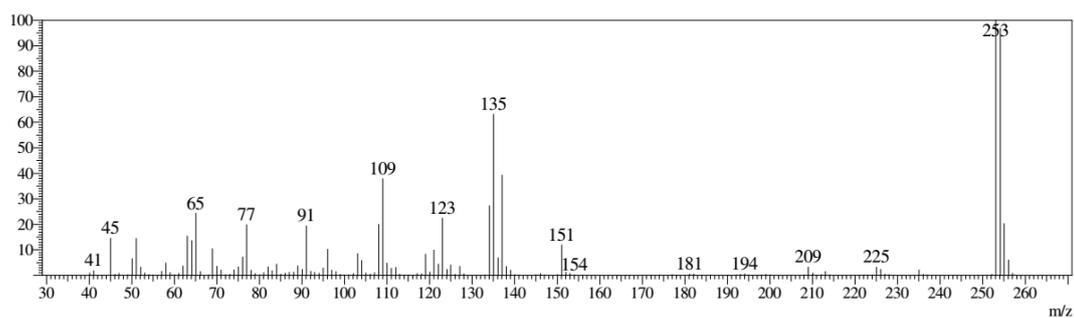


RMN<sup>1</sup>H (500MHz) para **74**.

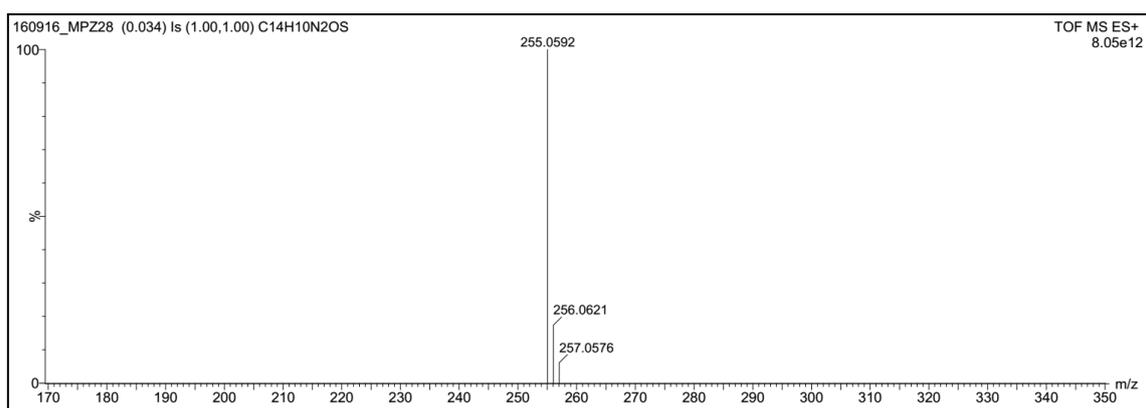


RMN<sup>13</sup>C (500MHz) para **74**.

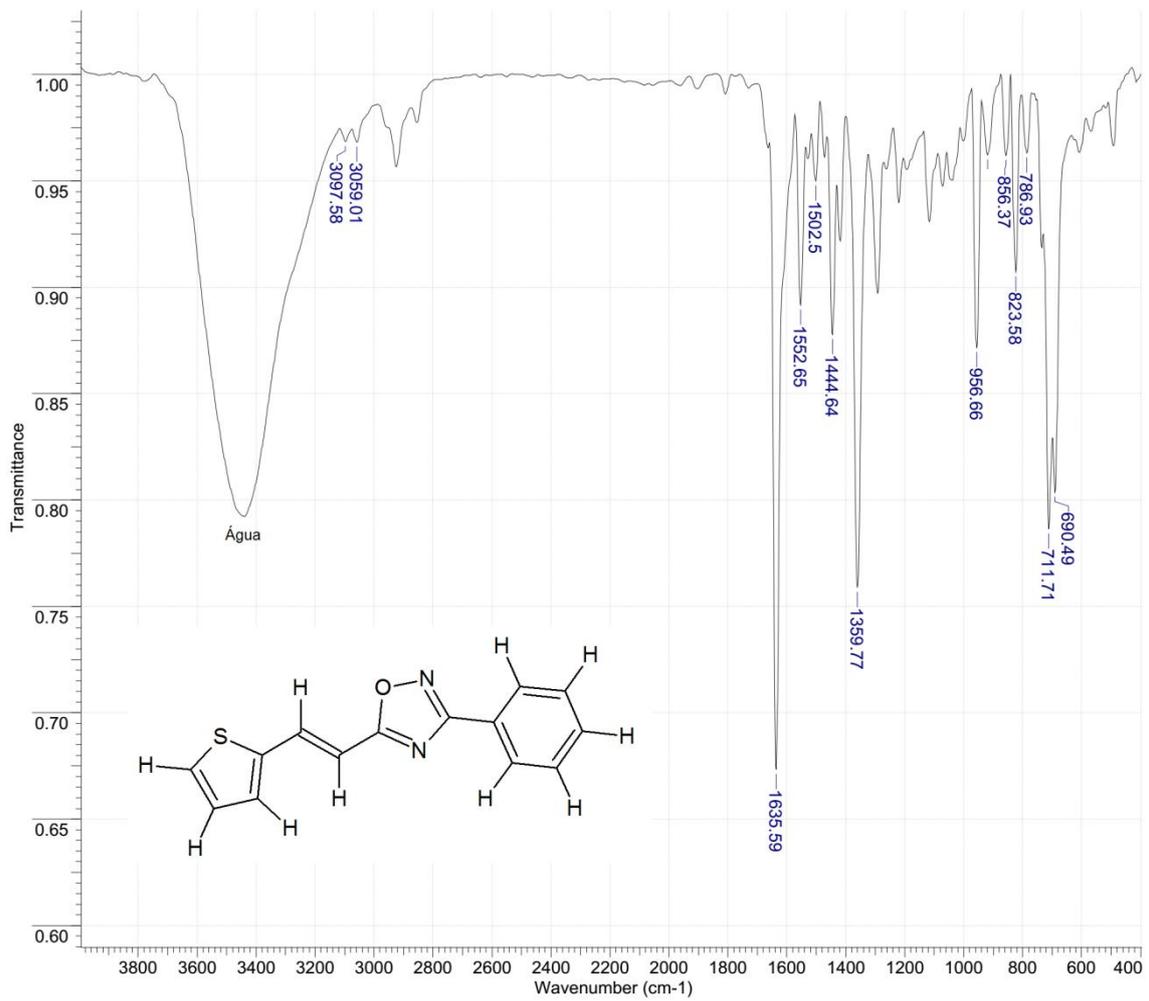
Derivado **75**: 5-[(*E*)-2(tiofen-2-il)-vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol



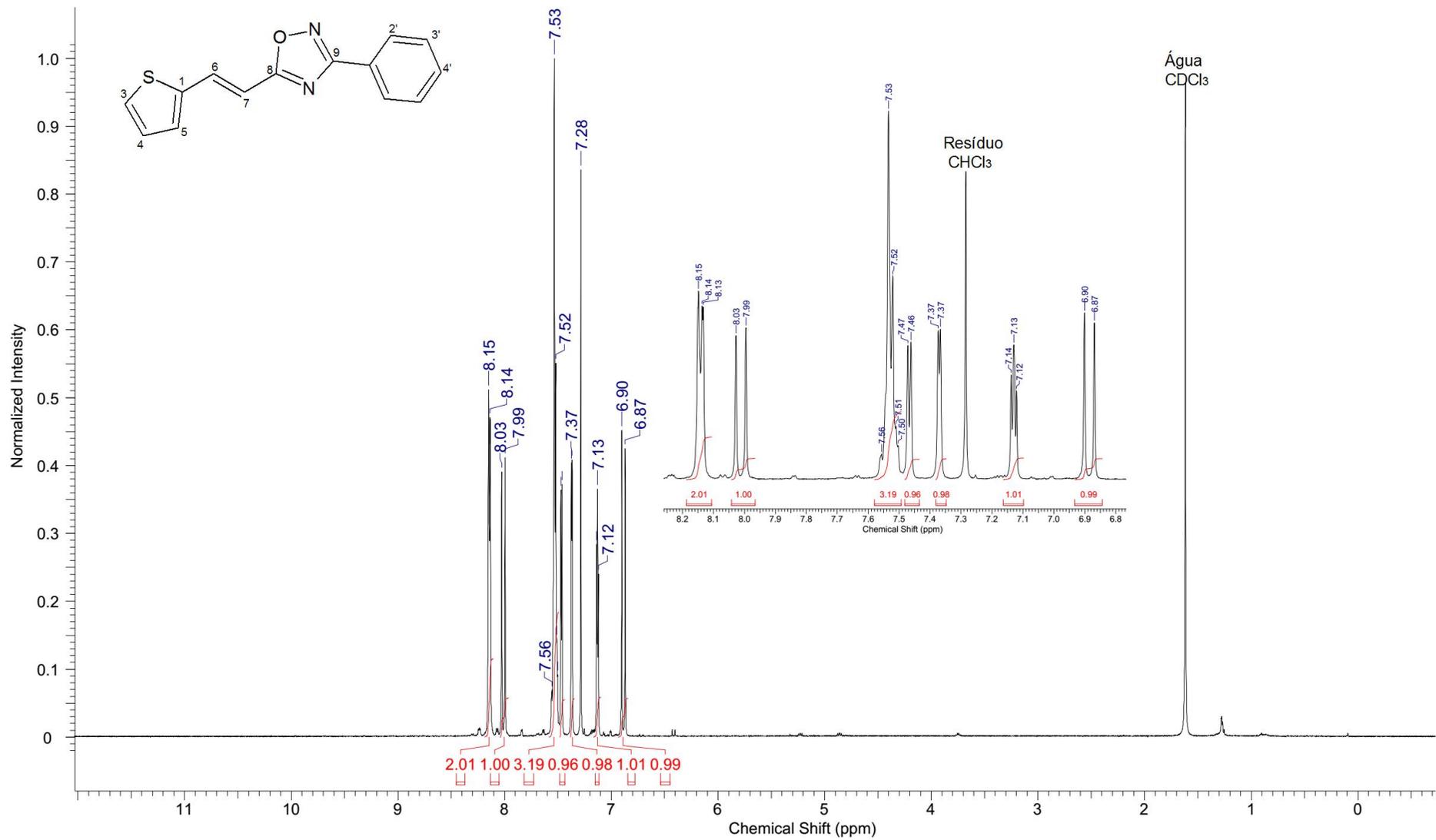
EMBR (IE, 70eV) para **75**.



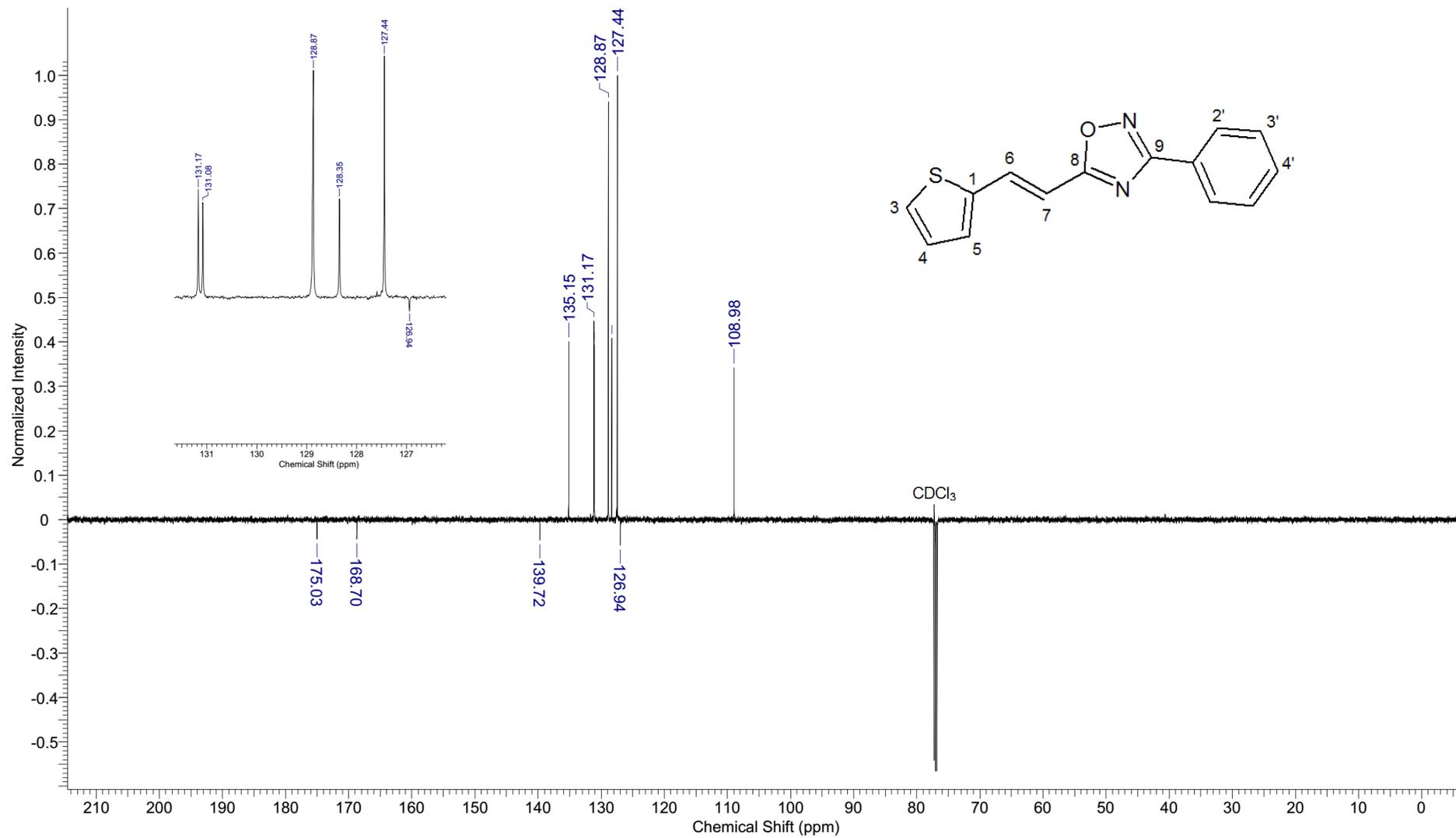
EMAR (ES+) para **75**.



Espectro de IV (KBr) para 75.

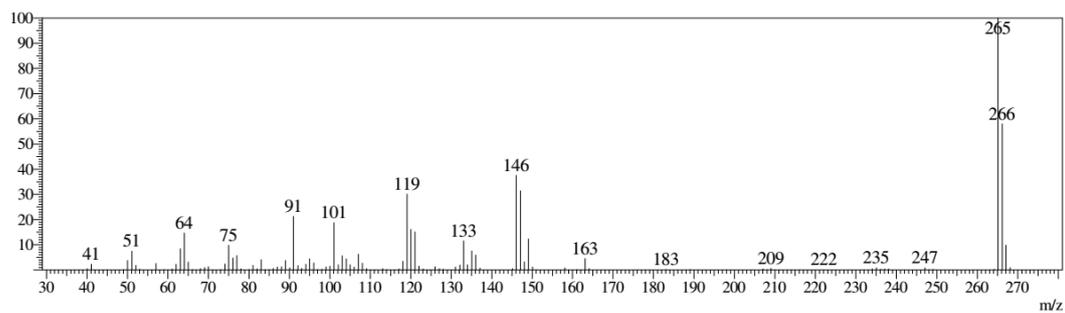


RMN<sup>1</sup>H (500MHz) para 75.

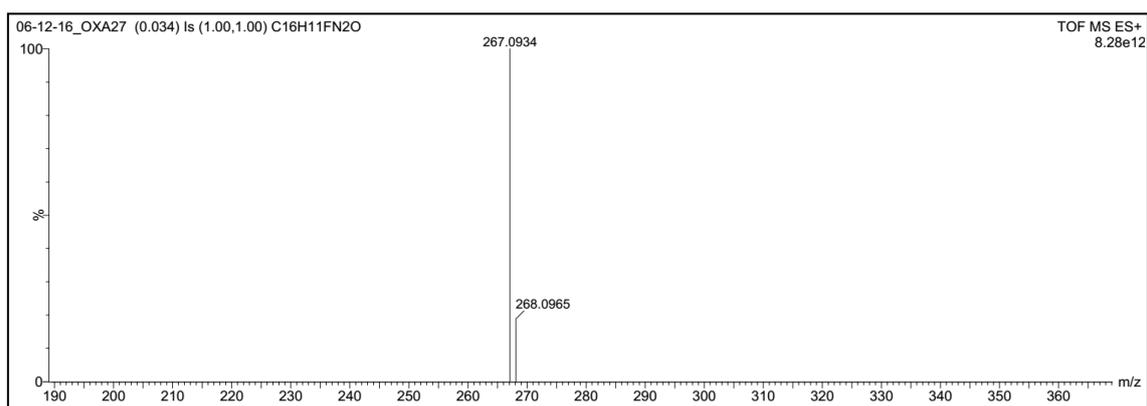


RMN<sup>13</sup>C (500MHz) para **75**.

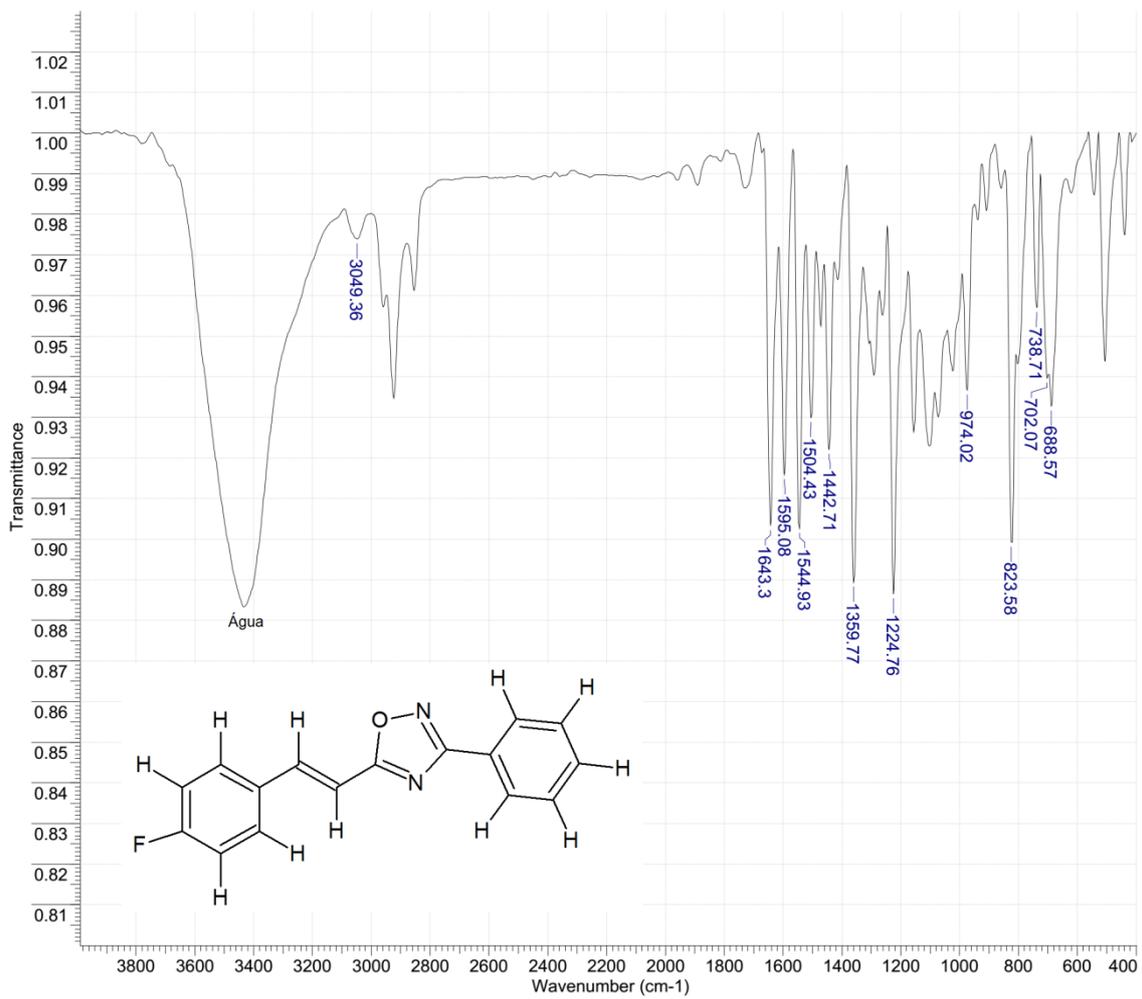
Derivado **76**: 5-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol



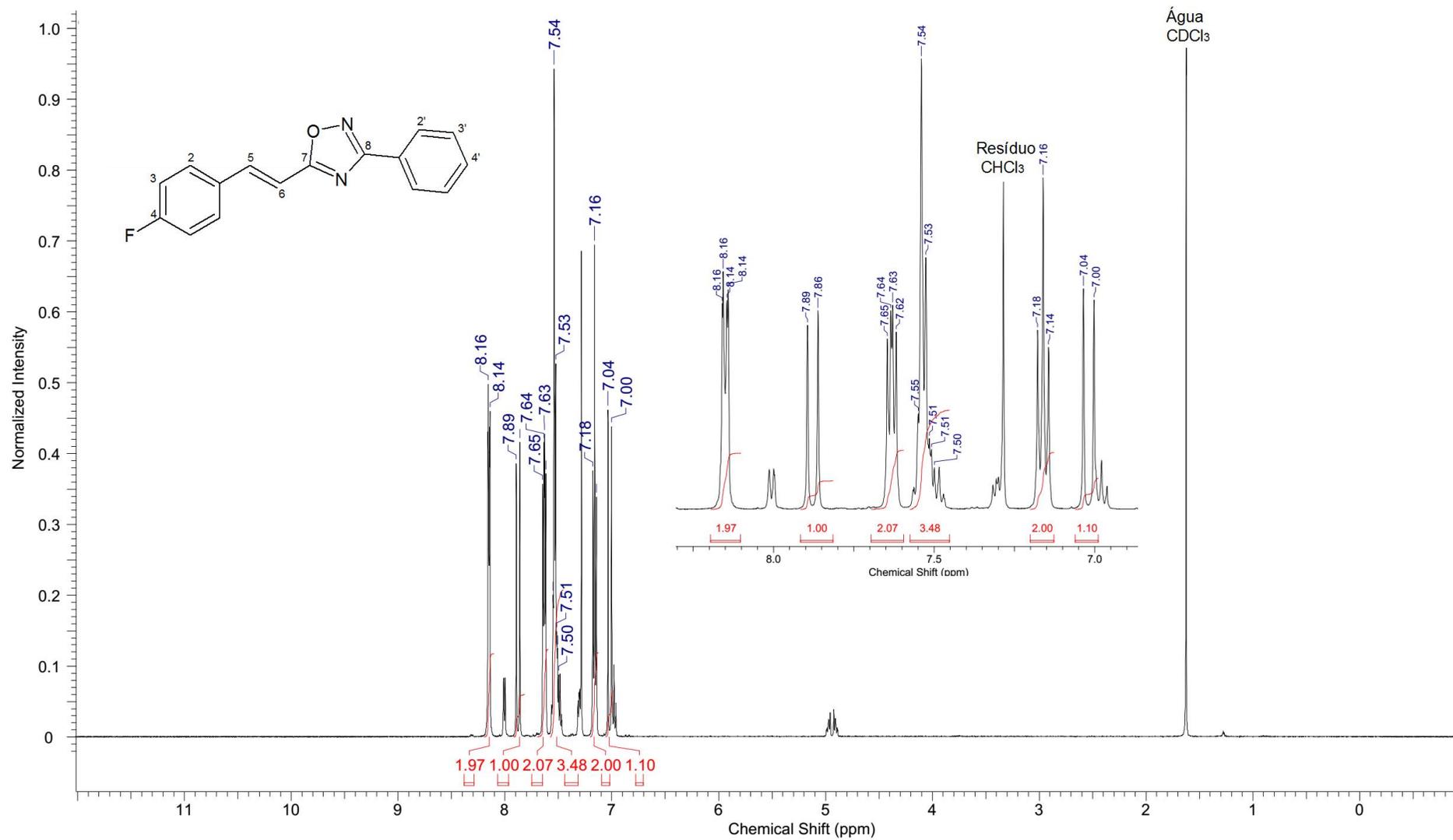
EMBR (IE, 70eV) para **76**.



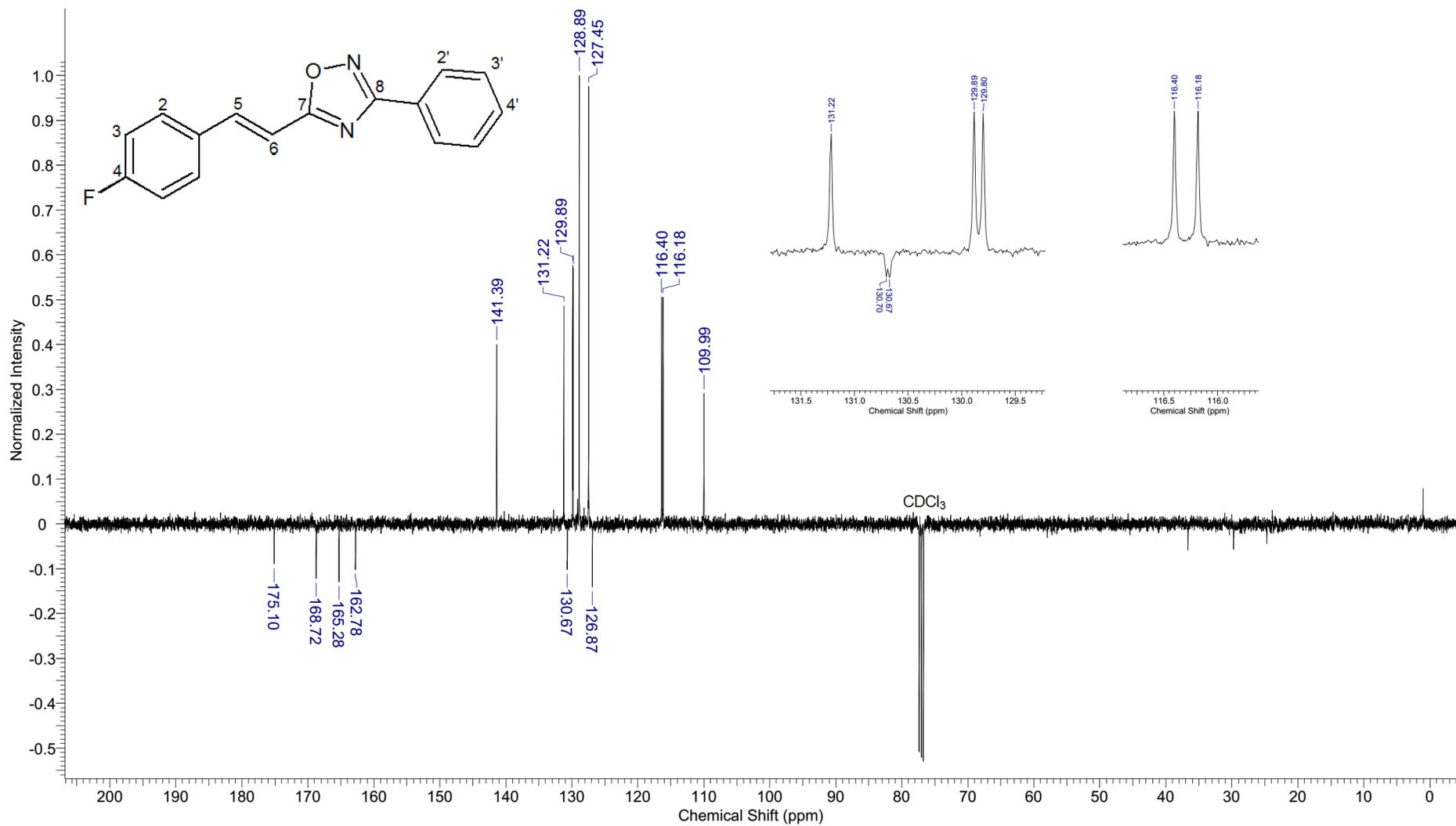
EMAR (ES+) para **76**.



Espectro de IV (KBr) para 76.

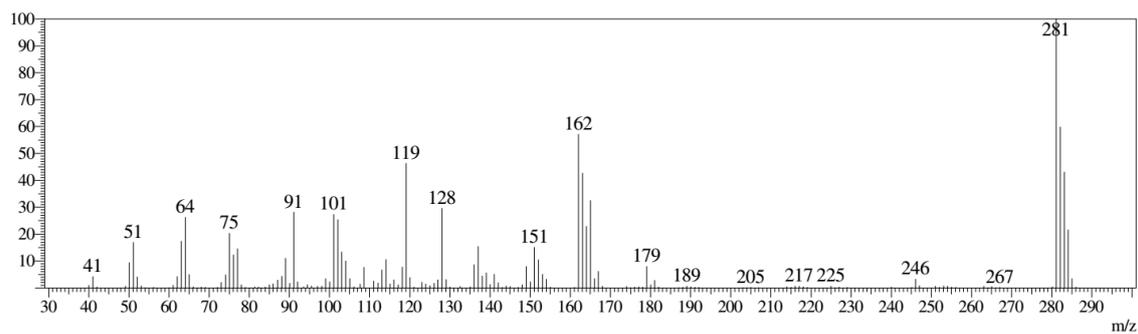


RMN<sup>1</sup>H (500MHz) para **76**.

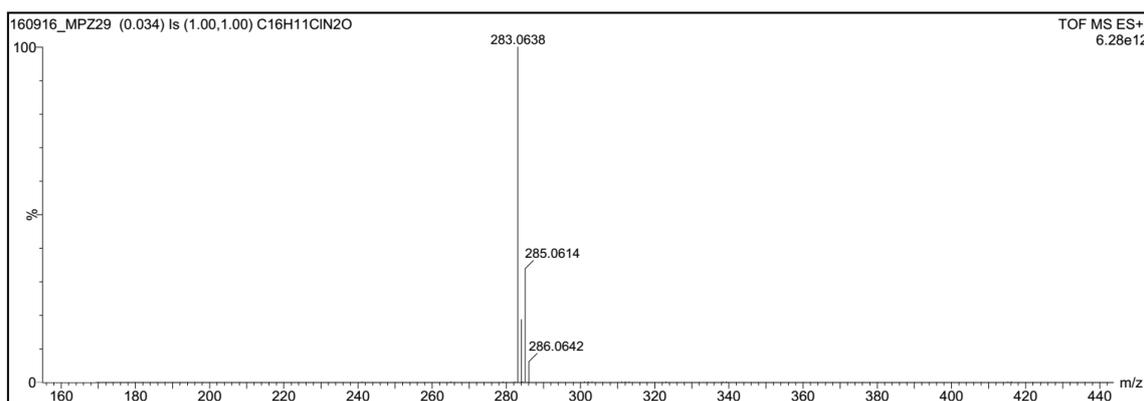


RMN $^{13}\text{C}$  (500MHz) para **76**.

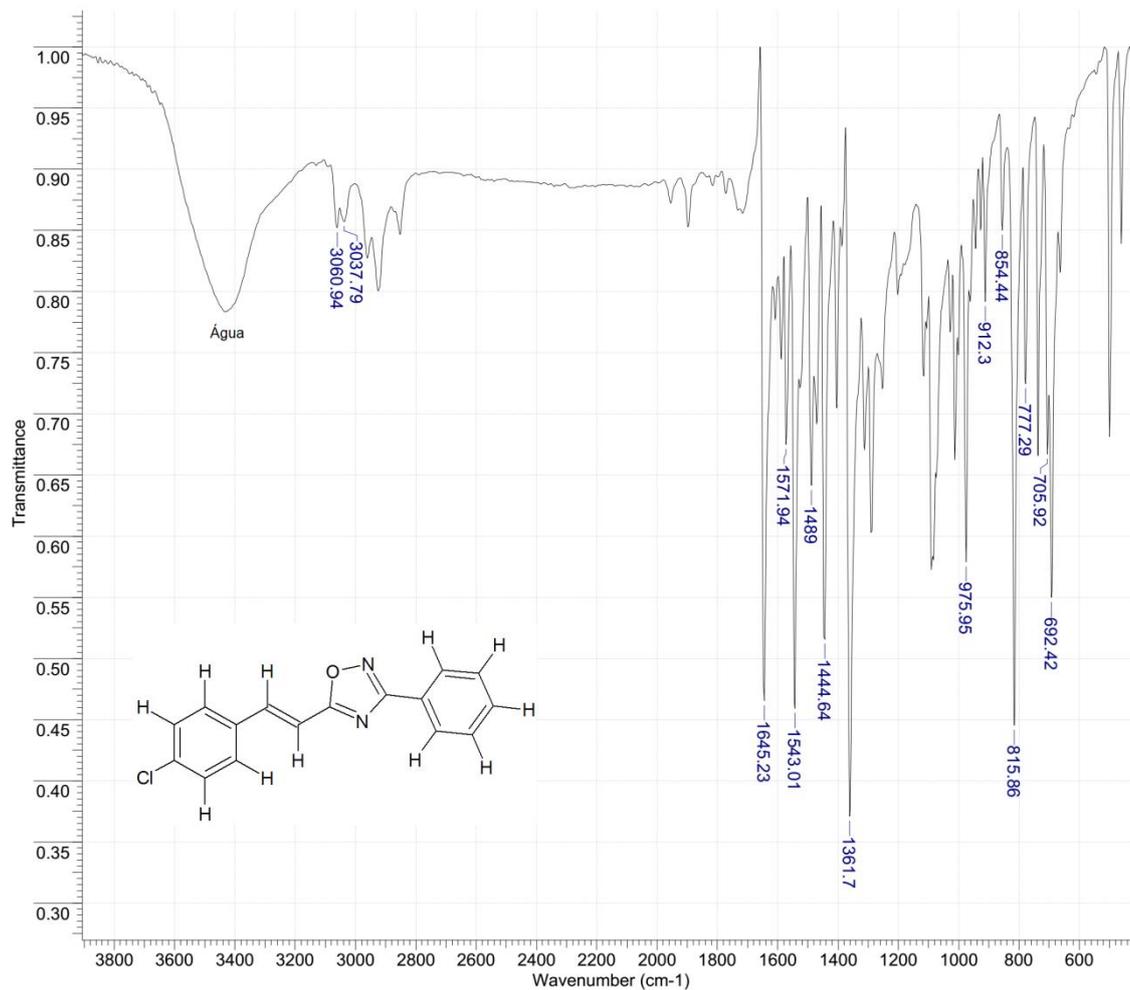
Derivado **77**: 5-[(E)-2-(4-clorofenil)vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol



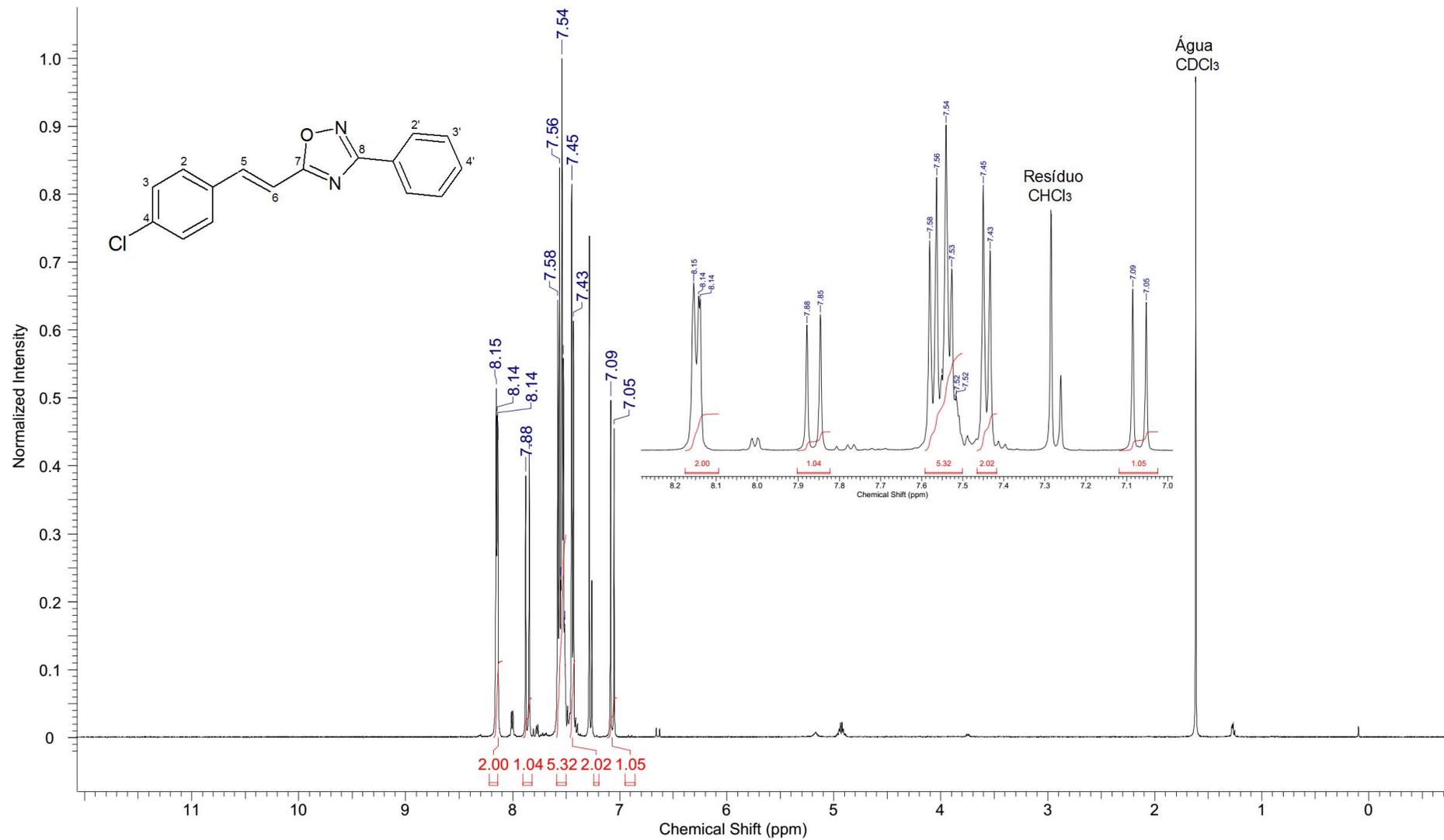
EMBR (IE, 70eV) para **77**.



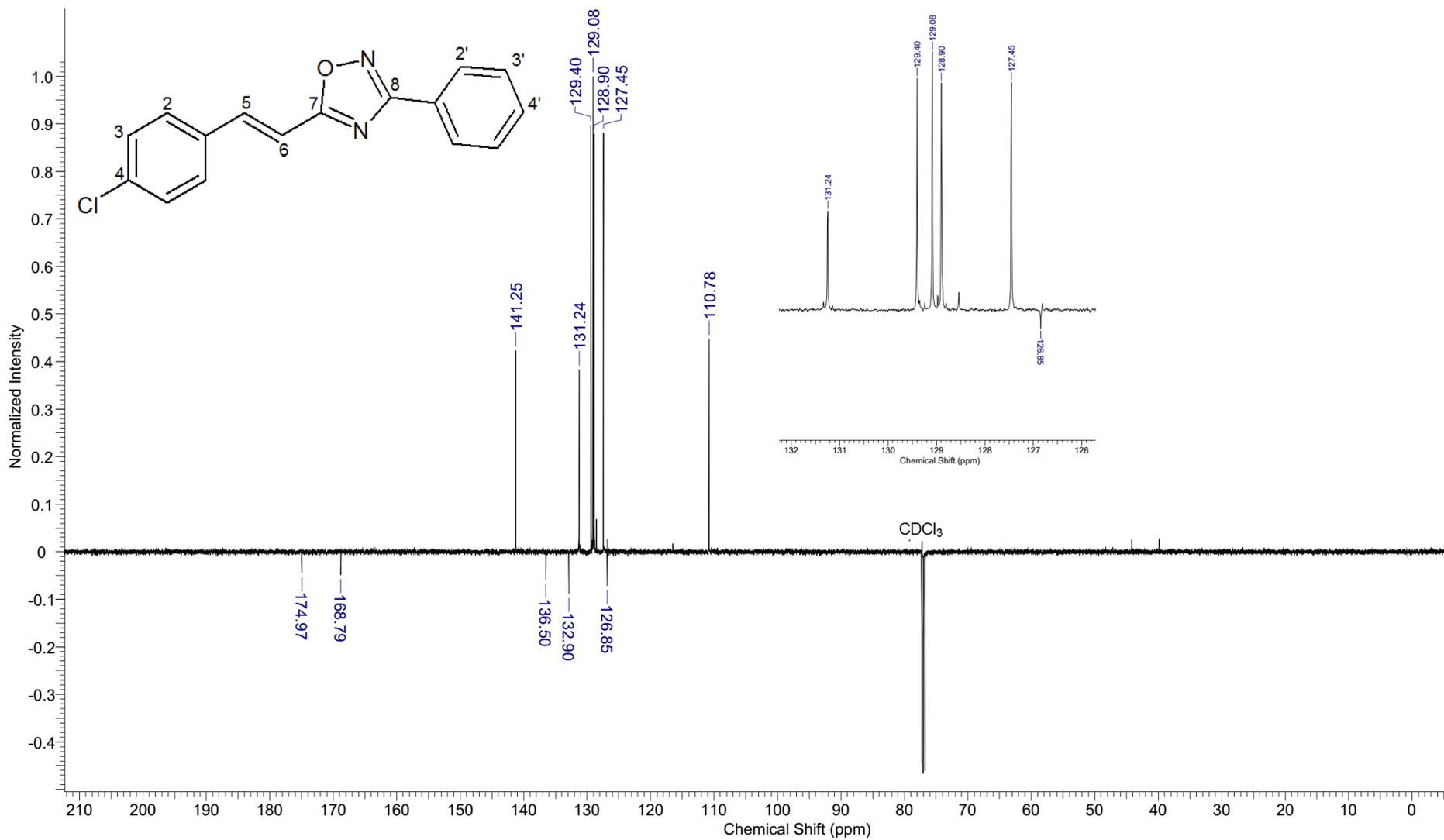
EMAR (ES+) para **77**.



Espectro de IV (KBr) para 77.

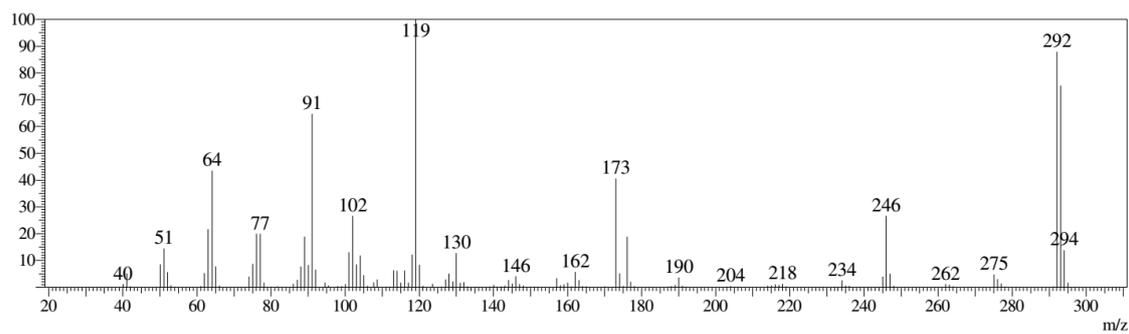


RMN<sup>1</sup>H (500MHz) para **77**.

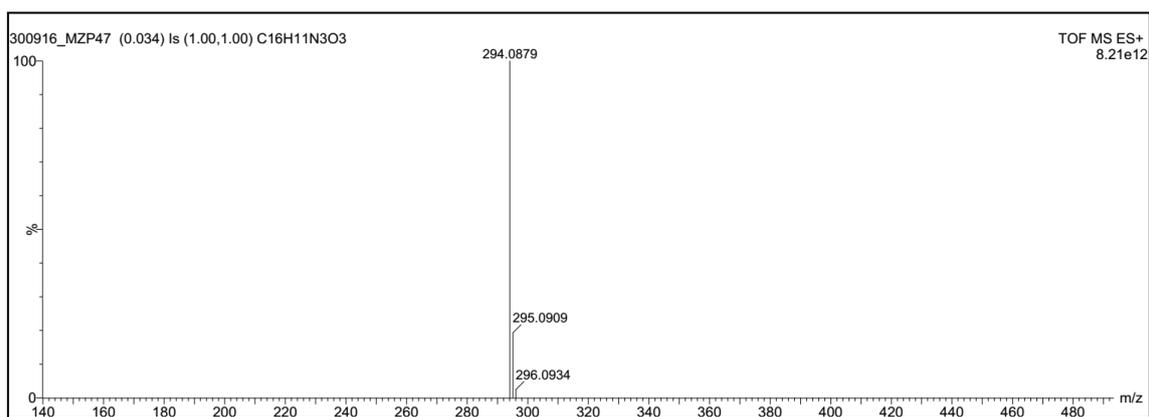


RMN<sup>13</sup>C (500MHz) para **77**.

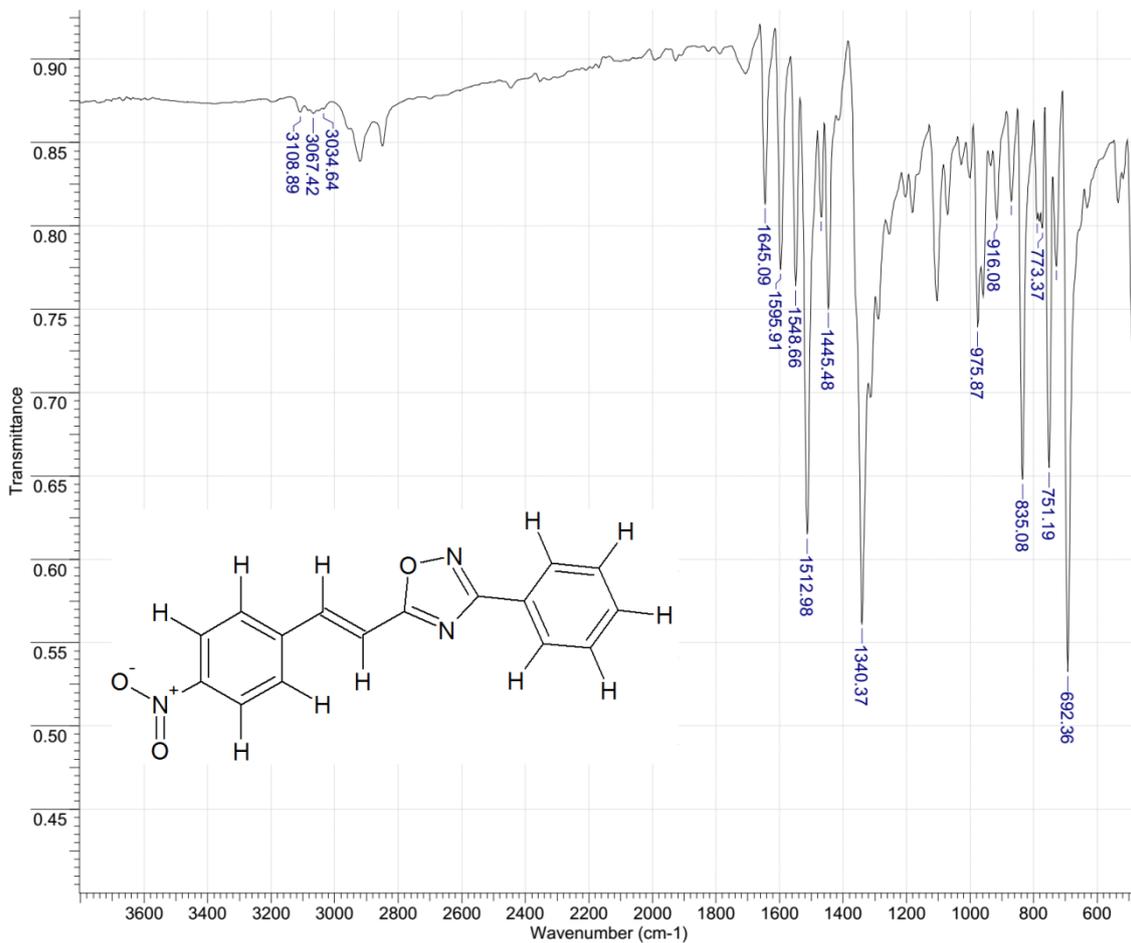
Derivado **78**: 5-[(*E*)-2-(4-nitrofenil)vinil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol



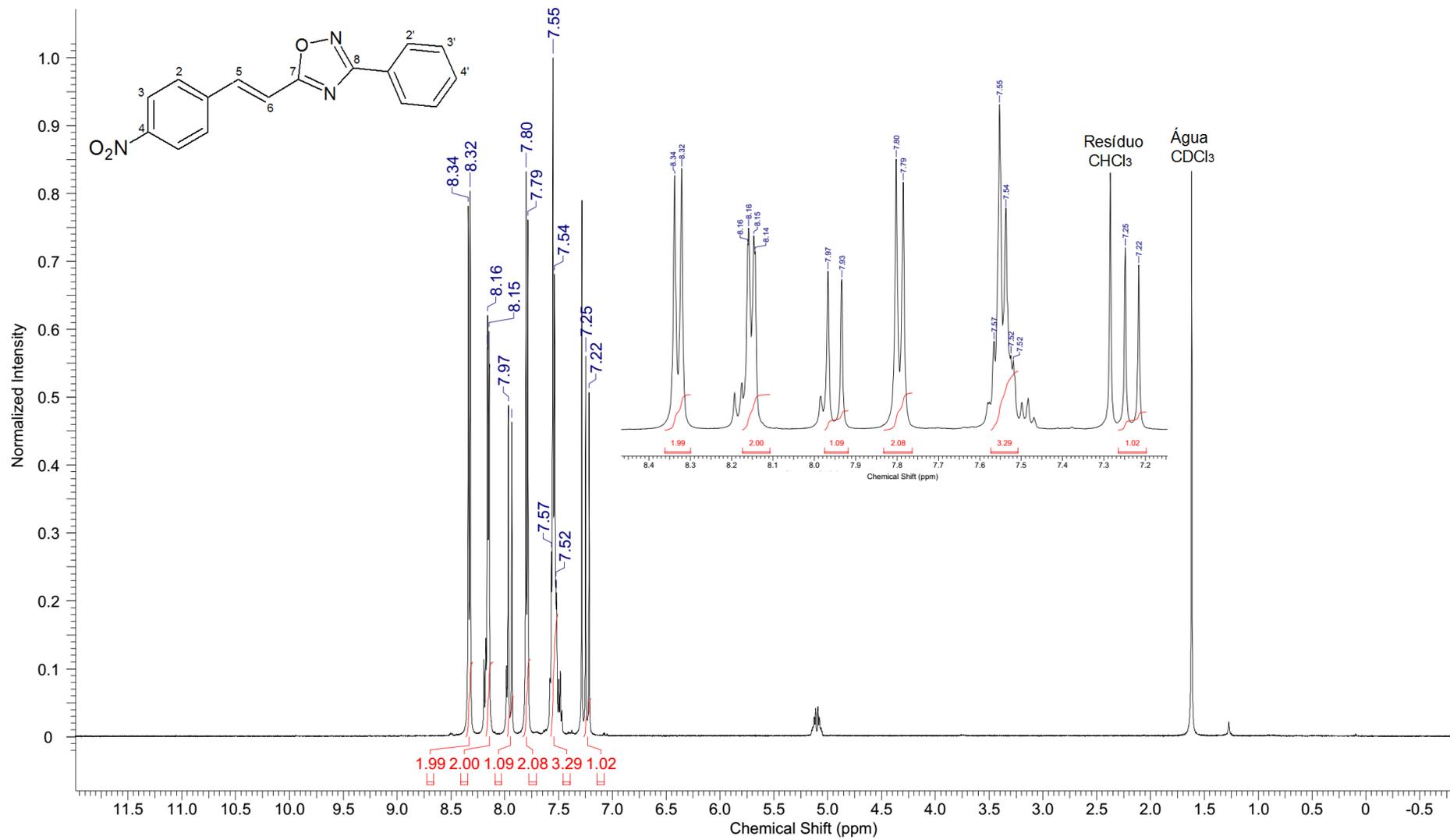
EMBR (IE, 70eV) para **78**.



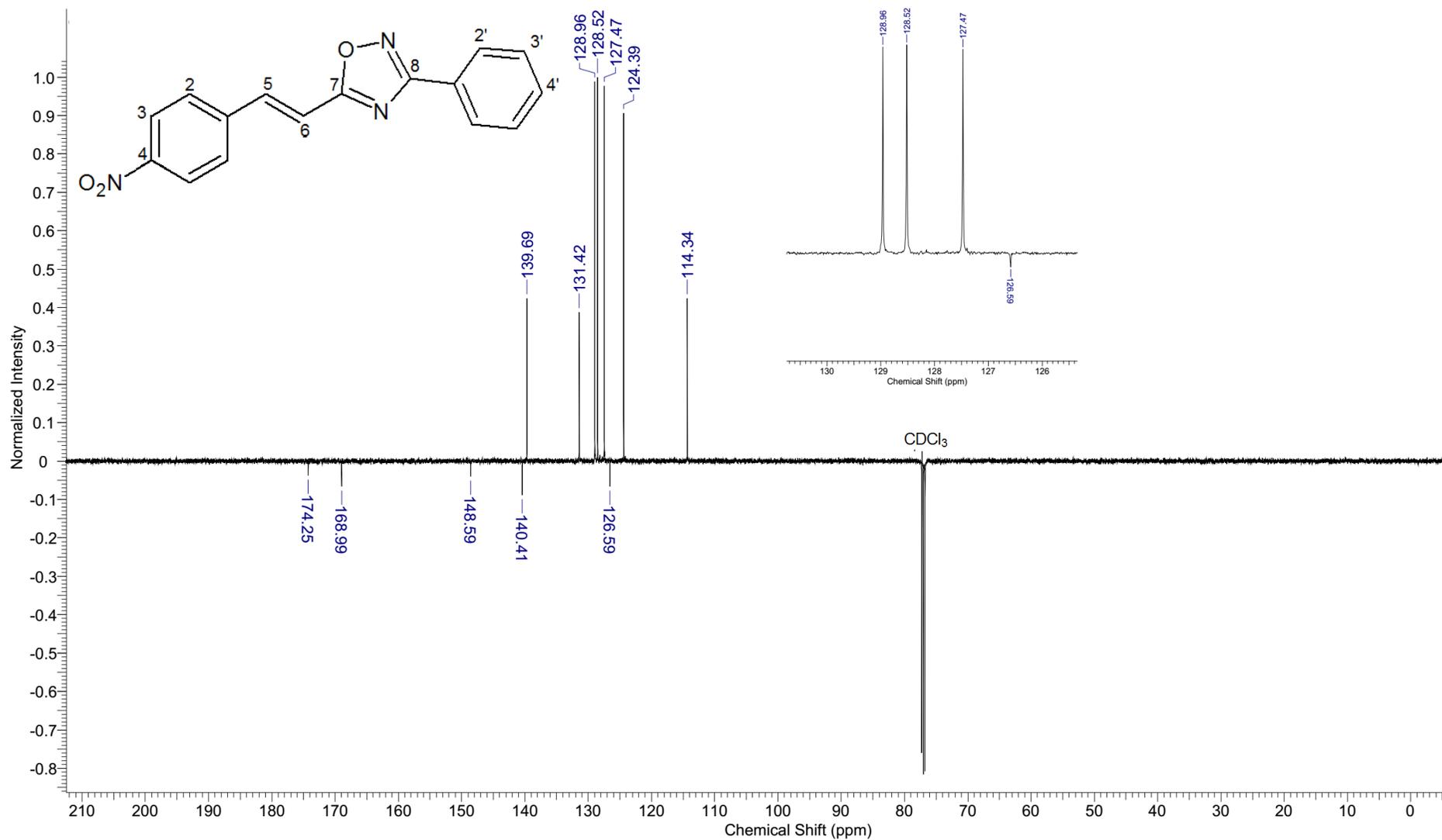
EMAR (ES+) para **78**.



Espectro de IV (KBr) para **78**.

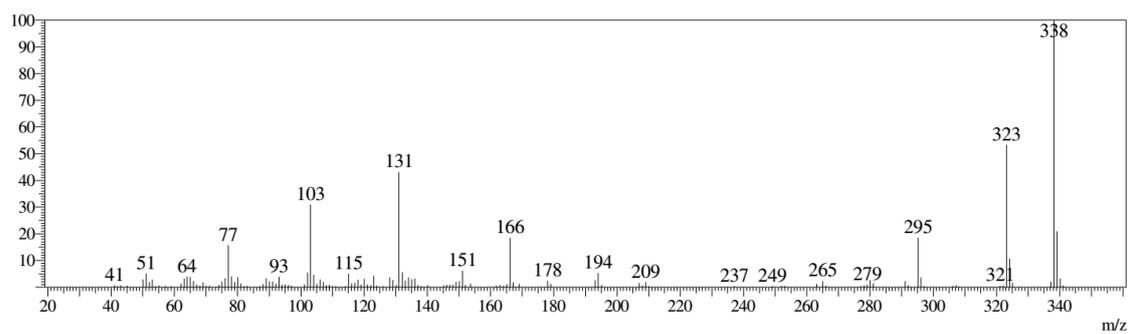


RMN<sup>1</sup>H (500MHz) para **78**.

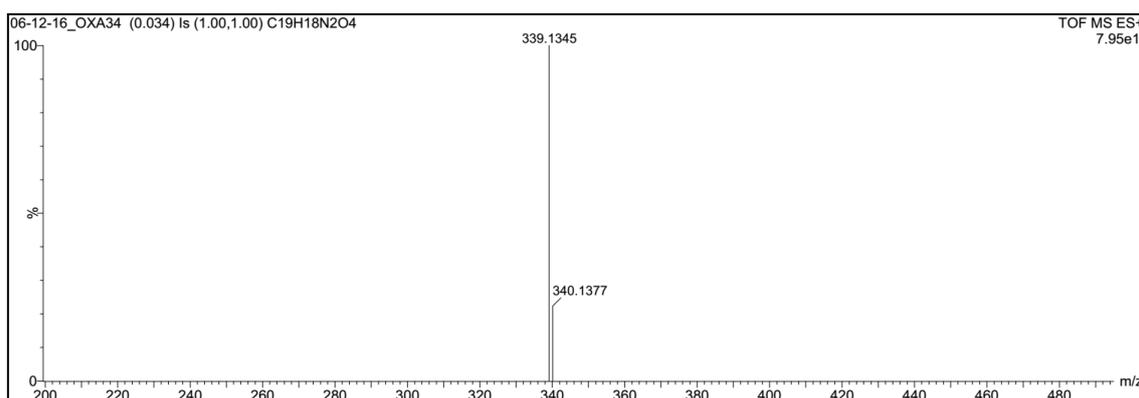


RMN $^{13}\text{C}$  (500MHz) para **78**.

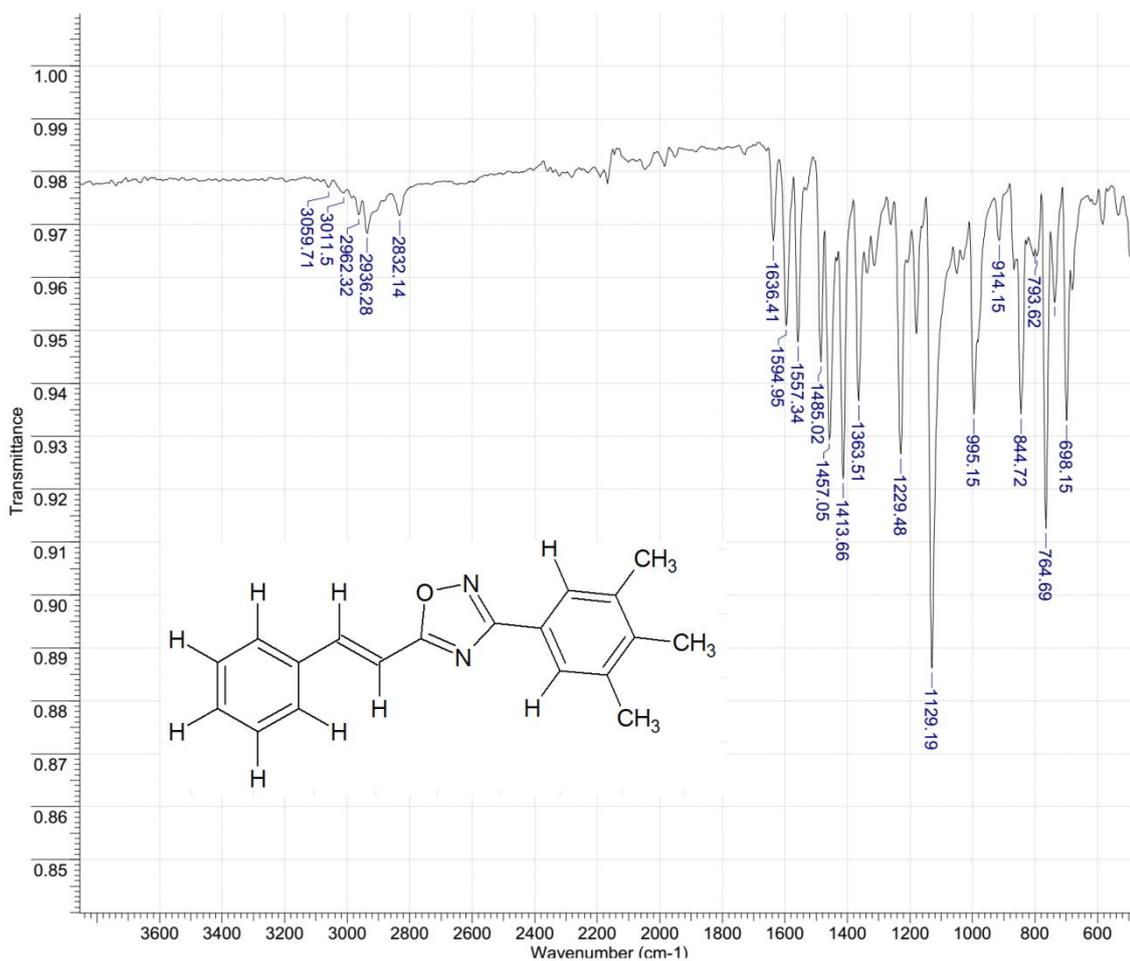
Derivado **79**: 5-[(*E*)-2-fenilvinil]-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2,4-oxadiazol



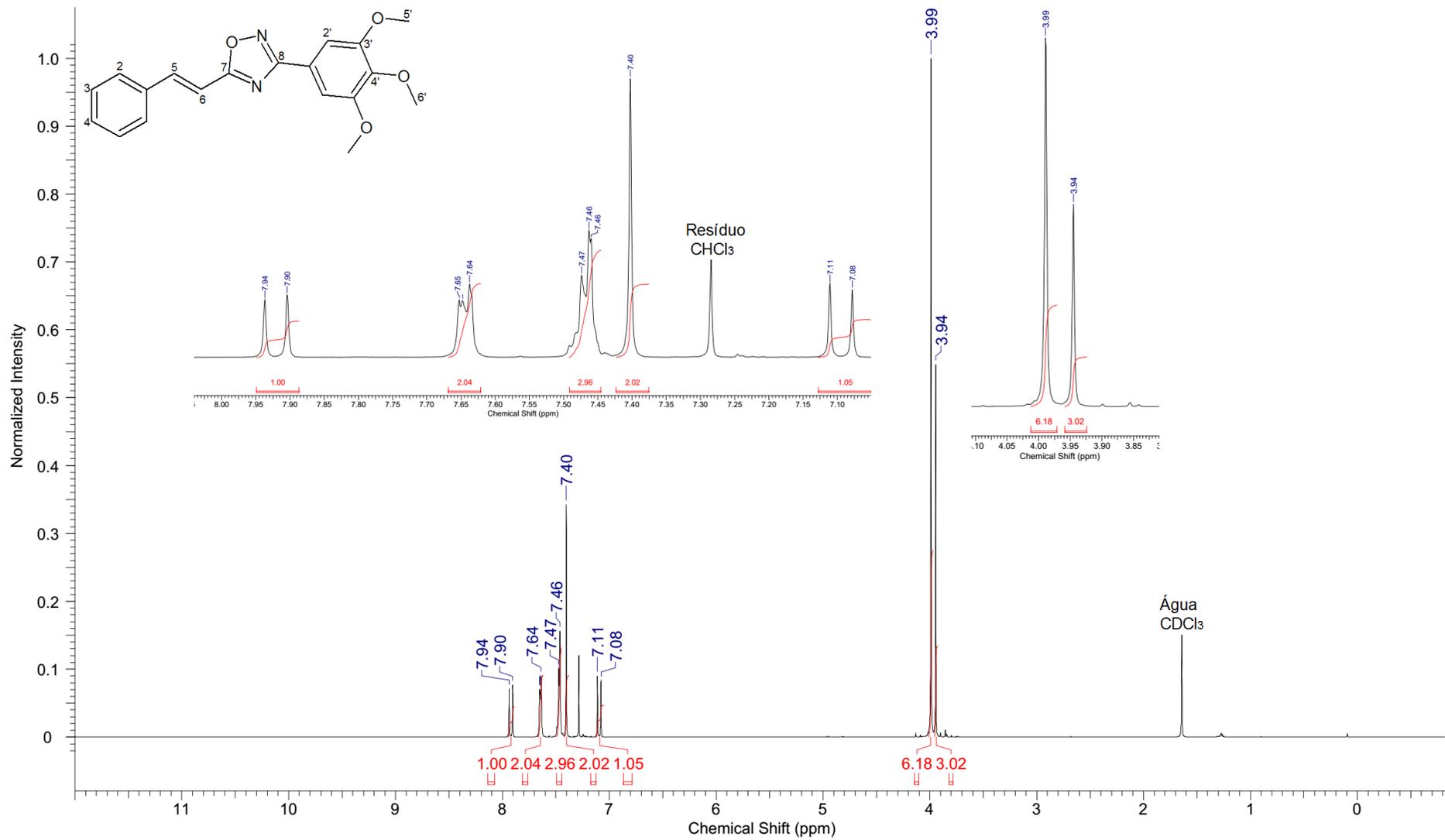
EMBR (IE, 70eV) para **79**.



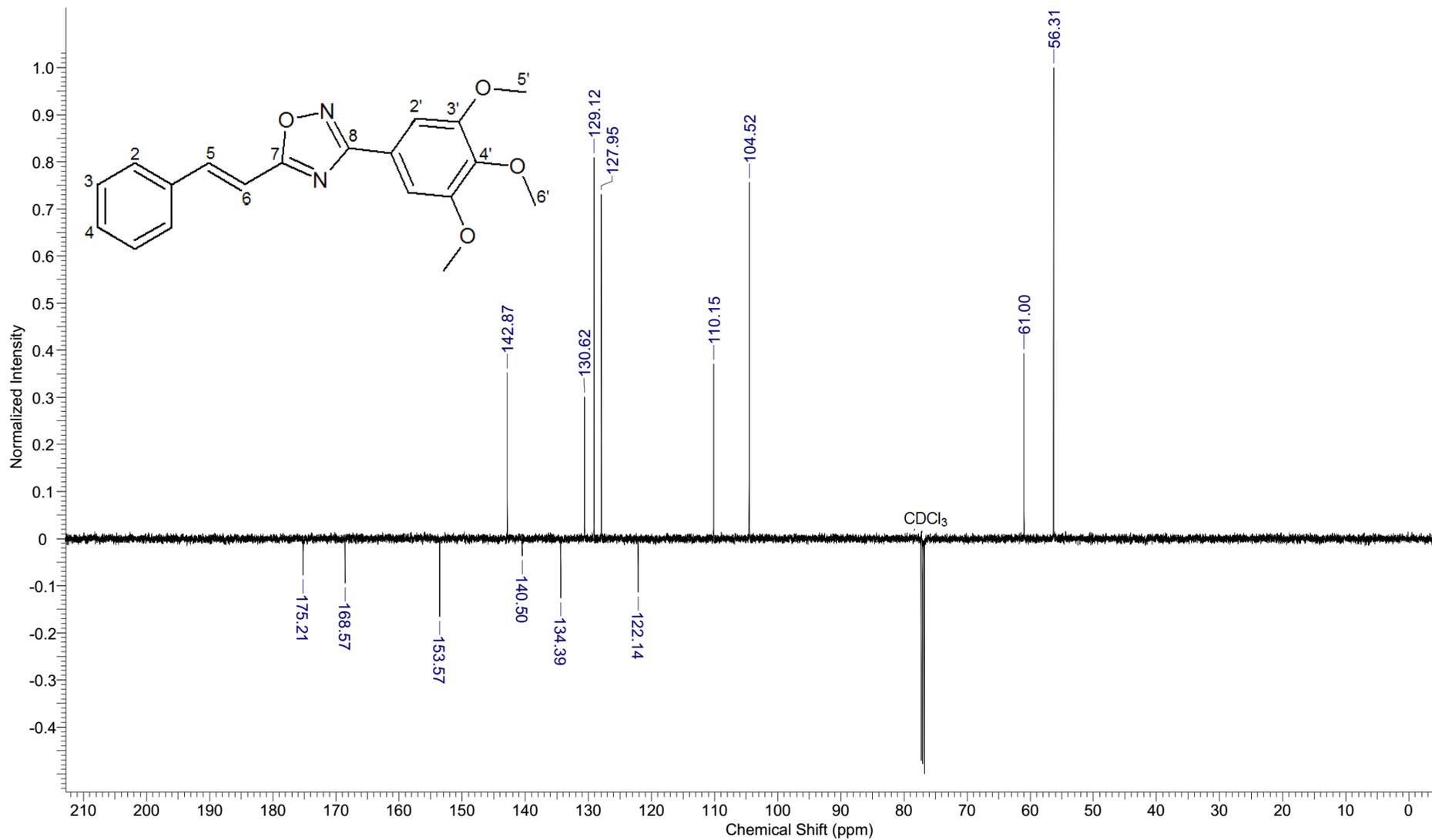
EMAR (ES+) para **79**.



Espectro de IV (KBr) para 79.

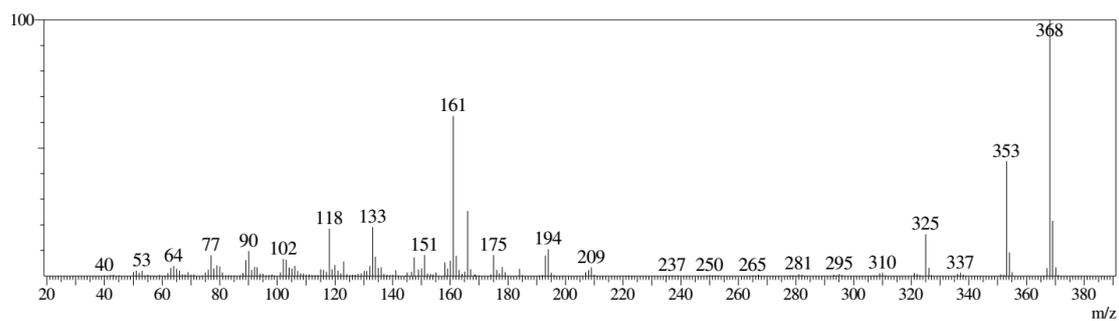


RMN<sup>1</sup>H (500MHz) para **79**.

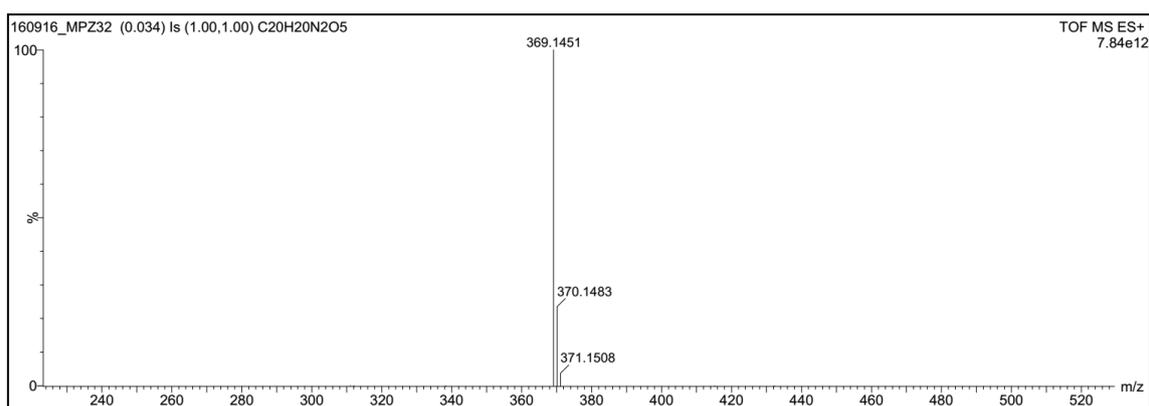


RMN<sup>13</sup>C (500MHz) para 79.

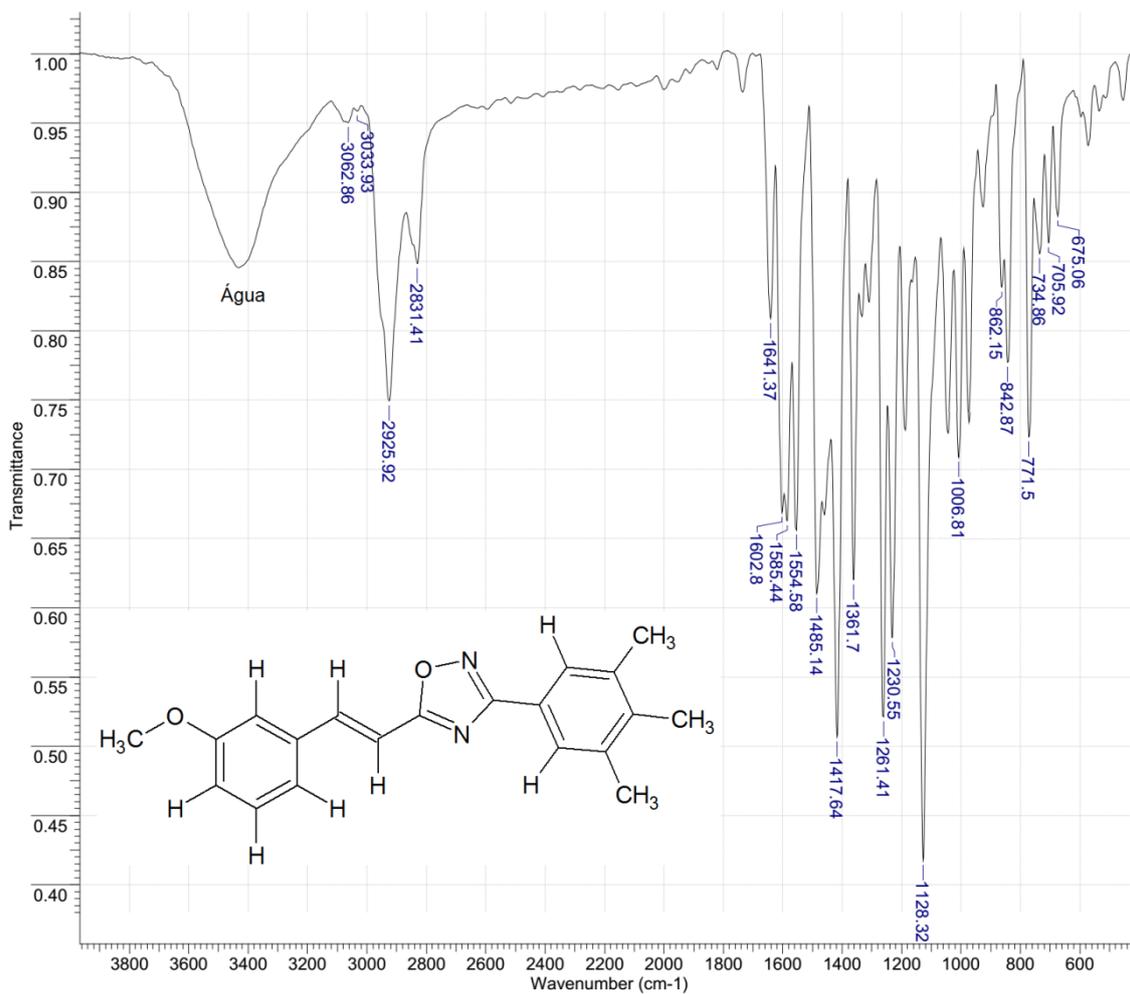
Derivado **80**: 5-[(*E*)-2-(3-metoxifenil)vinil]-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2,4-oxadiazol



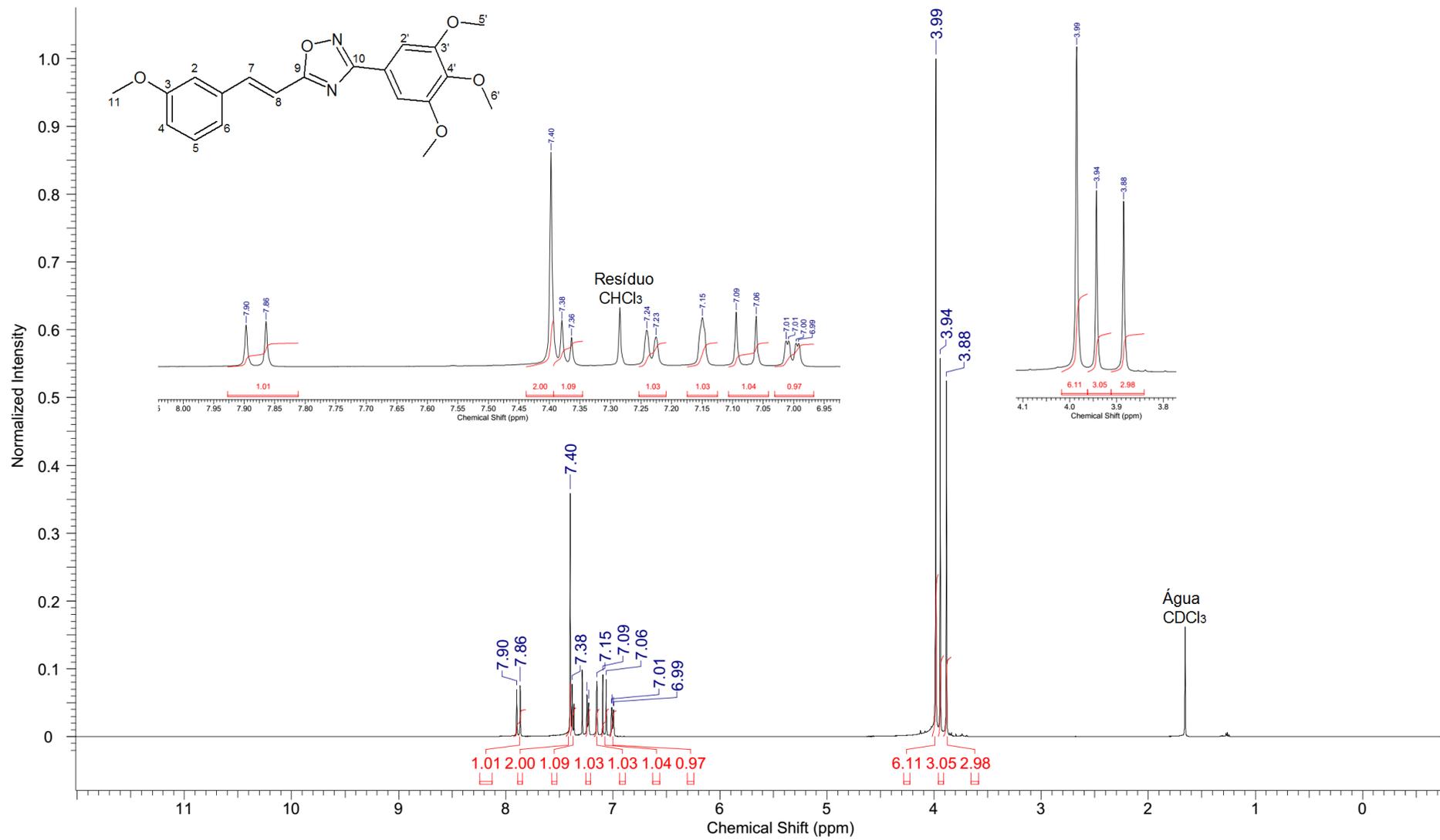
EMBR (IE, 70eV) para **80**.



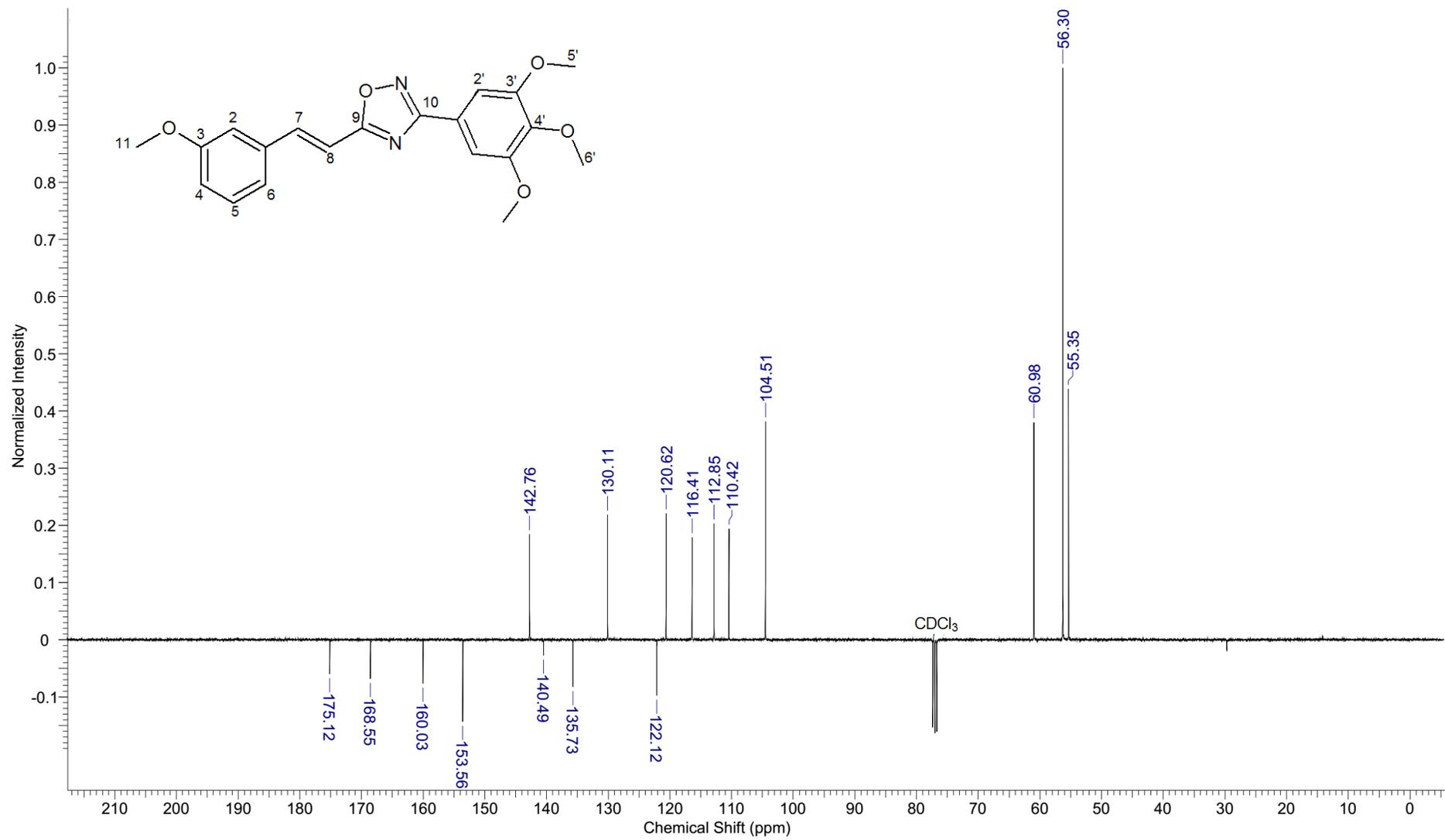
EMAR (ES+) para **80**.



Espectro de IV (KBr) para 80.

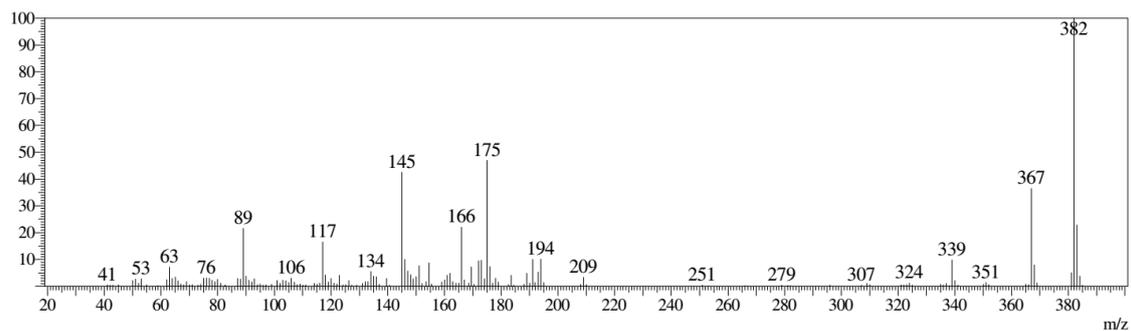


RMN<sup>1</sup>H (500MHz) para **80**.

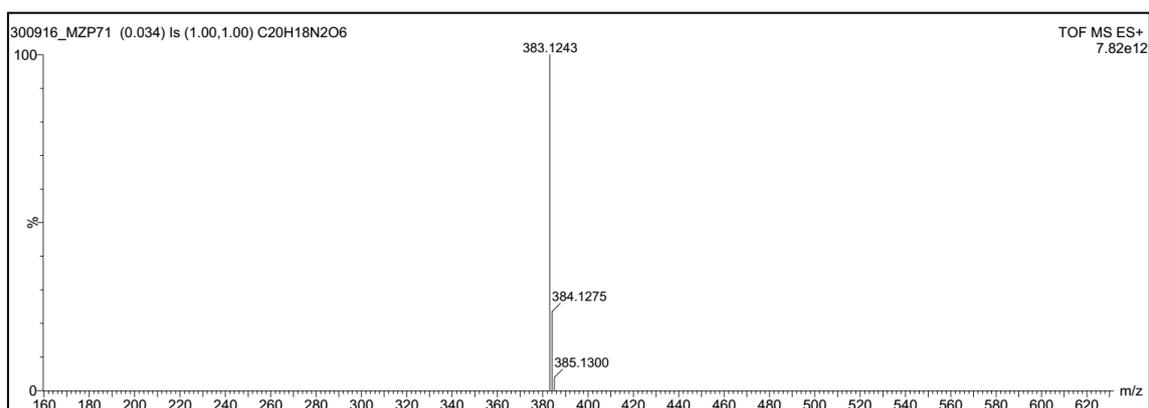


RMN<sup>13</sup>C (500MHz) para **80**.

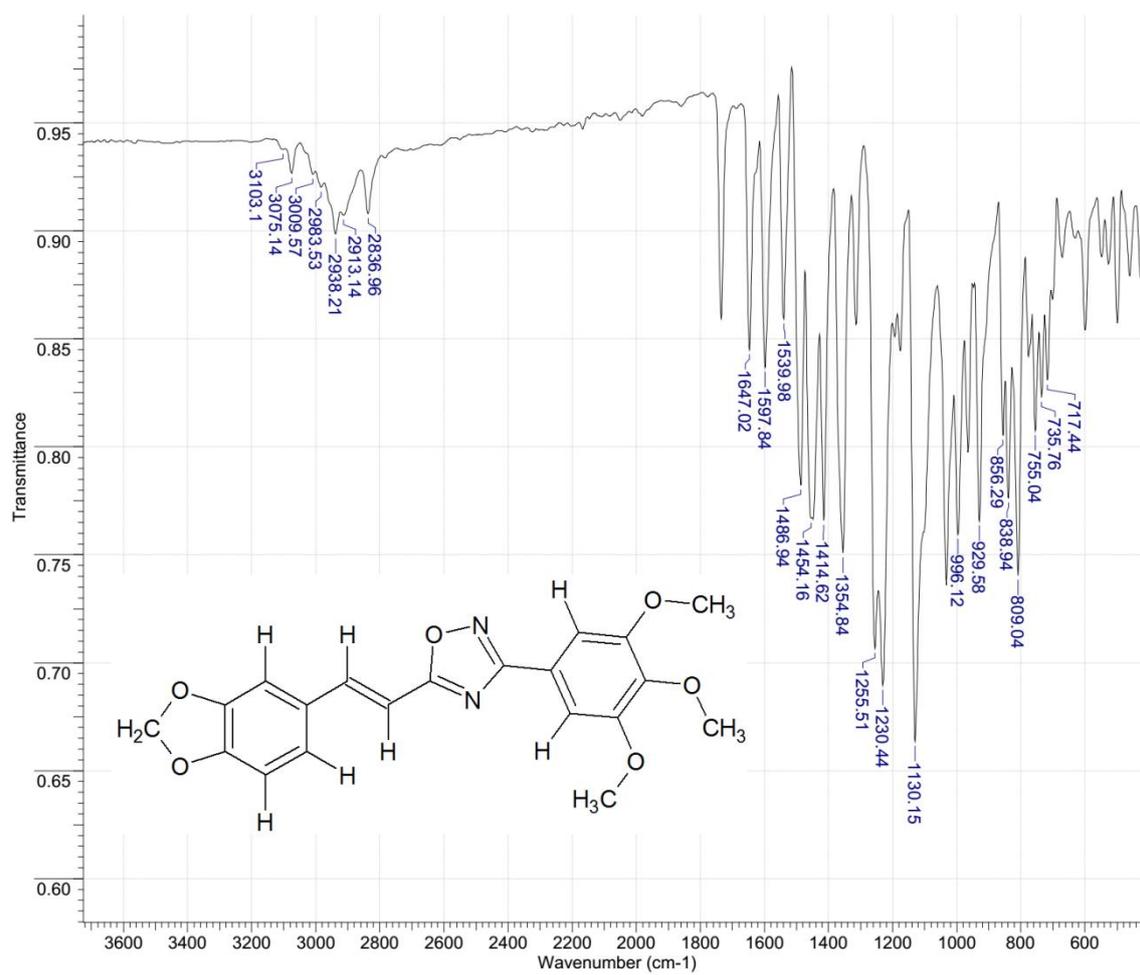
Derivado **81**: 5-[(*E*)-2-(1,3-benzodioxin-5-il)vinil]-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2,4-oxadiazol



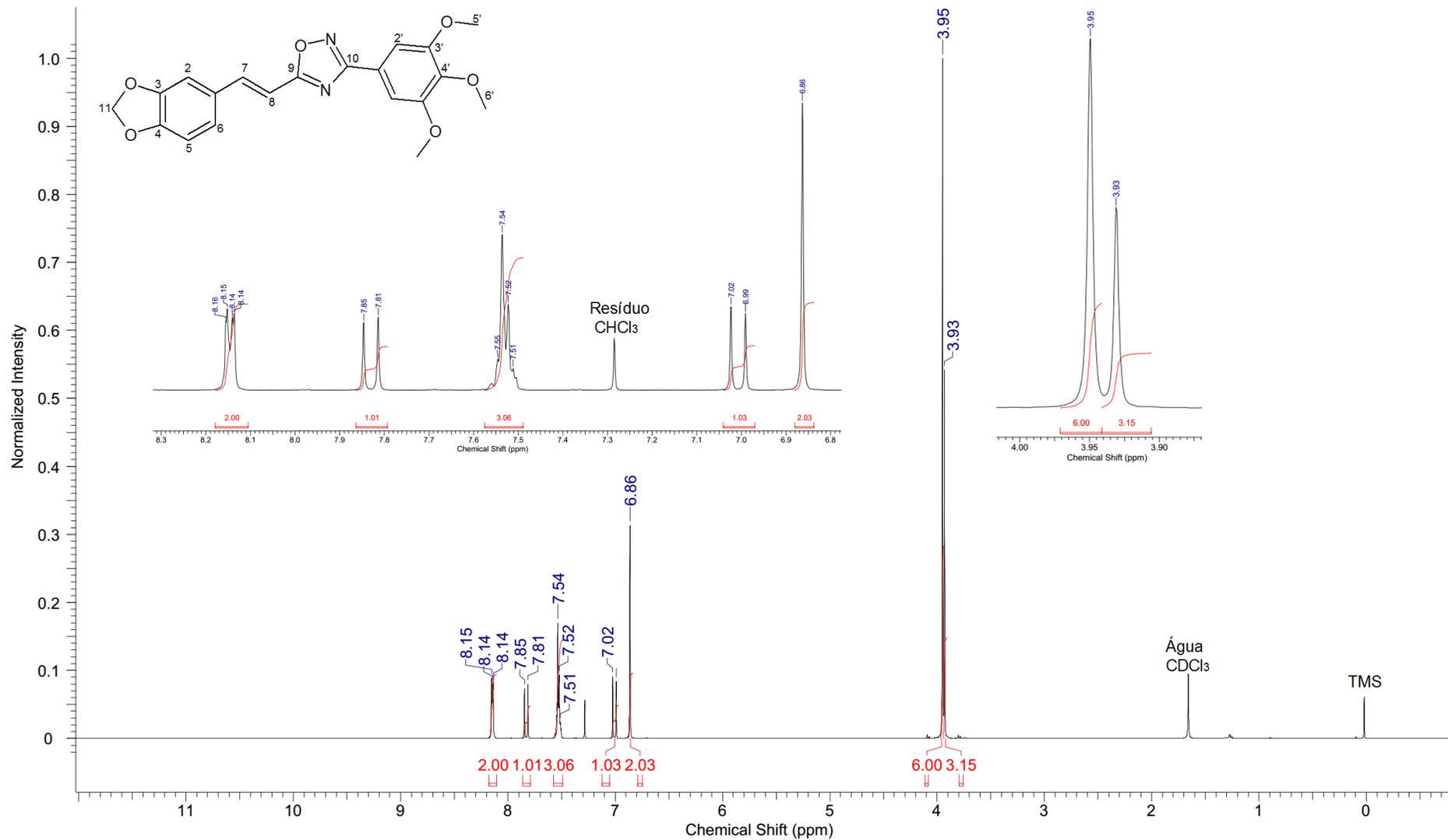
EMBR (IE, 70eV) para **81**.



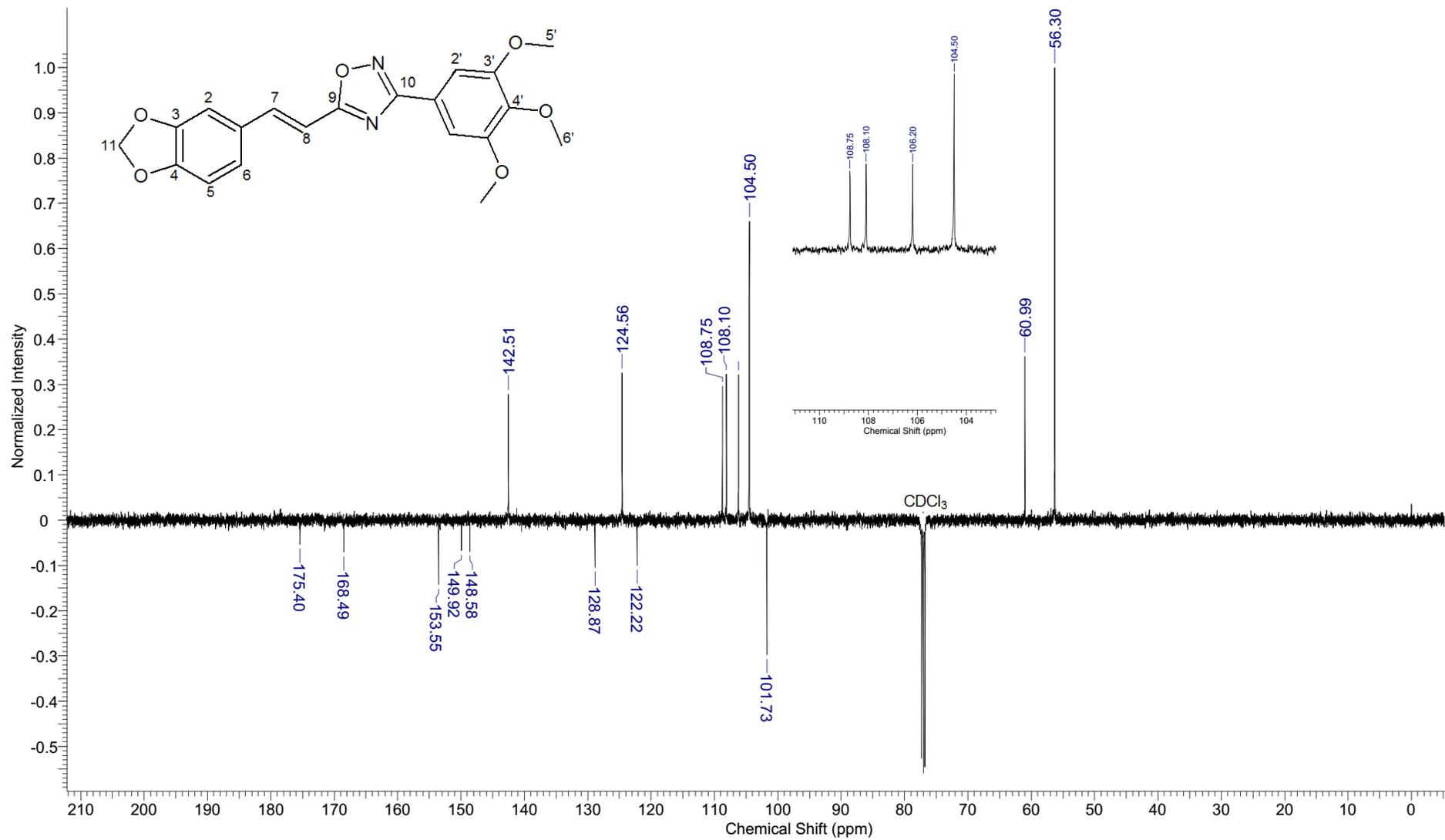
EMAR (ES+) para **81**.



Espectro de IV (KBr) para **81**.

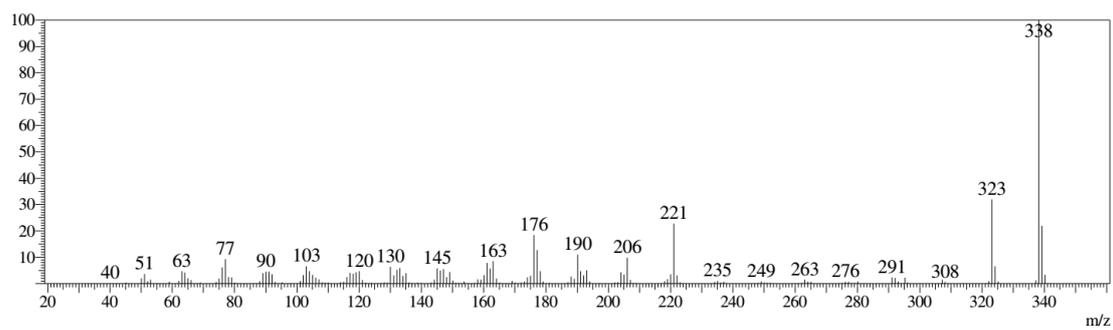


$\text{RMN}^1\text{H}$  (500MHz) para **81**.

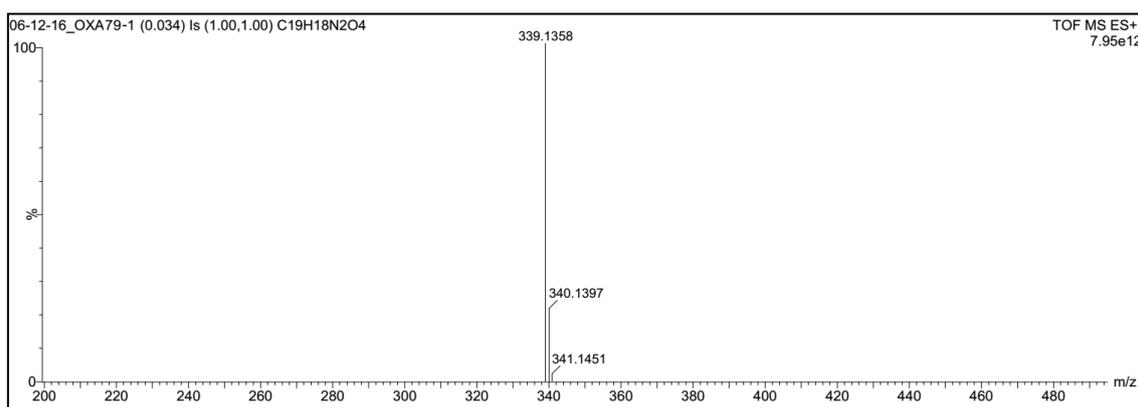


RMN $^{13}\text{C}$  (500MHz) para **81**.

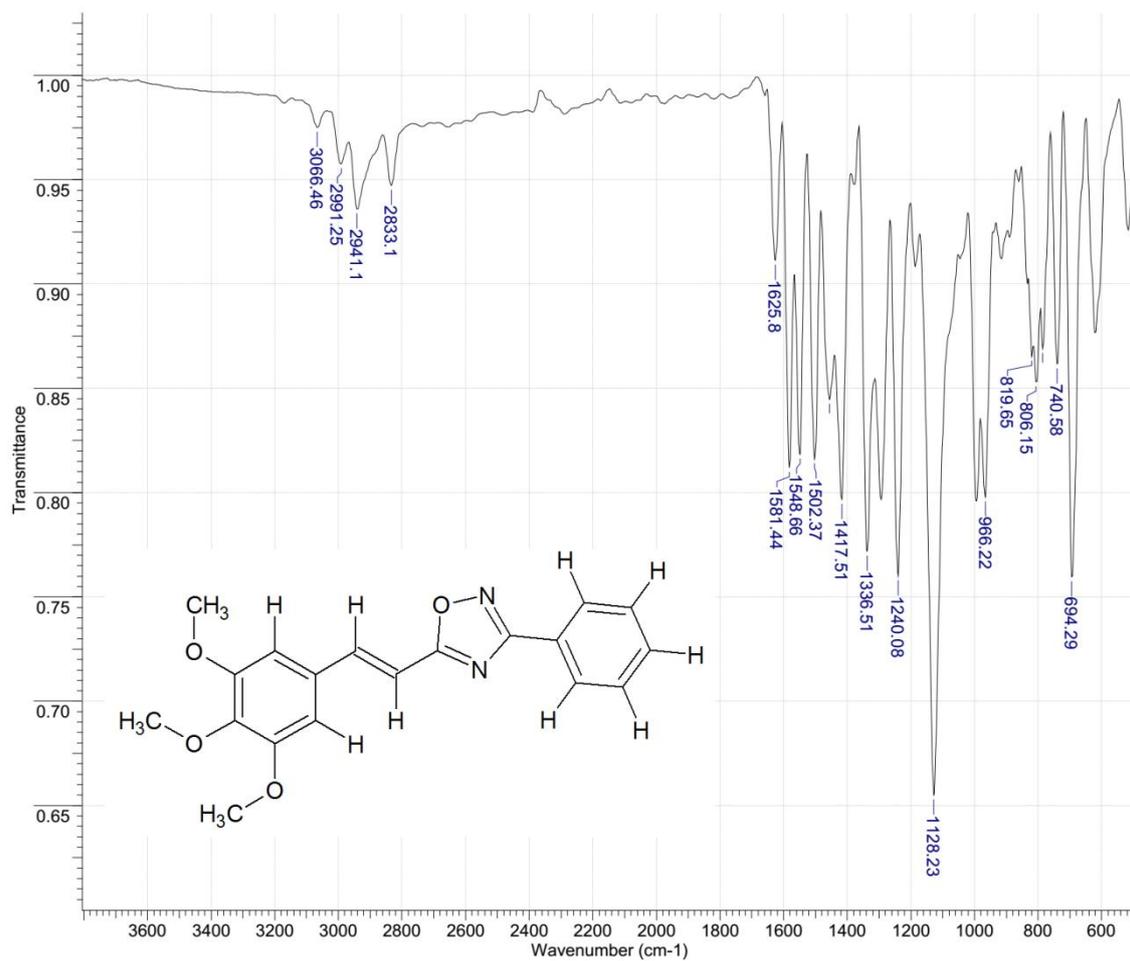
Derivado **82**: 5-[(*E*)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-3-fenil)-1,2,4-oxadiazol



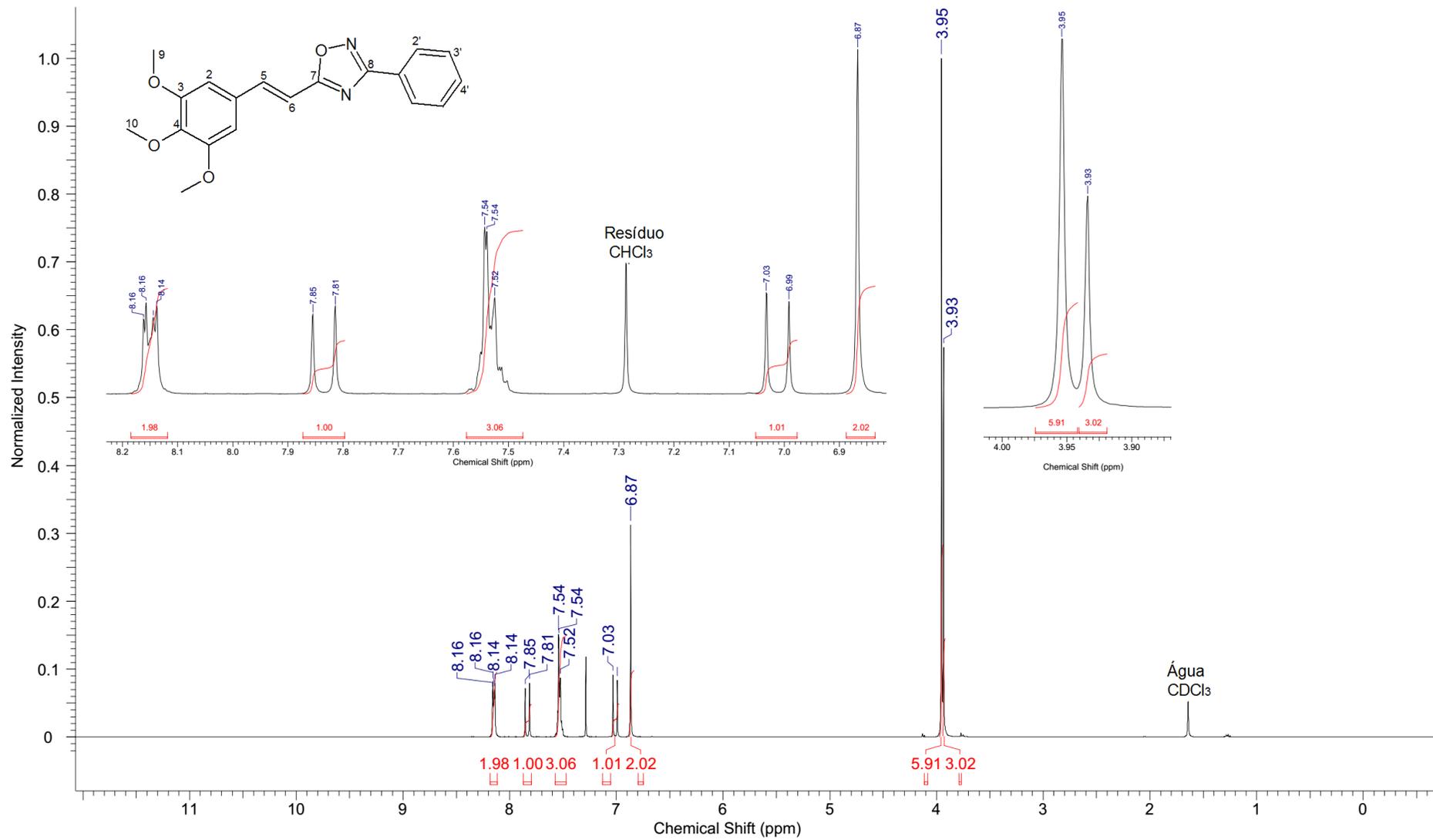
EMBR (IE, 70eV) para **82**.



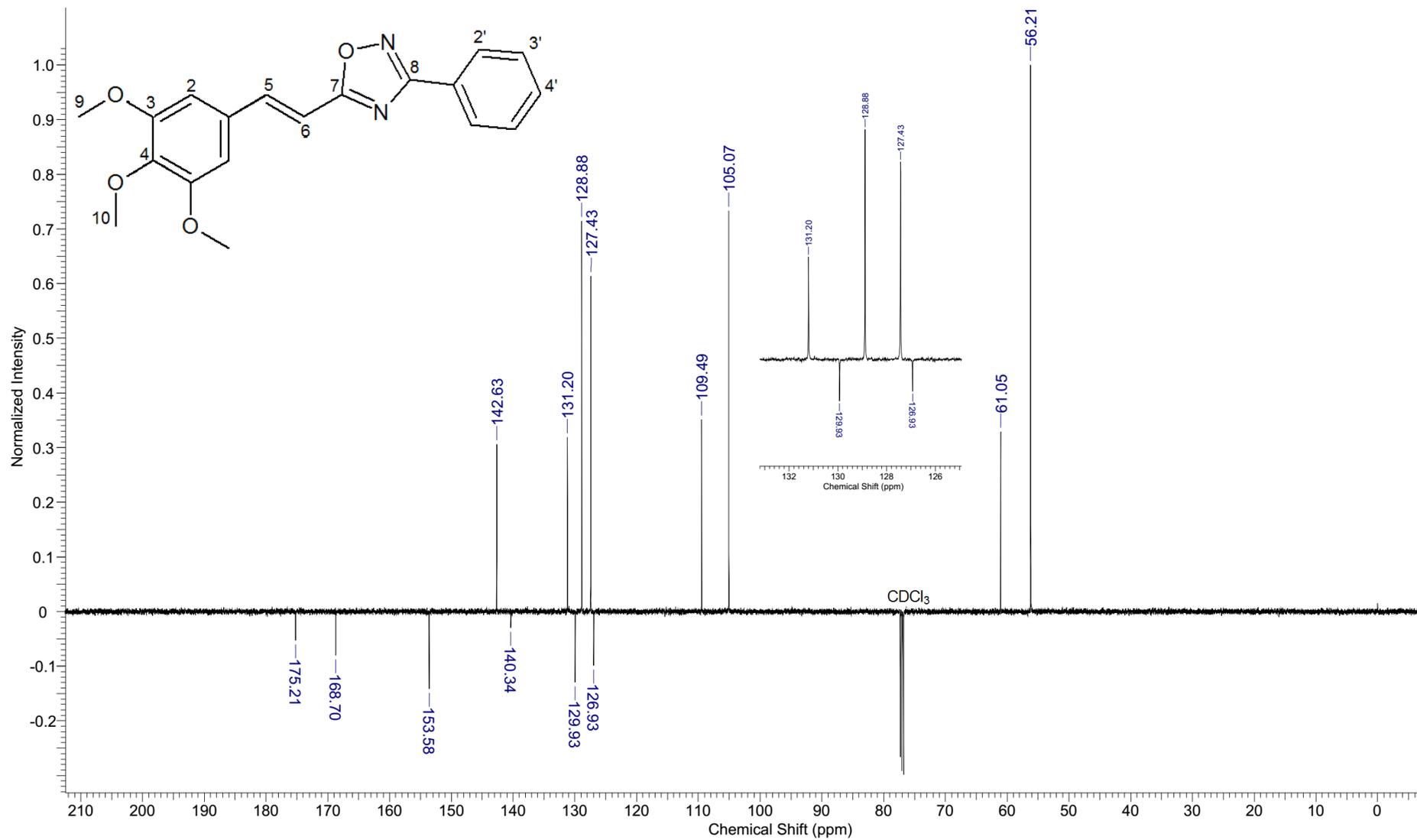
EMAR (ES+) para **82**.



Espectro de IV (KBr) para **82**.

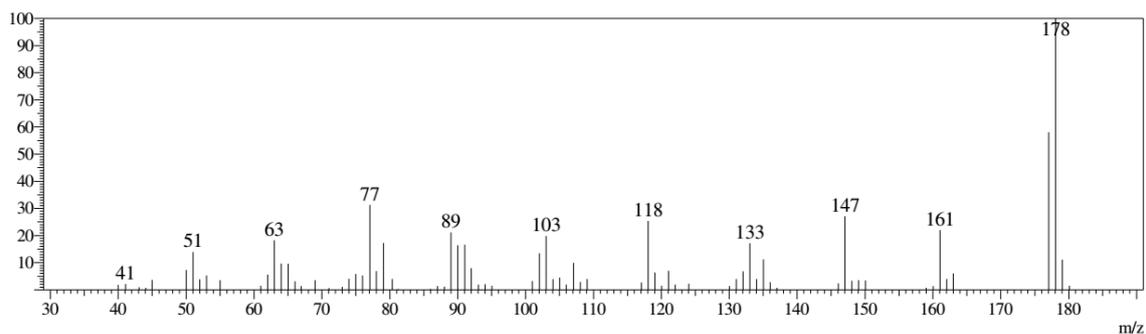


RMN<sup>1</sup>H (500MHz) para **82**.



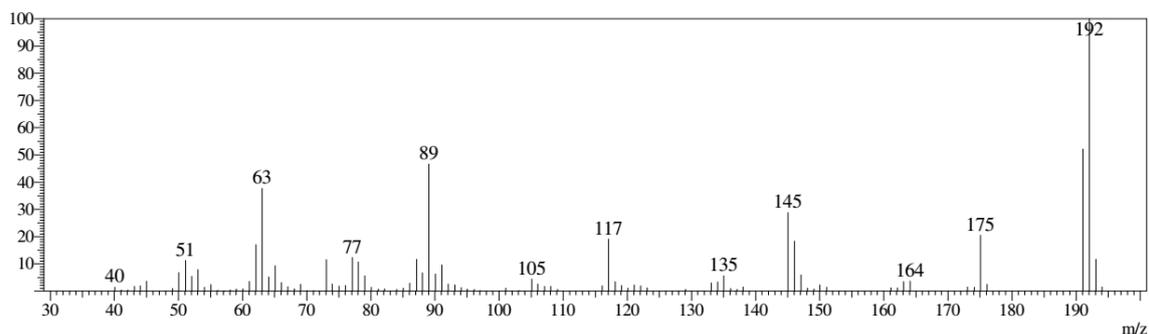
RMN<sup>13</sup>C (500MHz) para **82**.

Intermediário **84**: **Ácido (2E)-3-(3-metóxfenil)prop-2-enóico**



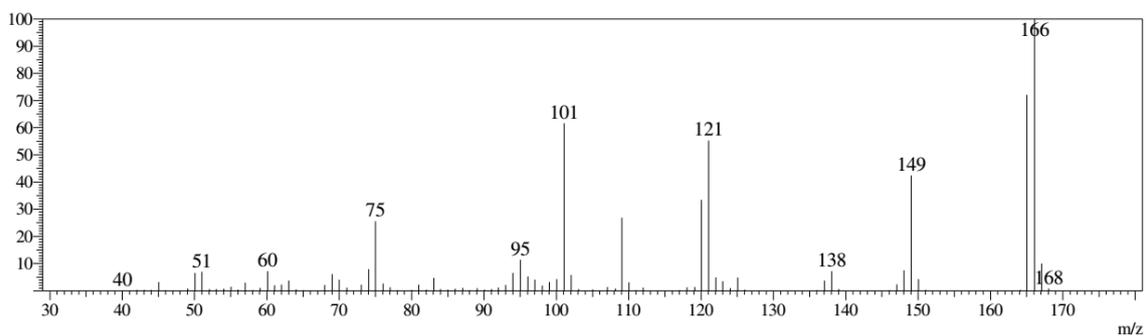
EM (IE, 70eV) para **84**.

Intermediário **86**: **Ácido (2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)prop-2-enóico**



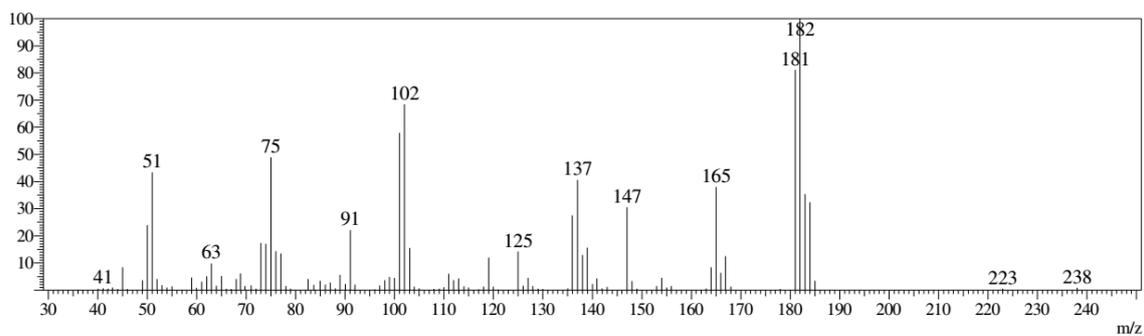
EM (IE, 70eV) para **86**.

Intermediário **90**: **Ácido (2E)-3-(4-flúorfenil)prop-2-enóico**



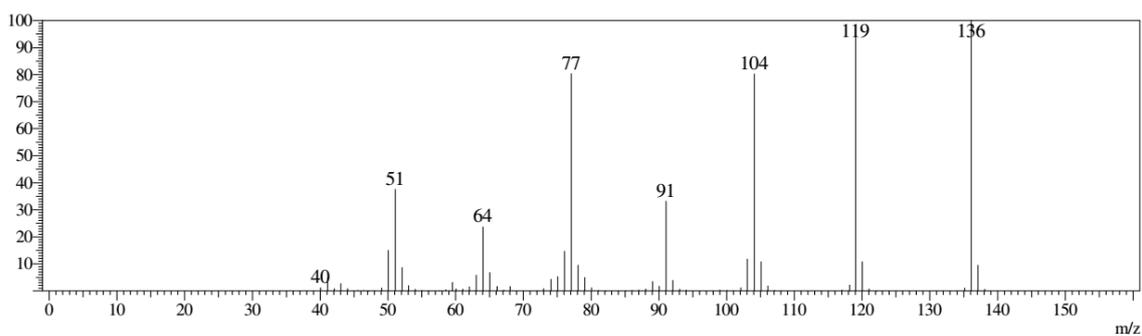
EM (IE, 70eV) para **90**.

Intermediário **91**: **Ácido (2E)-3-(4-clorofenil)prop-2-enóico**



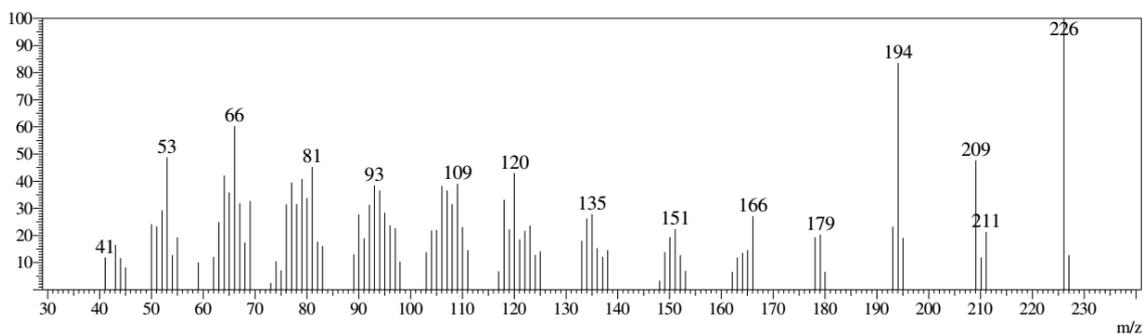
EM (IE, 70eV) para **91**.

Intermediário **94**: *N'*-hidroxibenzenocarboximidamida



EM (IE, 70eV) para **94**.

Intermediário **95**: *N'*-hidroxi-3,4,5-trimetóxi-benzenocarboximidamida



EM (IE, 70eV) para **95**.