

SÍNTESE E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE NOVAS ISOXAZOLIL-ARIL-HIDRAZONAS

Sílvio Leandro Gonçalves Bomfim Reis, Valderes Moraes de Almeida, Gleybson Correia de Almeida, Karinna Moura Boaviagem, Charles Christophe Du Barriere Mendes e Antônio Rodolfo de Faria*

Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50740-521 Recife – PE, Brasil

Alexandre José da Silva Góes, Laudelina Rodrigues Magalhães e Teresinha Gonçalves da Silva

Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-901 Recife – PE, Brasil

Recebido em 12/2/10; aceito em 6/7/10; publicado na web em 16/11/10

SYNTHESIS AND PRELIMINARY EVALUATION OF ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF NOVEL ISOXAZOLYL-ARYL-HYDRAZONES. New 2-isoxazoline aldehydes were synthesized, in good yields, from cycloadduct of the 1,3-dipolar cycloaddition reaction between endocyclic enecarbamate and carboethoxyformonitrile oxide (CEFNO). Condensation of these 2-isoxazoline aldehydes with several phenyl-hydrazines produced new isoxazolyl-aryl-hydrazones, which showed low toxicity and excellent antinociceptive activity, when compared to dipyrone. The antinociceptive activity of isoxazolyl-aryl-hydrazones was performed using the acetic acid-induced mice abdominal constrictions test.

Keywords: 2-isoxazoline aldehydes; hydrazones; antinociceptive activity.

INTRODUÇÃO

Ciclo-oxigenase (COX) é a enzima chave envolvida na biossíntese de prostanoides (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos), que são substâncias envolvidas em diversos processos fisiológicos, assim como em processos patológicos, como a inflamação.¹ Duas isoformas de COX são identificadas, uma forma constitutiva, conhecida como COX-1, e uma forma indutível, conhecida como COX-2, além da COX-3, uma variante da COX-1. Estas enzimas são sensíveis à inibição por substâncias anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs).

Parece evidente que COX-1 desempenha um papel chave na homeostase, enquanto que a COX-2 atua em condições patológicas como inflamação ou mesmo proliferação de câncer.

AINEs clássicos agem como inibidores não seletivos da COX, sendo utilizados como anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos, principalmente para tratar a inflamação crônica. No entanto, AINEs não seletivos podem causar efeitos colaterais relacionados com a inibição da COX-1 como, por exemplo, a irritação gastrointestinal, podendo levar à hemorragia ulcerativa.² Desta forma, a obtenção de inibidores seletivos para a COX-2 pode contornar ou minimizar esses efeitos colaterais.

Por outro lado, substâncias oriundas da catálise da enzima 5-Lipoxygenase (5-LO), como o leucotrieno B₄, também contribuem para a hiperalgesia durante a inflamação, por diminuir os limiares mecânicos e térmicos das Fibras C.³

Pelas razões mencionadas acima, substâncias que inibem tanto a COX, quanto a 5-LO, se tornam alvos em química medicinal, visando o combate à dor, causada por processos inflamatórios.

Substâncias que contêm em suas estruturas uma porção hidrazona têm sido relatadas na literatura como inibidores da COX e da 5-LO, apresentando, portanto, pronunciadas atividades analgésica e anti-inflamatória. Muitas evidências relatadas na literatura demonstram que o grupamento hidrazona, presente em derivados fenil-hidrazonas, apresenta caráter farmacofórico para a inibição de COX.⁴

Várias aril e acil-hidrazonas são relatadas na literatura, apresentando pronunciadas atividades analgésica e anti-inflamatória, além de

outras atividades, como anticonvulsivante e antimicrobiana.⁵

Recentemente, uma nova reação de cicloadição 1,3-dipolar foi desenvolvida, envolvendo enecarbamatos endocíclicos e *N*-óxidos de nitrila, onde novas 2-isoxazolininas aza-bicíclicas foram obtidas.⁶ Derivados carboxamidas dessas 2-isoxazolininas **1** (Figura 1) apresentaram intensa atividade *in vivo*, com indícios de atividade no sistema nervoso central e possível atividade analgésica, verificadas nos testes de toxicidade aguda.⁷ Testes específicos de atividade anti-

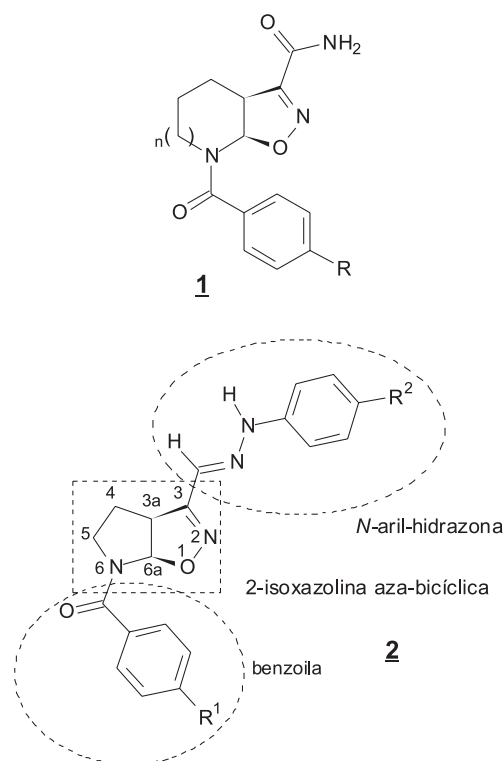


Figura 1. 3-carboxamidas e derivados híbridos hidrazona/2-isoxazolinina aza-bicíclica

inflamatória dessas carboxamidas isoxazolínicas foram realizados, tendo apresentado resultados bastante promissores.

De fato, percebe-se que várias substâncias descritas, que possuem o núcleo 2-isoxazolina, apresentam variadas atividades biológicas, como antimicrobiana, antiviral, antitrombótico, anti-inflamatória, analgésica, entre outras.⁸

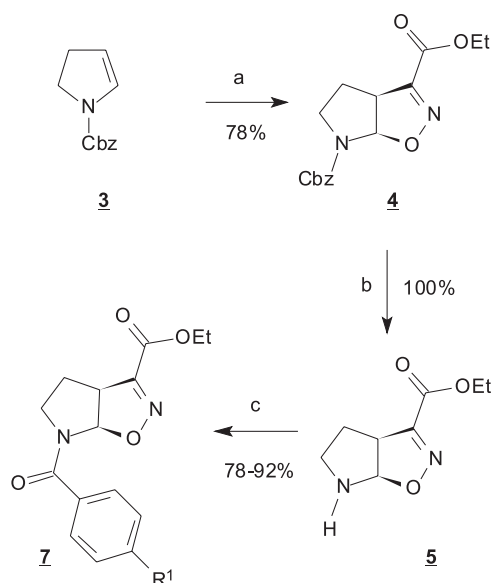
A conjugação de características estruturais definidas de dois compostos bioativos distintos, em uma nova molécula, representa a estratégia de hibridização molecular de um composto protótipo.⁹ Portanto, o objetivo deste trabalho foi a síntese de novos derivados híbridos, 2-isoxazolil-aril-hidrazonas **2** (Figura 1), contendo o núcleo pirrolidina[3,2-*d*]2-isoxazolina e a função hidrazona, visando a avaliação prévia da atividade antinociceptiva dos mesmos, com perspectivas posteriores de testes mais específicos para se averiguar um possível mecanismo de ação dos novos fármacos, quanto à seletividade para as enzimas COX-1 e COX-2 ou inibidores duais LO/COX.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parte química

Os aldeídos isoxazolínicos **8**, necessários para a condensação com as fenil-hidrazinas *para*-substituídas, foram obtidos a partir do cicloaduto **4**, originado de uma reação de cicloadição 1,3-dipolar do enecarbamato endocíclico **3** com o óxido de carboetoxiformonitrila (CEFNO).^{10,11} Esta reação de cicloadição foi desenvolvida em trabalhos anteriores, sendo até aquele momento inédita na literatura.⁶ A 2-isoxazolina aza-bicíclica racêmica **4** foi obtida em excelente rendimento, de forma régio e diastereoespecífica, conforme previsto pela teoria de orbitais de fronteira.¹²

A posterior reação de hidrogenólise do cicloaduto isoxazolínico **4** propiciou a obtenção da 2-isoxazolina desprotegida **5** de forma quantitativa. Em seguida, *N*-benzilação em N6, com cloretos de benzoíla *para*-substituídos, levou aos respectivos aza-biciclos *N*-benzilaos **7** em ótimos rendimentos (Esquema 1).^{6,13}

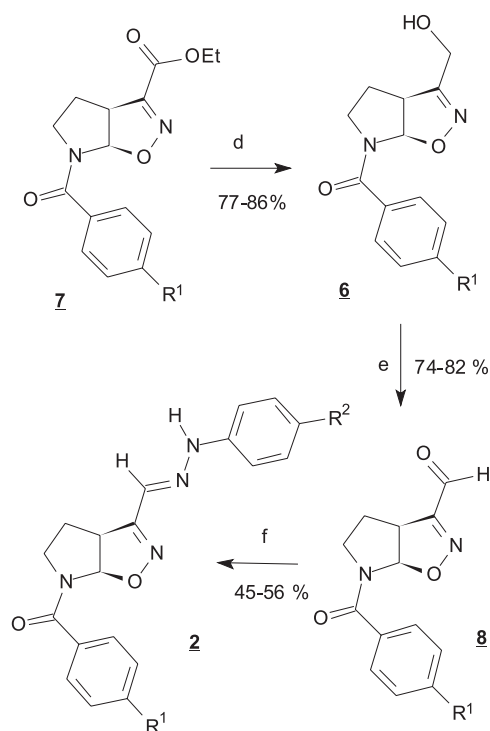


Esquema 1. Rota sintética para obtenção das *N*-benzil-isoxazolininas **7**: a) cloro-oxi-imidoacetato de etila, Et_3N , $CHCl_3$, t.a.; b) H_2 , Pd/C , metanol; c) cloretos de benzoíla, Et_3N , $CHCl_3$

Tentativas de redução direta do éster, em C3, dos derivados **7**, aos respectivos aldeídos, não foram bem sucedidas. Ao se utilizar DIBAL-H e super-hidreto como redutores, os ésteres em C3 perma-

neceram intactos nas condições reacionais convencionais empregadas. Redutores mais fortes poderiam reduzir também as amidas em N6. O problema na obtenção direta dos aldeídos **8** foi contornado, reduzindo-se os ésteres em C3 aos respectivos alcoóis, com posterior oxidação branda de Swern.¹⁴ A redução do éster em C3 com $NaBH_4$ foi bem sucedida, não interferindo na carbonila amídica em N6, resultando nos respectivos alcoóis isoxazolínicos **6**. Dependendo da qualidade do $NaBH_4$ utilizado, percebeu-se primeiramente uma transesterificação, onde ésteres metílicos em C3 foram obtidos, visto que metanol fora utilizado como solvente nas reações com $NaBH_4$. Este fenômeno provavelmente é devido à catálise promovida por traços de ácidos de Lewis (boranos) presentes no $NaBH_4$. Ao se utilizar $NaBH_4$ de boa procedência, os produtos de transesterificação não foram detectados, o que favoreceu a obtenção direta dos respectivos alcoóis **6**. Após oxidação dos alcoóis **6**, via oxidação de Swern, os aldeídos isoxazolínicos em C3 foram obtidos em ótimos rendimentos.

De posse dos aldeídos **8**, procedeu-se à etapa de condensação dos mesmos com as fenil-hidrazinas *para*-substituídas.^{3,15} As isoxazolil-aril-hidrazonas **2** foram obtidas em rendimentos moderados, devido principalmente à dificuldade de isolamento das mesmas das águas-mãe, apesar de ter havido total consumo dos aldeídos no meio reacional (Esquema 2). A Tabela 1 lista os rendimentos de todas as reações novas executadas.



Esquema 2. Rota sintética para obtenção das isoxazolil-aril-hidrazonas **2**: d) $NaBH_4$, metanol; e) $SOCl_2$, DMSO, Et_3N , CH_2Cl_2 ; f) fenil-hidrazinas, HCl_{cat} , etanol

A caracterização do bicyclo pirrolidina[3,2-*d*]2-isoxazolina, presente no cicloaduto **4** e também em **2**, **5**, **6**, **7** e **8**, se faz facilmente através de espectrometria de RMN, nas quais sinais diagnósticos da formação do cicloaduto são evidentes, como um duplete próximo a 6,5 ppm em RMN 1H , referente ao H6a e como um sinal próximo a 95 ppm em RMN ^{13}C , referente ao C6a. Com exceção da isoxazolina desprotegida **5**, todos os derivados isoxazolínicos **4**, **6**, **7**, **8** e **2** possuem uma função amida ou carbamato em N6. Este fato fez com que os mesmos apresentassem sinais de rotâmeros em RMN de 1H e de ^{13}C . A presença de rotâmeros, devido à alta barreira rotacional energética

Tabela 1. Identificação e rendimentos das novas substâncias 2-isoxazolínicas sintetizadas

Substância	R ¹	R ²	Rendimento (%)
2a	Cl	Cl	54
2b	Cl	F	52
2c	Cl	OMe	49
2d	F	Cl	56
2e	F	F	53
2f	F	OMe	40
6a	F	--	86
6b	Cl	--	77
7a	F	--	78
7b	Cl	--	92
8a	F	--	74
8b	Cl	--	82

das ligações amídicas e carbamídicas, deixa os espectros de RMN complexos.¹⁶ No entanto, quando os espectros foram obtidos à 60 °C, ocorreu total coalescência dos sinais de rotâmeros. Outra peculiaridade dos espectros de RMN foi a deformação e alargamento do sinal de H₆, assim como de outros hidrogênios exocíclicos do biciclo e também baixa resolução dos sinais dos carbonos do anel bicíclico.

Os hidrogênios diastereotópicos do grupamento hidroximetila dos alcoóis **6** apresentaram-se como dubletos em RMN ¹H em 4,35 e 4,45 ppm, respectivamente, com uma constante de acoplamento de 14 Hz, enquanto que o carbono metilênico da hidroximetila dos alcoóis apresentou um deslocamento químico próximo de 55 ppm. Os alcoóis **6** também apresentaram nos espectros de IV bandas características em torno de 3505 cm⁻¹, relativamente finas e intensas, caracterizando o estiramento da ligação O-H do grupamento hidroximetila em C3, além do desaparecimento da banda intensa em 1715 cm⁻¹, referente à carbonila do éster em C3.

A oxidação de Swern dos alcoóis **6** foi muito bem sucedida e os respectivos aldeídos **8** foram caracterizados, principalmente pelos sinais em 9,8 e 185 ppm nos espectros de RMN ¹H e ¹³C, respectivamente. Em relação aos espectros no IV, os aldeídos **8** apresentaram uma banda intensa em 1710 cm⁻¹, característica do estiramento da carbonila do aldeído, que não havia no álcool de partida.

As reações de condensação dos aldeídos **8** com as fenil-hidrazinas *para*-substituídas proporcionaram a formação de um único produto. Muito provavelmente, apenas a hidrazona diastereoisomérica de configuração *E* tenha sido formada, devido a questões cinético-termodinâmicas. Como isoxazolil-hidrazonas ainda não foram descritas na literatura, não há como fazer analogia de deslocamentos químicos dos hidrogênios HC=N de outras hidrazonas, que porventura já possuíssem sua estereoquímica relativa determinada, visto que se tem uma peculiaridade estrutural, pois a função hidrazona, nas moléculas sintetizadas, pertence a uma espécie de heterodieno associado à isoxazolina. Outro fato é que os hidrogênios HC=N têm seus sinais geralmente coincidentes com os sinais dos hidrogênios aromáticos, sendo detectada a presença dos mesmos pela integração dos sinais. Diante desses fatos, se faz necessária a obtenção de cristais das hidrazonas, para a obtenção da difração de raio-X das mesmas, visando a confirmação da estereoquímica relativa. No entanto, todas as hidrazonas isoxazolínicas **2** apresentaram um singlete próximo à 11 ppm em RMN ¹H, correspondendo ao hidrogênio NN-H da função hidrazona, conforme deslocamentos químicos descritos na literatura para NN-H de outras hidrazonas.³ Com relação aos espectros no IV,

bandas finas e relativamente intensas, correspondentes ao estiramento NN-H, estão presentes entre 3240-3270 cm⁻¹ confirmando, assim, a função hidrazona nas estruturas dos híbridos **2**. Todos os intermediários inéditos, alcoóis **6**, aldeídos **8**, assim como as hidrazonas **2**, apresentaram os respectivos picos M⁺ + 1, com alta resolução, nos espectros de massas obtidos por LCMS-IT/TOF, tendo como fonte de ionização *electrospray* (ESI).

Parte biológica

No que concerne à avaliação biológica, as isoxazolil-hidrazonas **2a** e **2d** foram submetidas preliminarmente ao estudo de toxicidade aguda.¹⁷ Todos os aspectos reacionais de uma substância no organismo vivo devem ser considerados, quanto aos sinais e sintomas de intoxicação e o percentual de mortalidade para o cálculo de doses letais. Estes valores são calculados estatisticamente a partir de dados obtidos experimentalmente, correlacionando as doses das substâncias e a mortalidade dos animais.

As hidrazonas **2a** e **2d** revelaram-se de baixa toxicidade na dose de 1500 µmol/kg. Foram observados alguns efeitos depressores do sistema nervoso central, comuns a todos os grupos de animais, como ptose, sonolência, contorções abdominais, abaixamento do trem posterior e diminuição da frequência respiratória. No entanto, nenhum animal veio a óbito na dose testada após o período determinado de observação, não sendo possível, portanto, a determinação da DL₅₀. Desta maneira, pode-se concluir que as novas isoxazolil-hidrazonas possuem baixa toxicidade, quando testadas na dose dez vezes superior à dose que apresentou uma excelente atividade terapêutica (atividade antinociceptiva).

Com relação à atividade antinociceptiva, as isoxazolil-hidrazonas **2a-f**, administradas por via intraperitoneal, na dose de 150 µmol/kg, inibiram significativamente as contorções abdominais induzidas por ácido acético em relação ao controle (Tabela 2).^{17,18}

Tabela 2. Percentual de inibição das hidrazonas no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

Isoxazolil-hidrazonas (150 µmol/kg)	Inibição (%)	Médias das contorções (± E.P.)*
2a	85,8	9,8 ± 1,4
2b	69,6	21,0 ± 2,2
2c	72,0	19,2 ± 1,3
2d	69,3	21,2 ± 3,0
2e	72,1	19,2 ± 1,9
2f	76,0	16,4 ± 2,5
Dipirona (padrão)	59,3	28,1 ± 2,8
Controle (salina)	---	69,1 ± 2,1

*Resultados significativos para o nível de p<0,05.

Os fármacos que produzem efeitos analgésicos podem atuar em nível periférico e central, seja modulando ou inibindo a síntese de substâncias mediadoras da inflamação.

A algisia induzida por administração intraperitoneal de ácido acético em camundongos é um modelo de efeito periférico e não específico, envolvendo a liberação de prostaglandinas, serotonina, bradicinina, substância P e mediadores do sistema simpático.¹⁹

Os percentuais de inibição foram calculados através da fórmula: Percentual de inibição = (1-Vt/Vc)x100, onde Vt e Vc representam, respectivamente, a média das contorções dos grupos tratados de camundongos e a do controle. Os percentuais de inibição, assim como as médias das contorções resultantes da administração das isoxazolil-hidrazonas testadas, estão sumarizados na Tabela 2.

Os resultados de atividade antinociceptiva mostraram que na dose de 150 $\mu\text{mol/kg}$ as isoxazolil-hidrazonas **2a-f** apresentaram excelentes resultados quando comparados à dipirona, que foi utilizada como fármaco padrão. A inibição das contorções abdominais propiciadas pelas isoxazolil-hidrazonas **2a-f** é sugestiva do bloqueio da reação dolorosa por mecanismo periférico, através da inibição da liberação de prostaglandinas e mediadores do simpático. Essas considerações, embora pertinentes, não permitem atribuir o mecanismo exato de atividade antinociceptiva das substâncias testadas, mas indicam uma possibilidade de estudos posteriores, onde testes específicos serão realizados, para aprofundamento acerca do mecanismo de ação.

PARTE EXPERIMENTAL

Parte química

As reações de síntese do enecarbamato, a de cicloadição 1,3-dipolar, as de formação dos alcoóis e as de formação dos aldeídos são extremamente sensíveis à umidade e foram realizadas sob atmosfera de argônio, em aparato previamente seco em estufa por 4 h (120 °C). As reações de síntese das hidrazonas não tiveram essas precauções em relação à umidade.

Clorofórmio foi tratado previamente com cloreto de cálcio anidro e trietilamina foi tratada com hidreto de cálcio e destilados antes do uso. Metanol foi seco com $\text{Mg}^\circ/\text{I}_2$. THF foi tratado com sódio/benzofenona e destilado imediatamente antes do uso. DMSO foi seco sobre peneira molecular 4 Å, previamente seca em estufa por 24 h. Etanol absoluto foi utilizado nas reações de condensação dos aldeídos com as fenil-hidrazinas, sem necessidade de pré-secagem.

As reações de hidrogenólise foram realizadas sob pressão positiva de hidrogênio, borbulhando-se o gás no meio reacional por cerca de 1 h.

Acetato de etila e hexano, utilizados nas cromatografias em coluna, foram bidestilados.

A análise por cromatografia em camada delgada (CCD) foi efetuada em cromatofolhas de alumínio (gel de sílica 60), com espessura de 0,2 mm, contendo indicador para 254 nm. A visualização das manchas foi efetuada com lâmpada de UV ENF – 2400 C/F e/ou ácido fosfomolibdico 7% em etanol, seguido de aquecimento ou, ainda, por absorção de iodo.

As colunas cromatográficas foram empacotadas com gel de sílica 60 (230-400 mesh) e eluídas sob pressão (Flash).

Os produtos sólidos tiveram seus pontos de fusão aferidos em aparelhos Polax WRS-1 e não foram corrigidos.

Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos em aparelhos Bruker IFS 66 (transformada de Fourier), com as frequências de absorção sendo expressas em cm^{-1} , utilizando-se pastilhas ou janelas de KBr.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em aparelhos Varian Unity 300 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm, tendo como padrão interno o tetrametilsilano ou CHCl_3 para RMN ^1H e DMSO ou CDCl_3 para RMN ^{13}C . Os sinais dos espectros de RMN ^1H são designados da seguinte forma: deslocamento químico (ppm), multiplicidade (s = singleto, d = dubleto, dl = dubleto largo, t = tripleto, tl = tripleto largo, q = quarteto, dd = duplo dubleto, m = multiplete, sl = sinal largo), constante de acoplamento (Hz) e números de hidrogênios.

Os espectros de massas de alta resolução (HRMS) foram obtidos em aparelho Shimadzu LCMS IT/TOF, bomba LC 20AD, injetor Sil-20 A, tendo como fonte de ionização *electrospray* (ESI).

Procedimento experimental para a redução do éster. Síntese do álcool **6a**

A uma solução do éster **7a** (3,767 g; 12,30 mmol) em metanol

(180 mL), a 0 °C e vigorosa agitação, adicionou-se NaBH_4 (1,397 g; 36,92 mmol) em pequenas porções. Após a adição, deixou-se em agitação por cerca de 1 h à 0 °C e depois 40 min à t.a. A reação foi monitorada por CCD, onde se visualizou a formação do álcool desde o início da adição do NaBH_4 . Após completo consumo do éster **7a**, remoção do metanol e solubilização do produto em 50 mL de acetato de etila, foram adicionados 30 mL de solução saturada de NaCl, procedendo-se à extração com acetato de etila (3 x 40 mL). As fases orgânicas foram combinadas e secas sobre MgSO_4 anidro. Após filtração e remoção do solvente, obteve-se um óleo incolor bastante viscoso, que, após ser submetido à cromatografia em coluna *flash* (gel de sílica, $\text{AcOEt}/\text{hexano}$ 7:3), foram obtidos 2,600 g do respectivo álcool puro **6a**, com um rendimento de 86%; $R_f = 0,1$ (acetato de etila/hexano 1:1); RMN ^1H (DMSO- d_6 , δ , ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros: 2,06 (m, 1H); 2,27 (dd; $J = 12,6$; $J = 5,7$ Hz; 1H); 3,00 (m, 1H) rotâmero em 3,40; 4,00 à 4,20 (m, 2H); 4,24 (m, 2H); 5,39 (t; $J = 6,0$; 1H OH); 6,03 (d; $J = 7,5$; 1H); rotâmero em 6,53; 7,33 (m; 2H); 7,67 (m; 2H); RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , δ , ppm, 75 MHz, t.a.): 25,9 (CH_2) rotâmero em 27,3; 43,5 (CH_2) rotâmero em 47,4; 52,8 (CH) rotâmero em 50,8; 55,2 (CH_2); 92,7 (CH) rotâmero em 90,1; 115,3 (d; $J = 21$; CH); 130,3 (CH); 132,1 (C); 159,9 (C=N); 164,7 e 161,5 (d; $J = 240$, C); 167,9 (C=O); IV (janela de KBr, cm^{-1}), principais sinais: 3506, 3052, 2970, 2884, 1639, 1597, 1500, 1415, 1210, 1153, 845; HRMS-ESI-IT/TOF (m/z): $\text{M}^+ + \text{H}$, calc. para $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{FN}_2\text{O}_3$: 265,0988; encontrado: 265,0990 **6b**: óleo incolor, 77% rendimento, $R_f = 0,11$ (acetato de etila/hexano 1:1); RMN ^1H (CDCl_3 , δ , ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros: 2,00 à 2,20 (m, 1H); 2,30 (dd, $J = 13$; $J = 5,7$; 1H); 2,90 à 3,65 (m, 2H); 4,00 (m, 1H); 4,35 (d; $J = 14,1$; 1H); 4,44 (d; $J = 14,1$; 1H); 5,97 (d; $J = 7,0$; 1H) rotâmero em 6,72; 7,40 (d; $J = 8,1$; 2H); 7,64 (dl; $J = 8,1$; 2H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ , ppm, 75 MHz, t.a.): 26,7 (CH_2); 43,4 (CH_2) rotâmero em 47,0; 52,6 (CH); 56,8 (CH_2); 93,3 (CH) rotâmero em 91,0; 128,6 (CH); 129,6 (CH); 133,3 (C); 136,9 (C); 158,9 (C=N); 169,1 (C=O); IV (janela de KBr, cm^{-1}), principais sinais: 3508, 3080, 2970, 2888, 1632, 1590, 1505, 1420, 1215, 848. HRMS-ESI-IT/TOF (m/z): $\text{M}^+ + \text{H}$, calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_3$: 281,0693; encontrado: 281,0703.

Procedimento experimental para a oxidação de Swern. Síntese do aldeído **8b**

Foram adicionados a um balão, 1,2 mL de cloreto de oxalila (14,18 mmol) e 26 mL de CH_2Cl_2 seco e deixou-se sob agitação e atmosfera de argônio à -60 °C. Paralelamente, foram preparadas duas soluções; a primeira (solução 1) contendo 2 mL de DMSO seco (28,15 mmol) em 6 mL de CH_2Cl_2 e a segunda (solução 2) contendo o álcool **6b** (3,172 g; 11,3 mmol) em 7 mL de CH_2Cl_2 . A solução 1 foi adicionada ao balão reacional, permanecendo em agitação por 2 min. Em seguida, a solução 2 foi adicionada lentamente ao balão reacional durante 5 min, permanecendo em agitação por 15 min adicionais. Em seguida, adicionou-se a trietilamina (8 mL, 57,50 mmol), deixando-se a reação em agitação por 5 min. Através de CCD verificou-se que todo o álcool havia sido consumido, evidenciando-se a formação do aldeído **8b**. Após remoção do solvente, o produto bruto foi submetido à cromatografia em coluna *flash* (gel de sílica $\text{AcOEt}/\text{hexano}$ 1:4), no qual foram obtidos 2,350 g do aldeído **8b** puro, correspondendo a um rendimento de 74%. Sólido amorfo amarelo, $R_f = 0,43$ (acetato de etila/hexano 2:3), $p.f = 117-119$ °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , δ , ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros: 2,00 a 2,40 (m, 2H); 3,07 (m, 1H) rotâmero em 3,94; 4,16 (m, 2H); 6,30 (d; $J = 6,6$; 1 H) rotâmero em 6,81; 7,61 (sl; 4H); 9,81 (s, 1H). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , δ , ppm, 75 MHz, t.a.): 26,2 (CH_2) rotâmero em 27,6; 43,6 (CH_2) rotâmero em 46,7; 48,6 (CH) rotâmero em 47,3; 96,9 (CH) rotâmero em 94,0; 128,6 (CH); 129,6; (CH); 134,0 (C); 135,4 (C); 159,8 (C=N); 167,8 (C=O), 185,0 (C=O); IV (pastilha de KBr,

cm⁻¹), principais sinais: 3030, 2980, 2861, 1709, 1626, 1580, 1398, 1250, 1090, 915, 843. HRMS-ESI-IT/TOF (*m/z*): M⁺ + H, calcd. para C₁₃H₁₁ClN₂O₃: 279,0536; encontrado: 279,0550. **8a**: 82% de rendimento, sólido amorfo amarelo, p.f. = 112-115 °C, Rf = 0,45 (acetato de etila/hexano 2:3), RMN ¹H (CDCl₃, δ, ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros: 2,10-2,20 (m, 2H); 3,13 (sl; 1H) rotâmero em 3,66; 4,04 (t; J = 8,1; 1H); 4,44 (sl; 1H); 6,24 (sl; 1H); 7,12 (t; J = 8,4; 2H); 7,69 (sl; 2H); 9,88 (s, 1H); RMN ¹³C (CDCl₃, δ, ppm, 75 MHz, t.a.): 27,3 (CH₂); 43,4 (CH₂); 48,4 (CH); 97,1 rotâmero em 94,3; 115,6 (d; J = 21; CH); 130,5 (CH); 132,0 (C); 159,1 (C=N); 162,5 e 165,8 (d; J = 250, C); 168,6 (C=O); 185,2 (C=O); IV (pastilha de KBr, cm⁻¹), principais sinais: 3048, 2960, 2857, 1710, 1626, 1590, 1388, 1230, 854. HRMS-ESI-IT/TOF (*m/z*): M⁺ + H, calcd. para C₁₃H₁₁FN₂O₃: 263,0832; encontrado: 263,0847.

Procedimento experimental para a reação de condensação. Síntese da hidrazona **2a**

Foram adicionados em um balão 20 mL de etanol absoluto e *p*-clorofenil-hidrazina (0,257 g; 1,80 mmol). Após completa solubilização, sob agitação e à t.a., foram adicionadas duas gotas de HCl concentrado e, em seguida, o aldeído **58a** (0,500 g; 1,80 mmol), solubilizado em 10 mL de etanol. A reação permaneceu em agitação por cerca de 40 min quando, através da CCD, se detectou total consumo do material de partida e formação da hidrazona **2a**. Adicionou-se água gelada ao balão reacional, o que proporcionou intensa precipitação do produto, obtendo-se o sólido bruto após filtração em funil sinterizado. O processo de purificação foi realizado através da solubilização das impurezas em acetato de etila à temperatura de 60 °C e sucessivas filtrações, obtendo-se 0,390 g da hidrazona **2a**, correspondendo a um rendimento de 54%. A hidrazona **2a** foi seca em estufa à 45 °C durante 24 h. Sólido branco amorfo, P.f. = 227-229 °C, Rf = 0,51 (acetato de etila/hexano 2:3). RMN ¹H (DMSO-*d*₆, δ, ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros: 2,26 (m, 1H); 2,51 (m, 1H) coincide com sinal do DMSO; 3,07 (m, 1H) – rotâmero em 3,40 coincidindo com H₂O do DMSO; 4,00-4,40 (m, 2H); 6,13 (sl; 1H) – rotâmero em 6,64; 7,03 (sl, 2H); 7,27 (sl, 2H); 7,40-7,80 (m, 5H); 11,00 (s, 1H); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, δ, ppm, 75 MHz, t.a.): 27,3 (CH₂) rotâmero em 28,7; 43,5 (CH₂) rotâmero em 47,5; 51,4 (CH) rotâmero em 49,5; 93,7 (CH) rotâmero em 91,1; 113,8 (CH); 123,5 (CH); 127,1 (C); 128,4 (CH); 129,0 (CH); 129,6 (HC=N); 134,2 (C); 135,3 (C); 142,9 (C); 157,8 (C=N); 167,8 (C=O). IV (pastilha de KBr, cm⁻¹), principais sinais: 3246, 3095, 3020, 2870, 1628, 1553, 1487, 1424, 1250, 1090, 848. HRMS-ESI-IT/TOF (*m/z*): M⁺ + H, calcd. para C₁₉H₁₆Cl₂N₄O₂: 403,0728; encontrado: 403,0735. **2b**: 52% de rendimento, sólido amorfo amarelo pálido, Rf = 0,49 (acetato de etila/hexano 2:3), p.f. = 221-222 °C, RMN ¹H (DMSO-*d*₆, δ, ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros: 2,27 (m, 1H); 2,45 (m, 1H) coincide com sinal DMSO; 3,09 (m, 1H) rotâmero em 3,41 coincidindo com H₂O do DMSO; 4,00 a 4,40 (m, 2H); 6,13 (d; J = 6; 1H) rotâmero em 6,64; 6,69 a 7,40 (m, 4H); 7,45 a 8,00 (m, 5H); 10,92 (s, 1H). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, δ, ppm, 75 MHz, t.a.): 27,4 (CH₂) rotâmero em 28,8; 43,6 (CH₂) rotâmero em 47,3; 51,5 (CH) rotâmero em 49,7; 93,7 ppm (CH) rotâmero em 91,1; 113,5 (CH); 116,0 e 115,7 (d; J = 22; CH); 126,3 (CH); 128,5 (CH); 129,7 (HC=N); 134,3 (C); 135,3 (C); 140,7 (C); 158,2 e 155,0 (d; J = 240, C); 157,3 (C=N); 167,9 (C=O). IV (pastilha de KBr, cm⁻¹), principais sinais: 3243, 3120, 3030, 2943, 1618, 1550, 1497, 1424, 1250, 1209, 1147, 856. HRMS-ESI-IT/TOF (*m/z*): M⁺ + H, calcd. para C₁₉H₁₆ClFN₄O₂: 387,1024; encontrado: 387,1029. **2c**: 49% de rendimento, sólido amorfo ocre claro, Rf = 0,44 (acetato de etila 2:3), p.f. = 190-192 °C, RMN ¹H (DMSO-*d*₆, δ, ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros: 2,26 (m, 1H); 2,45 (m, 1H) coincide com DMSO; 3,07 (m, 1H) rotâmero em 3,40 coincidindo com H₂O do DMSO; 3,70 (s, 3H); 4,00 a 4,40 (m, 2H); 6,11 (sl, 1H) rotâmero

em 6,61; 6,80 a 7,30 (m, 4H); 7,40 a 8,00 (m, 5H); 10,82 (s, 1H); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, δ, ppm, 75 MHz, t.a.): 27,4 (CH₂) rotâmero em 28,7; 43,6 (CH₂) rotâmero em 47,3; 51,7 (CH) rotâmero em 49,8; 55,2 (CH₃); 93,5 (CH) rotâmero em 90,9; 113,5 (CH); 114,7 (CH); 124,8 (CH); 128,5 (CH); 129,6 (HC=N); 134,3 (C); 135,2 (C); 137,9 (C); 153,5 (C); 158,1 (C=N); 167,9 (C=O); IV (pastilha de KBr, cm⁻¹), principais sinais: 3270, 3246, 3048, 2890, 2851, 1628, 1570, 1502, 1428, 1229, 853. HRMS-ESI-IT/TOF (*m/z*): M⁺ + H, calcd. para C₂₀H₁₉ClN₄O₃: 399,1224; encontrado: 399,1232. **2d**: 56% de rendimento, sólido amorfo branco, p.f. = 232-234 °C, Rf = 0,51 (acetato de etila/hexano 2:3), RMN ¹H (DMSO-*d*₆, δ, ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros: 2,26 (m, 1H); 2,43 (m, 1H) coincide com sinal DMSO; 3,07 (m, 1H) rotâmero em 3,46 ppm, coincidindo com H₂O do DMSO; 4,15 (m, 1H); 4,27 (tl, J = 8,0; 1 H); 6,15 (d; J = 6,3; 1H) rotâmero em 6,65; 7,03 (d, J = 8,1; 2H); 7,30 (m, 5H); 7,71 (sl, 2H); 11,03 (s, 1H); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, δ, ppm, 75 MHz, t.a.): 27,4 (CH₂) rotâmero em 28,7; 43,6 (CH₂) rotâmero em 47,3; 51,4 (CH) rotâmero em 49,5; 93,9 (CH) rotâmero em 91,2; 113,8 (CH); 115,4 (d; J = 21; CH); 123,5 (C); 127,3 (CH); 129,1 (CH); 130,3 (HC=N); 132,0 (C); 143,0 (C); 157,9 (C=N); 164,8 e 161,5 (d; J = 247, C); 167,9 (C=O). IV (pastilha de KBr, cm⁻¹), principais sinais: 3254, 3090, 3040, 2875, 1625, 1600, 1565, 1485, 1247, 1159, 852. HRMS-ESI-IT/TOF (*m/z*): M⁺ + H, calcd. para C₁₉H₁₆ClFN₄O₂: 387,1024; encontrado: 387,1034. **2e**: 53% de rendimento, sólido amorfo ocre claro, p.f. = 227-229 °C, Rf = 0,46 (acetato de etila/hexano 2:3); RMN ¹H (DMSO-*d*₆, δ, ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros: 2,26 (m, 1H); 2,40 (m, 1H) coincide com sinal DMSO; 3,08 (m, 1H) – rotâmero em 3,43 coincidindo com H₂O do DMSO; 4,00 a 4,40 (m, 2H); 6,14 (sl, 1H) rotâmero em 6,65; 6,90 a 7,50 (m, 6H); 7,70 (sl, 3H); 10,93 (s, 1H); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, δ, ppm, 75 MHz, t.a.): 27,4 (CH₂) rotâmero em 28,7; 43,6 (CH₂) rotâmero em 47,4; 51,5 (CH) rotâmero em 49,6; 93,8 (CH) rotâmero em 91,5; 113,5 (CH); 115,9 (d; J = 22; CH); 115,4 (d; J = 22; CH); 126,4 (CH); 130,3 (HC=N); 132,0 (C); 140,7 (C); 158,2 e 155,1 (d; J = 232, C); 157,8 (C=N); 164,8 e 161,5 (d; J = 247; C); 167,7 (C=O); IV (pastilha de KBr, cm⁻¹), principais sinais: 3240, 3125, 3041, 2898, 1630, 1565, 1503, 1429, 1260, 1210, 1205, 1152, 850. HRMS-ESI-IT/TOF (*m/z*): M⁺ + H, calcd. para C₁₉H₁₆F₂N₄O₂: 371,1319; encontrado: 371,1325.

Parte biológica

Todos os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média. No estudo da atividade antinociceptiva utilizou-se análise de variância (ANOVA) e as diferenças foram consideradas significativas quando p < 0,05.

Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), machos, com aproximadamente 60 dias de vida, variando de 25 a 30 g, oriundos do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, registrado no COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) sob nº 18. Os animais foram divididos em grupos e mantidos em caixas plásticas à temperatura 23 ± 2 °C com ciclos claro/escuro de 12 em 12 h, recebendo ração padrão e água *ad libitum*, estando em jejum de 4 h antes dos experimentos.

Toxicidade aguda

Os camundongos foram separados em grupos de 6 animais. Em seguida, as substâncias **2a** e **2d** foram administradas por via intraperitoneal na dose de 1500 mg/kg. A observação dos efeitos tóxicos foi efetuada com os animais em livre movimentação, em superfície plana, por um período inicial de 60 min. Após esse período, os animais foram ainda observados durante 24 h para registro do índice de mortalidade de cada grupo e durante 14 dias para observações gerais.¹⁸

Atividade antinociceptiva

A atividade antinociceptiva foi verificada através do teste de contorção abdominal induzida pelo ácido acético. Os animais foram arranjados aleatoriamente (6 camundongos por grupo). Cada grupo foi pré-tratado, por via intraperitoneal, com uma das hidrazonas **2a-f** (150 µmol/kg) e a substância padrão dipirona (150 µmol/kg), 60 min antes do teste. O grupo controle recebeu o veículo (salina). Ácido acético 1% foi injetado dentro da cavidade peritoneal dos animais, para induzir contrações da musculatura abdominal e/ou alongamento dos membros posteriores. Dez minutos após a injeção do ácido acético, os camundongos foram colocados individualmente em caixas transparentes, registrando-se o número de contorções abdominais durante 20 min. A percentagem de inibição foi calculada mediante a redução do número de contorções totais nos grupos pré-tratados em relação ao grupo controle.¹⁸

CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi explorado química e biologicamente o novo heterobícclo pirrolidina[3,2-*d*]-2-isoxazolina, através da aplicação sintética deste núcleo na obtenção de derivados hidrazonas. Novos aldeídos isoxazolínicos, obtidos a partir do cicloaduto da reação de ciclodição 1,3-dipolar entre enecarbamato endocíclico e *N*-óxido de nitrila, foram condensados com fenil-hidrazinas, obtendo-se novas isoxazolil-hidrazonas, que possuem dois sítios distintos de substituição, visando a variação estrutural das mesmas. Rendimentos ótimos foram obtidos nas etapas de síntese dos aldeídos, enquanto que na etapa de condensação entre os aldeídos e as fenil-hidrazinas, rendimentos moderados foram obtidos, devido a problemas no isolamento dos produtos.

As avaliações biológicas preliminares das novas isoxazolil-hidrazonas mostraram que as mesmas possuem baixa toxicidade e excelente atividade antinociceptiva, quando comparadas ao fármaco padrão dipirona. Estes resultados são bastante promissores e corroboram resultados anteriores, relativos à atividade biológica da isoxazolina aza-bicíclica. Diante dos resultados obtidos, a série de isoxazolil-hidrazonas deverá ser expandida, visando uma variação estereoelétrica das mesmas e testes específicos de atividade analgésica, para uma possível determinação do mecanismo de ação, assim como testes anti-inflamatórios, entre outros, deverão ser realizados.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à FACEPE pelo apoio financeiro e à Central Analítica do DQF-UFPE pelas análises espectrométricas.

REFERÊNCIAS

- De Leval, X.; Delarge, J.; Somers, F.; De Tullio, P.; Henrotin, Y.; Piroette, B.; Dogné, J. M.; *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 1041; Chandrasekharan, N. V.; Dai, H.; Roos, K. L.; Evanson, N. K.; Tomsik, J.; Elton, T. S.; Simmons, D. L.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 13926.
- Dammann, H. G. Z.; *Gastroenterology* **1999**, *37*, 45.
- Lima, P. C.; Lima, L. M.; Da Silva, K. C. M.; Léda, P. H. O.; De Miranda, A. L. P.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J.; *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 187.
- Mahy, J. P.; Gaspard, S.; Mansuy, D.; *Biochemistry* **1993**, *32*, 4014.
- Todeschini, A. R.; De Miranda, A. L. P.; Da Silva, K. C.; Parrini, S. C.; Barreiro, E. J.; *Eur. J. Med. Chem.* **1998**, *33*, 189; Küçüküzgel, S. G.; Rollas S.; *Il Farmaco* **2002**, *57*, 583; Dimmock, J. R.; Vashishtha, S. C.; Stables, J. P.; *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 241; Çakir, B.; Yildirim, E.; Ercanli, T.; Erol, K.; Sahin, M. F.; *Il Farmaco* **1999**, *54*, 842.
- De Almeida, V. M.; Dos Santos, R. J.; Góes, A. J. S.; De Lima, J. G.; Correia, C. R. D.; De Faria, A. R.; *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 684.
- De Almeida, V. M.; Dos Santos, R. J.; Góes, A. J. S.; De Souza, I. A.; De Faria, A. R.; *Rev. Bras. Cienc. Saúde* **2005**, *9*, 275.
- Pirrung, M. C.; Tumey, L. N.; Raetz, C. R. H.; Rusche, K. M.; *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4359; Kai, H.; Matsumoto, H.; Hattori, N.; Takase, A.; Fujiwara, T.; Sugimoto, H.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1997; Pruitt, J. R.; Pinto, D. J.; Estrella, M. J.; Bostrom, L. L.; Knabb, R. M.; Wong, P. C.; Wright, M. R.; Wexler, R. R.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 685.
- Viegas-Junior, C.; Danuello, A.; Bolzani, V. S.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 1829; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; *Química Medicinal – As Bases Farmacológicas da Ação dos Fármacos*, Ed. ArtMed: Porto Alegre, 2001.
- Kraus, G. A.; Neuenschwander, K.; *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 4791.
- Kozikowski, A. P.; Adamczyk, M.; *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 366.
- Fleming, I.; *Frontier Orbitals and Organic Chemical Reactions*, John Wiley and Sons: New York, 1976.
- De Faria, A. R.; Salvador, E. L.; Correia, C. R. D.; *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3651.
- Schmitz, W. D.; Messerschmidt, N. B.; Romo, D.; *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2058; Estieu, K.; Paugam, R.; Ollivier, J.; Salaun, J.; Cordero, F. M.; Goti, A.; Brandi, A.; *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8276.
- Gaston, M. A.; Dias, L. R. S.; Freitas, A. C. C.; Miranda, A. L. P.; Barreiro, E. J.; *Pharm. Acta Helv.* **1996**, *71*, 213.
- Fontoura, L. A. M.; Rigotti, I. J. C.; Correia, C. R. D.; *J. Mol. Struct.* **2002**, *609*, 73.
- Oga, Z.; *Avaliação da Toxicidade – Fundamentos de Toxicologia*, Ed. Atheneu: São Paulo, 1996; Pérez-Guerrero, C.; Herrera, M. D.; Ortiz, R.; Sotomayor, M. A.; Fernandez, M. A.; *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *76*, 279.
- Vane, J. R.; Botting, R. M.; *Am. J. Med.* **1998**, *104*, 2S; Cunha, F. Q.; *Rev. Bras. Reumatol.* **2004**, *44*, 1; Koster, R.; Anderson, M.; De Beer, E. J.; *Fed. Proc.* **1959**, *18*, 412.
- Duarte, J. D. G.; Negus, S. S.; Butelman, E. R.; Costa, B. R.; Woods, J. H. *Psychopharmacology* **1998**, *115*, 311.