

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
NÚCLEO DE QUÍMICA DE HETEROCICLOS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
DERIVADOS ISOXAZOLÍNICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luciana Almeida Piovesan

**Santa Maria, RS, Brasil
2005**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
DERIVADOS ISOXAZOLÍNICOS**

por

Luciana Almeida Piovesan

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Orgânica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química.**

Orientador: Prof. Dr. Alex Fabiani Claro Flores

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS
ISOXAZOLÍNICOS**

elaborada por
Luciana Almeida Piovesan

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Alex Fabiani Claro Flores, Dr.
(Presidente/Orientador)

Nilo Zanatta, Dr. (UFSM)

Margareth Linde Athayde, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 03 de março de 2005.

Dedico esta dissertação a minha
irmã **Daniela**, por todo o incentivo,
amizade, paciência e cuidado.

Ao Prof. Dr. **Alex Fabiani Claro Flores**,
por ter acreditado neste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, irmãs, cunhados e sobrinhos, especialmente a minha irmã Daniela, por todo o cuidado e aos meus sobrinhos Gabriel e Davi, por todo o amor a mim dedicado.

Ao Prof. Alex Flores, por ter acreditado no que era apenas uma idealização de duas alunas de graduação, e que hoje se concretiza nesta dissertação de mestrado; pela orientação, disponibilidade, respeito e conhecimento compartilhado.

À Profa. Marli de Campos pela co-orientação e sugestões no exame de qualificação; pela disponibilidade e amizade.

Ao Prof. Marcos Martins pela co-orientação e aos demais professores do NUQUIMHE.

À Vívian Fontaniva, também idealizadora deste trabalho, por ter concordado que fosse levado adiante; pela amizade (eterna) e a torcida (mesmo distante).

À aluna de iniciação científica Carolina Scheidt pela dedicação na realização da parte experimental deste trabalho; pela amizade e agradável convivência.

Ao colega de laboratório e profissão Pablo Machado, por toda a ajuda e companheirismo.

Ao ex-colega e grande amigo Wilson Cunico, pelas idéias e apoio em um dos momentos mais difíceis do curso de mestrado.

À colega Fernanda Rosa, pelas conversas (intermináveis) e pela cumplicidade.

Aos colegas de nosso ainda pequeno grupo de pesquisa, Lucas Pizzuti, Frantiescoli Dimmer e Rodrigo Mayer e aos demais colegas de laboratório, Graciela Oliveira, Elisandra Scapin, Sidnei Moura, Marcelo Rossato, Emerson Guarda, Paulo Beck, Rodrigo Peres, João Inácio Pereira e Alexandre Costa, pela saudável convivência.

À Profa. Margareth Athayde pela participação e valiosas sugestões no exame de qualificação.

Ao Prof. Sydney Alves, pela disponibilização das cepas utilizadas nos testes de avaliação antifúngica.

Aos professores e funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, onde parte deste trabalho foi realizada.

Ao Prof. Ademir Morel e a aluna Carla Porto, pela disponibilização do laboratório em que este trabalho foi finalizado.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Química, em especial ao funcionário Ademir Sartori, pela competência e paciência.

À Daiana Perdomo pela amizade incondicional e à Fernanda Ortolan pelo carinho e amizade.

À minha prima Juliana Lovato, por todo o carinho e pelo auxílio na finalização deste trabalho.

“Se as coisas são inatingíveis...oras!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”

Mário Quintana

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS ISOXAZÓIS

AUTORA: Luciana Almeida Piovesan
ORIENTADOR: Alex Fabiani Claro Flores

Santa Maria, 03 de março de 2005.

Sabendo que compostos isoxazolínicos têm demonstrado grande variedade de atividades farmacológicas e que essas atividades poderiam ser acentuadas pela presença de grupos halometil-substituintes no ciclo isoxazolínico este trabalho mostra a síntese das séries de 5-triclorometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazóis **2a-o**, 5-carboxil-isoxazóis **3a-o** e 3-aryl-5-tricloro(flúor)metilisoxazóis, **4j**, **4p-t**, **5j**, **5p-t** e a posterior avaliação da atividade antimicrobiana dessas séries de compostos.

Os testes de avaliação antimicrobiana foram feitos usando a técnica de diluição em caldo, frente a um banco de cepas catalogadas representadas por bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e leveduras (*Candida spp* e *Cryptococcus neoformans*).

Todos os derivados isoxazolínicos testados apresentaram atividade antimicrobiana nas concentrações testadas, sendo que, de modo geral, as espécies de leveduras foram mais sensíveis que as espécies de bactérias e os valores de concentração inibitória mínima variaram de 0,019 a 1,25mg/mL,

Palavras-chaves: Isoxazóis, Avaliação Antimicrobiana.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post-Graduate Course in Chemistry
Universidade Federal de Santa Maria

ANTIMICROBIAL ACTIVITY EVALUATED OF ISOXAZOLES DERIVATIVES

AUTHOR: Luciana Almeida Piovesan
ADVISOR: Alex Fabiani Claro Flores

Santa Maria, 03rd march, 2005.

Isoxazoles compounds have been showing a great variety of pharmacological activities. Such activities might be increased by the presence of halomethyl-substitute groups in isoxazoles.

This work shows the synthesis of the series of 5-trichloromethyl-5-hydroxi-4,5-dihydroisoxazoles **2a-o**, 5-carboxy-isoxazoles **3a-o** e 3-aryl-5-trichloro(fluoro)methylisoxazoles, **4j**, **4p-t**, **5j**, **5p-t** compounds, and further evaluation of the antimicrobial activity, by using the broth dillution technique, considering a bank of catalogued strains, represented by Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*), Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*), and yeast (*Candida* spp and *Cryptococcus neoformans*).

All of the tested isoxazoles have presented antimicrobial activity at the tested concentrations, and the yeast species were more vulnerable than the bacteria species, being the values of minimum inhibitory concentration between 0,019 mg/mL and 1,25 mg/mL.

Key words: isoxazoles, antimicrobial evaluation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alguns dos principais microrganismos patogênicos.....	05
Tabela 2 – Nomenclatura dos compostos 5-triclorometil-4,5-diidroisoxazóis 2a-o e isoxazóis-5-ácido carboxílico 3b, k, l	31
Tabela 3 – Nomenclatura dos compostos 3-aril-5-tricloro(flúor)metilisoxazóis 4j, 4p-t, 5j, 5p-t	31
Tabela 4 - Valores de CIM e CBM contra <i>S. aureus</i> para os compostos 2a-o testados.....	32
Tabela 5 - Valores de CIM e CBM contra <i>E. coli</i> para os compostos 2a-o testados.	34
Tabela 6 - Valores de CIM e CBM contra <i>P. aeruginosa</i> para os compostos 2a-o testados.	36
Tabela 7 - Valores de CIM e CFM contra <i>C. albicans</i> para os compostos 2a-o testados.....	38
Tabela 8 - Valores de CIM e CFM contra <i>C. tropicalis</i> para os compostos 2a-o testados.....	40
Tabela 9 - Valores de CIM e CFM contra <i>C. lusitaniae</i> para os compostos 2a-o testados.....	41
Tabela 10 - Valores de CIM e CFM contra <i>C. neoformans</i> A para os compostos 2a-o testados.....	43
Tabela 11 - Valores de CIM e CFM contra <i>C. neoformans gattii</i> B para os compostos 2a-o testados.....	45
Tabela 12 - Valores de CIM e CFM contra <i>C. neoformans gattii</i> C para os compostos 2a-o testados.....	46

Tabela 13 - Valores de CIM e CFM contra <i>C. neoformans</i> D para os compostos 2a-o testados.....	47
Tabela 14 - Valores de CIM e CBM contra <i>S. aureus</i> para alguns compostos 3a-o testados.	49
Tabela 15 - Valores de CIM e CBM contra <i>E. coli</i> para alguns compostos 3a-o testados.	49
Tabela 16 - Valores de CIM e CBM contra <i>P. aeruginosa</i> para alguns compostos 3a-o testados.....	49
Tabela 17 - Valores de CIM e CBM contra <i>S. aureus</i> para os compostos 4 e 5 testados.....	51
Tabela 18 - Valores de CIM e CBM contra <i>E. coli</i> para os compostos 4 e 5 testados.....	53
Tabela 19 - Valores de CIM e CBM contra <i>P. aeruginosa</i> para os compostos 4 e 5 testados.....	54
Tabela 20 - Valores de CIM e CFM contra <i>C. albicans</i> para os compostos 4 e 5 testados.....	55
Tabela 21 - Valores de CIM e CFM contra <i>C. tropicalis</i> para os compostos 4j, 4 e 5 testados.....	57
Tabela 22 - Valores de CIM e CFM contra <i>C. lusitaniae</i> para os compostos 4j, 4 e 5 testados.....	58
Tabela 23 - Valores de CIM e CFM contra <i>C. neoformans</i> A para os compostos 4 e 5 testados.....	59
Tabela 24 - Valores de CIM e CFM contra <i>C. neoformans gattii</i> B para os compostos 4j, 4p-t, 5j, 5p-t testados.....	60
Tabela 25 - Valores de CIM e CFM contra <i>C. neoformans gattii</i> C para os compostos 4 e 5 testados.....	61
Tabela 26 - Valores de CIM e CFM contra <i>C. neoformans</i> D para os compostos 4 e 5 testados.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Compostos azólicos licenciados para uso como fármacos antifúngicos.....	08
Figura 2 - <i>N</i> -(isoxazol-5-il)-2-iodo-4- <i>R</i> -5 <i>R'</i> -benzamidas (I) e <i>N</i> -(isoxazol-3-il)-2-iodo-4- <i>R</i> -5 <i>R'</i> -benzamidas (II).....	11
Figura 3 - 4,5-diidroisoxazóis, regioisômero A (III) e regioisômero B (IV).....	11
Figura 4 - 3-(1- <i>R</i> -3-metil-4-nitroso-1 <i>H</i> -5-metilisoxazóis) (V) e 3-(1- <i>R</i> -5-metil-4-nitroso-1 <i>H</i> -5-metilisoxazóis) (VI).....	12
Figura 5 – Estrutura química do bifonazol.....	12
Figura 6 – 4-[1 <i>H</i> -imidazol-1-il-(fenil)metil]-5-fenilisoxazol (VII) e 1-[fenil(5-fenilisoxazol-4-il)metil]-1 <i>H</i> -1,2,4-triazol (VIII).....	13
Figura 7 – isoxalinas (IX e XI) e isoxazóis (X) 3,5-dissubstituídos.....	14
Figura 8 - derivados isoxazol-3-ácido hidroxâmico.....	15
Figura 9 - isoxazolidinas 5-imidazolil substituídas, regioisômero A (XV) e regioisômero (XVI).....	16
Figura 10 - 5-triclorometil-4,5-diidroisoxazóis 2a-o , isoxazóis-5-ácido carboxílico 3b, k, l e 3- <i>aril</i> -5-tricloro(flúor)metilisoxazóis 4j, 4p-t, 5j, 5p-t	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Fármacos antimicrobianos.....	4
2.1.1 A patogenia (virulência) das bactérias e fungos.....	4
2.1.2 Evolução dos agentes antibacterianos.....	6
2.1.3 Evolução dos agentes antifúngicos.....	7
2.1.4 A busca por novos agentes antimicrobianos.....	10
2.2 Síntese de isoxazóis.....	17
2.3 Isolamento de 5-hidroxi-4, 5-diidroisoxazóis.....	20
2.4 Testes de atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>.....	21
2.4.1 Determinação de CIM, CBM e CFM.....	21
2.4.2 Técnica atualmente preconizada.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. Síntese dos compostos 2a-m, 3k, l, m e 4j, 4p-t, 5j, 5p-t.....	23
3.2 Síntese dos compostos 2n e 2o.....	23
3.2.1 Técnicas de identificação e determinação da pureza.....	23
3.2.1.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	23
3.2.1.2 Espectroscopia de massa.....	23
3.2.1.3 Ponto de fusão.....	23

3.2.2 Reagentes e solventes.....	24
3.2.2.1 Reagentes e solventes purificados.....	24
3.2.2.2 Reagentes e solventes não-purificados.....	24
3.2.3 Técnica para a síntese dos acetais.....	24
3.2.4 Síntese das β -alcoxiviniltriclorometilcetonas 1n e 1o	25
3.2.5 Síntese dos compostos 2n e 2o	25
3.2.6 Dados espectroscópicos e constantes físicas dos compostos 2n e 2o	25
3.3 Microrganismos.....	26
3.3.1 Procedência.....	26
3.3.2 Isolamento.....	26
3.4 Meios de cultura.....	26
3.4.1 Meio de cultura utilizado para o isolamento de bactérias, para a manutenção de cepas isoladas de bactérias e para a determinação da CBM.....	26
3.4.2 Meio de cultura utilizado para o isolamento de leveduras, para a manutenção de cepas isoladas de leveduras e para a determinação da CFM.....	27
3.4.3 Meio de cultura utilizado para a determinação da suscetibilidade de bactérias...27	
3.4.4 Meio de cultura utilizado para a determinação da suscetibilidade de leveduras..27	
3.4.5 Preparação dos meios de cultura.....	27
3.5 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	27
3.5.1 Preparação do inóculo.....	28
3.5.2 Preparação das soluções estoques dos compostos testados.....	28
3.5.3 Testes de avaliação antimicrobiana.....	28
3.5.3.1 Diluição em série.....	28
3.5.3.2 Determinação da CIM.....	29
3.5.3.3 Determinação da CBM ou CFM.....	29

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	30
4.1 Síntese dos isoxazóis avaliados quanto à atividade antimicrobiana.....	30
4.2 Avaliação antimicrobiana.....	32
4.2.1 Resultados Obtidos para a Série de Isoxazóis 2a-o	32
4.2.2 Resultados Obtidos para a Série de Isoxazóis 3a-o	49
4.2.3 Resultados Obtidos para a Série de Isoxazóis 4j, 4p-t, 5j, 5p-t	51
5. CONCLUSÕES.....	65
6. SUGESTÕES PARA A CONTINUIDADE DO TRABALHO.....	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
8. ANEXO.....	72
8.1 Espectro de ¹ H RMN do composto 2n	73
8.2 Espectro de CG/EM do composto 2n	74
8.3 Espectros de ¹ H RMN do composto 2o	75
8.4 Espectro de CG/EM do composto 2o	76

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Compostos heterocíclicos estão distribuídos na natureza, desempenhando papel essencial no desenvolvimento da vida no planeta. Assim, um grande número destes compostos é conhecido e este número vem crescendo rapidamente nas últimas décadas, proporcionalmente ao desenvolvimento dos processos de síntese. Isso demonstra porque os compostos heterocíclicos são alvos constantes do interesse de pesquisadores em várias áreas da química.¹

O sucesso do uso de composto heterocíclicos em muitos campos da química aplicada e em estudos fundamentais e teóricos deve-se a sua grande variedade e complexidade estrutural. Isto leva, virtualmente, a uma série ilimitada de estruturas novas, com uma larga faixa de propriedades físicas, químicas e biológicas, tendo um largo espectro de reatividade e estabilidade. Outra consequência de suas variações nas reatividades químicas, inclui a possível abertura do anel heterocíclico, com a obtenção de estruturas não-cíclicas, estrategicamente funcionalizadas.^{1,2}

Nosso trabalho no Núcleo de Química de Heterociclos (NUQUIMHE) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) é o desenvolvimento de estratégias para a síntese de precursores de heterociclos, utilizando como blocos iniciais enoléteres, acetais ou enaminas, os quais ao sofrerem uma reação de substituição eletrofílica no carbono- β com agentes acilantes triálometilados levam a uma série ampla de 1,1,1-trialometil-4-alcoxi-3-alquen-2-onas ou 1, 3-dicetonas.^{3,4} Estes blocos precursores 1,3-dieletrófilicos, vêm sendo utilizados na obtenção de séries de heterociclos de 5- 6- e 7-membros, a partir da reação de condensação com 1,2-, 1,3- e 1,4-dinucleófilos.⁵ A presença de grupos halometil-substituintes no heterociclo, bem como no precursor, tem possibilitado a solução de problemas sintéticos e, também, a observação de efeitos destes substituintes no comportamento químico, espectroscópico e na atividade biológica dos compostos obtidos.⁵ Nossos estudos puderam demonstrar, até o momento, que a presença de grupos triálometila ou dialometila no precursor dieletrófilo trouxe como efeito direto, o estabelecimento de uma regioquímica bem definida no fechamento do anel heterocíclico.⁵ Foi demonstrado também, que a existência do grupo triálometila ou dialometila em um composto heterocíclico trouxe como consequência a possibilidade de funcionalização

deste grupo “*one pot*” no próprio meio para ciclização ou em passos posteriores, gerando principalmente grupos carbonilas substituintes.⁶

Portanto, já está estabelecida nos laboratórios de síntese do NUQUIMHE uma rotina de produção de séries de substâncias heterocíclicas inéditas, em escala de gramas, obtidas em alto grau de pureza. Essas substâncias inéditas têm as suas estruturas moleculares estudadas e bem estabelecidas, utilizando, principalmente, dados de análise elementar, ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas. As suas características físico-químicas (solubilidade, densidade, pontos de fusão ou ebulição) também são alvos de nossos estudos, pois fundamentam os parâmetros de funcionalidade e aplicabilidade prática das novas substâncias.

Dentre essas séries de compostos heterocíclicos, os isoxazóis são uma classe de muito interesse. Compostos contendo heterociclos isoxazóis são conhecidos por diversas atividades biológicas, são antiinflamatórios, anti-hipertensivos, antimicrobianos, entre outras.

De outro modo, a vulnerabilidade da população humana às doenças infecciosas por microrganismos resistentes é um problema mundial. O número de casos clínicos de infecções por bactérias e fungos multirresistentes está aumentando a uma velocidade alarmante. Outro fato a ser considerado é a epidemia mundial da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*AIDS*, do inglês *Acquired Immune Deficiency Syndrome*) que favorece o surgimento de infecções oportunistas fatais.

Por tudo isso, existe a necessidade constante de produção de novos agentes com atividade antimicrobiana. A pesquisa por agentes antimicrobianos é urgente, considerando a nossa vulnerabilidade aos nossos mais nefastos predadores.

Considerando os fatos descritos e, além disso, a urgência da formação de redes de produção de conhecimento e de profissionais capacitados nessa interface estratégica, ligando a produção de moléculas inéditas, de maneira sistemática e a busca de aplicações desses novos materiais em novas tecnologias, os objetivos propostos para este trabalho são:

1. A síntese da série de compostos 5-triclorometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazóis **2a-o**, isoxazóis-5-ácido carboxílico **3a-o** e 3-aryl-5-tricloro(flúor)metilisoxazóis, **4j**, **4p-t**, **5j**, **5p-t**, em grau de pureza analítico em escala de gramas;

2. A avaliação da atividade antimicrobiana das séries de compostos sintetizados usando a técnica de diluição em caldo, utilizando cepas padrões representadas por bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e leveduras (*Candida albicans*, *Candida lusitanae*, *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*);

3. Para os compostos ativos determinar os valores da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) ou da concentração fungicida mínima (CFM) e compará-los com valores de compostos padrões de atividade antimicrobiana, o antibacteriano ampicilina e o antifúngico fluconazol, realizando uma análise da relação entre a estrutura química e a atividade dos compostos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fármacos Antimicrobianos

2.1.1 A patogenia (virulência) das bactérias e fungos

Virulência refere-se à habilidade do microrganismo em estabelecer uma infecção e causar uma doença. Essa capacidade quantitativa de causar doenças é influenciada por inúmeros fatores como temperatura, pH, fatores de defesa do hospedeiro, predisposição genética tanto do hospedeiro quanto do microrganismo, entre outros.^{8,9,10}

A identificação e caracterização dos fatores de virulência que auxiliam na patogenicidade de bactérias e fungos sustenta o planejamento, desenvolvimento e produção de drogas que podem ser aplicadas especificamente a algum microrganismo ou a diferentes classes de bactérias ou fungos patógenos.^{9,10,11}

A Tabela 1 mostra alguns dos principais microrganismos patogênicos.

Os fungos, mais que as bactérias, apresentam uma tendência especial para causar infecções em indivíduos com o sistema imunológico comprometido. Os indivíduos com *AIDS*, diabetes, submetidos a tratamento antineoplásico ou mulheres grávidas, apresentam uma maior probabilidade de desenvolver infecções fúngicas graves. Algumas vezes, os indivíduos com comprometimento da imunidade apresentam infecções causadas por fungos que dificilmente causam males aos indivíduos que possuem um sistema imunológico normal.

Considerando as infecções oportunistas que acometem pacientes portadores de *AIDS*, a criptococose é a quarta causa mais freqüente de infecção.^{12,13,14} O número crescente de pacientes portadores de *AIDS* no Brasil reflete aumento nas infecções causadas por este fungo patogênico. De acordo com dados do Ministério da Saúde - Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis/*AIDS* (DST/*AIDS*)¹⁵, no período compreendido entre 1980 e 1997, 4,3% das infecções oportunistas associadas a pacientes com *AIDS* foram causadas por *C. neoformans*.

Tabela 1 - Alguns dos principais microrganismos patogênicos.

Patógeno	Características	Doenças causadas	Resistência ^a
<i>S.aureus</i>	Bactéria Gram-positiva, pertencente a flora normal humana. ¹⁶	Infecções piogênicas (desde abscessos até osteomielites) e das vias respiratórias, até pneumonia; infecções alimentares. ¹⁷	Sim
<i>E. coli</i>	Bactéria Gram-negativa, pertencente a flora normal humana. ¹⁶	Infecções do trato urinário, infecções do sangue, diarreia e falência dos rins. ¹⁶	Sim
<i>P. aeruginosa</i>	Bactéria Gram-negativa, oportunista. ¹⁶	Septicemia e pneumonia, frequentes em casos de fibrose cística ou imunossupressão; ceratite ulcerativa aguda em usuários de lentes de contato ou por cirurgias oculares. ¹⁸	Sim
<i>Candida spp</i>	Leveduras gram-positivas de baixa virulência, pertencentes à flora normal humana. ^{8,12}	Infecções oportunistas na pele, cavidade oral, esôfago, trato gastrointestinal, vagina e sistema cardiovascular, denominadas candidíases. ^{8,19,20} Infecções mais sérias podem envolver o coração (endocardite), o sangue (septicemia) e o cérebro (meningite). ²¹	Sim
<i>C. neoformans</i>	Levedura encapsulada, não pertencente à flora normal humana, existindo duas variedades: <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (sorotipos A e D) e <i>C. neoformans</i> var. <i>gattii</i> (sorotipos B e C). ^{8,13}	Infecções fatais em pacientes normais e imunocomprometidos, denominadas criptococoses, pela inalação do fungo, que pode se disseminar a partir dos pulmões, por via hematogênica, para outras vísceras, com especial preferência pelo sistema nervoso central, simulando neoplasia maligna e meningite bacteriana ou viral. ⁸	Sim

^aJá foram identificadas cepas resistentes aos antibióticos e quimioterápicos comercializados.

2.1.2 Evolução dos agentes antibacterianos

Agentes antibacterianos são drogas usadas no tratamento de infecções causadas por bactérias, sendo que de acordo com sua ação podem ser classificados em bactericidas ou bacteriostáticos. Os agentes mais amplamente utilizados em infecções bacterianas sistêmicas são os antibióticos e sulfonamidas.²²

Pasteur e Joubert, em 1877, foram os responsáveis pelos primeiros conhecimentos acerca dos antibióticos. Fleming (1928) contribuiu valorosamente com o primeiro componente através da contaminação acidental de uma colônia de *Staphylococcus* que foi lisada pelo fungo do gênero *Penicillium notatum*.

A era moderna da terapia antimicrobiana teve início em 1936, com o uso clínico das sulfonamidas e seus derivados com ação antibacteriana. No decorrer da 2ª Guerra Mundial, as sulfas passaram a ser usadas em infecções decorrentes dos ferimentos da guerra e em disenterias bacilares, confirmando a sua efetividade. A 2ª Guerra Mundial, portanto, provocou um grande desenvolvimento da indústria químico-farmacêutica de síntese, originando-se daí inúmeros novos quimioterápicos, acarretando no surgimento de uma nova era no tratamento das infecções, com a introdução dos antibióticos na prática médica.^{22,23}

A produção da penicilina em 1941, em escala industrial, causou uma revolução no tratamento das infecções. A partir de 1943, com o uso terapêutico da penicilina, estava iniciada a era da antibioticoterapia.^{22,23}

Porém, desde o início da era da antibioticoterapia, o aparecimento de patógenos resistentes às drogas antimicrobianas já era uma realidade. Por isso, novas drogas continuaram a ser alvo dos cientistas e, em 1949, o cloranfenicol foi obtido por síntese química em laboratório. Nos anos seguintes, muitos outros compostos com ação antibiótica foram descobertos ou sintetizados.

Em 1959, pesquisadores descobriram um método acessível em escala industrial para obtenção do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), substância que constitui o núcleo central da benzilpenicilina, inaugurando a era dos antibióticos semi-sintéticos. A introdução de novos radicais no 6-APA permitiu o aparecimento de novos antibióticos penicilínicos, parte produzidos por fermentação natural, parte resultantes de reações químicas programadas em laboratório.²³

A descoberta das novas penicilinas semi-sintéticas impulsionou a pesquisa para a produção de novos antibióticos cuja estrutura pudesse sofrer alterações químicas, resultando, em 1963, no aparecimento das cefalosporinas.^{22,23}

Atualmente, devido à importância e frequência das doenças causadas por bactérias e ao aparecimento de cepas resistentes, a procura de novos agentes antibacterianos é necessária.^{24,25} Por isso, muitos pesquisadores têm estudado novas rotas sintéticas para a obtenção de agentes antibacterianos com propriedades mais seletivas e menor toxicidade ao paciente.²⁶

2.1.3 Evolução dos agentes antifúngicos

Agentes antifúngicos são drogas empregadas contra infecções causadas por fungos, podendo ser fungicidas ou fungistáticos.²²

Alguns agentes antifúngicos são conhecidos há muito tempo, embora a grande maioria tenha sido introduzida na clínica recentemente. A história destes agentes pode ser dividida em três eras: a era do enxofre (até 1882), a era do cobre (de 1882 até 1934) e, a era dos fungicidas orgânicos (a partir de 1934).^{22,23}

A era dos fungicidas orgânicos se caracteriza pelo desenvolvimento de compostos orgânicos muito eficientes e, até mesmo, altamente específicos. Os primeiros compostos introduzidos foram os ditiocarbamatos, seguidos por uma série de outros agentes, como cloranil, diclona, gliodina, captana, entre outros. Nesta era ocorreu a descoberta dos antibióticos, que resultou na pesquisa e introdução de diversos agentes fungiotóxicos: griseofulvina (1938), nistatina (1949), candicidina (1953), anfotericina B (1955).²³

Segundo *Wingard e Leather*²⁷, está se estabelecendo uma nova era na terapia antifúngica, que iniciou em 1970 com a introdução do cetoconazol na terapia. Existem quatro classes de drogas licenciadas para a terapia de infecções fúngicas invasivas, as quais incluem polienos (as várias formulações de anfotericina B), análogos de nucleosídeos (flucitosina), equinocandinas (caspofungina, micafungina) e azóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol). A importância da descoberta desses novos agentes se dá não somente pelo aparecimento de patógenos resistentes, mas principalmente pela alta prevalência de infecções fúngicas invasivas, resultando em

altas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente em pacientes transplantados e pacientes com *AIDS*.^{28,29}

O mecanismo de ação da classe de azóis como antifúngicos envolve a inibição da enzima fúngica 14- α -esterol desmetilase, dependente da citocromo P450, enzima chave na biossíntese do ergosterol, principal esteroide constituinte da membrana plasmática dos fungos. Há diversas drogas licenciadas para uso clínico, diferentes em sua estrutura molecular, o que as difere nas suas propriedades farmacológicas, perfil toxicológico e espectro de ação.^{27,30}

A primeira geração de azóis (Figura 1) – clotrimazol, cetoconazol e fluconazol – tem excelente atividade contra espécies de *Candida* e *Cryptococcus*. Itraconazol é ativo não somente contra *Candida* e *Cryptococcus*, mas também contra espécies de *Aspergillus*.²⁸ Voriconazol é o antifúngico de mais amplo espectro dos azóis antifúngicos licenciados, fazendo parte da segunda geração.^{27,31} Em estudos clínicos, demonstrou boa resposta contra infecções por *Aspergillus*, *Candida* (inclusive contra espécies de *Candida* fluconazol-resistentes), *Fusarium* e *Scedosporium*. Também demonstrou atividade contra Zigomicetos. Em associação com esse amplo espectro de ação, Voriconazol ainda tem baixa toxicidade e alta tolerância.³¹

Entretanto, os derivados azóis são fungostáticos e em muitos casos a doença sofre recidiva após a interrupção do tratamento. E ainda, já estão sendo relatados casos de resistência de algumas cepas a derivados azóis, especialmente de espécies de *Candida*.³²

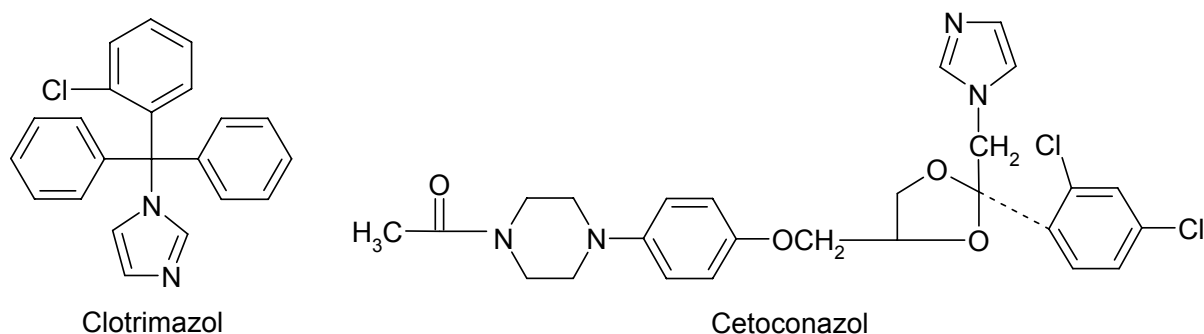
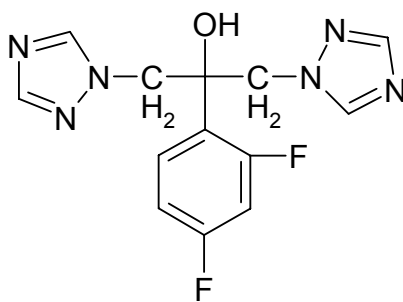
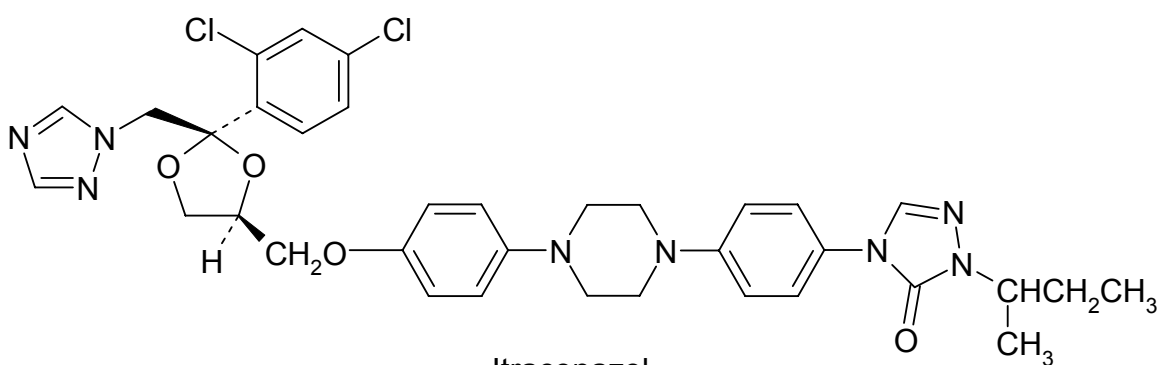


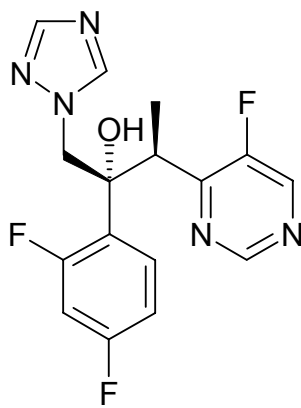
Figura 1 - Compostos azólicos licenciados para uso como fármacos antifúngicos.



Fluconazol



Itraconazol



Voriconazol

Figura 1 - Compostos azólicos licenciados para uso como fármacos antifúngicos.

2.1.4 A busca por novos agentes antimicrobianos

Em todo o mundo, atualmente, pelo menos 40% dos pacientes hospitalizados são tratados com um ou mais agentes antimicrobianos, e milhões de infecções potencialmente fatais já foram por eles curadas.^{22,23} Porém, estes agentes estão entre os mais incorretamente utilizados pelos médicos. A maior consequência desse uso disseminado foi o aparecimento de patógenos resistentes aos antibióticos e quimioterápicos existentes na atualidade, o que tornou a necessidade de novas terapias para infecções microbianas clara e imediata.^{24,26,32,33}

Em vista desta necessidade, muitas moléculas têm sido testadas quanto a sua atividade antimicrobiana, dentre as quais se destacam os derivados azólicos, por sua analogia estrutural a diversos agentes antimicrobianos existentes no mercado. Existem trabalhos de diversos grupos de pesquisa que relatam a síntese e avaliação quanto à ação contra bactérias e/ou fungos de diversos azóis, como imidazóis³⁴⁻³⁹ pirazóis⁴⁰⁻⁴³, tiazóis⁴⁵⁻⁴⁸, benzoxazóis^{49,50}, oxazóis⁵¹⁻⁵⁴, oxadiazóis⁵⁵, triazóis⁵⁶⁻⁵⁸, entre outros. Estes estudos foram realizados utilizando-se diferentes cepas, pelo método de diluição em caldo ou difusão em disco, sendo que a maioria demonstrou que os diversos compostos azólicos possuem atividade antimicrobiana.

Nos últimos anos alguns estudos já foram relatados com moléculas contendo o núcleo isoxazol quanto a sua ação antimicrobiana, demonstrando que este núcleo possui atividade apreciável tanto contra bactérias, como para fungos.

Em 1999, Raffa e colaboradores⁵⁹, sintetizaram e testaram quanto à atividade antifúngica novos *N*-isoxazolil-2-iodobenzamidas (Figura 2), análogos de fungicidas utilizados na agricultura, pelo método de difusão em ágar, utilizando benodanil como droga de referência. Dentre os compostos testados, os compostos 3b (R= Cl e R'= H) e 9a (R, R' = H) apresentaram atividade antifúngica apreciável, semelhante ao benodanil.

No ano 2000, Zadrozna e col.⁶⁰, sintetizaram e testaram uma série de 4,5-diidroisoxazóis substituídos com vários grupos funcionais, como ésteres, carbonila e éteres (Figura 3) quanto a sua atividade antimicrobiana contra diferentes espécies, pelo método de difusão em disco, usando tetraciclina e miconazol como padrão antibacteriano e antifúngico, respectivamente. Todos os compostos testados apresentaram atividade contra todos os microrganismos testados.

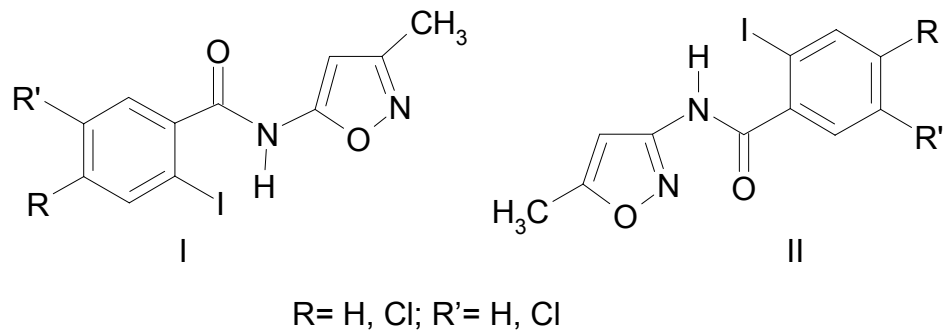


Figura 2 - *N*-(isoxazol-5-il)-2-iodo-4-*R*-5*R'*-benzamidas (I) e *N*-(isoxazol-3-il)-2-iodo-4-*R*-5*R'*-benzamidas (II).

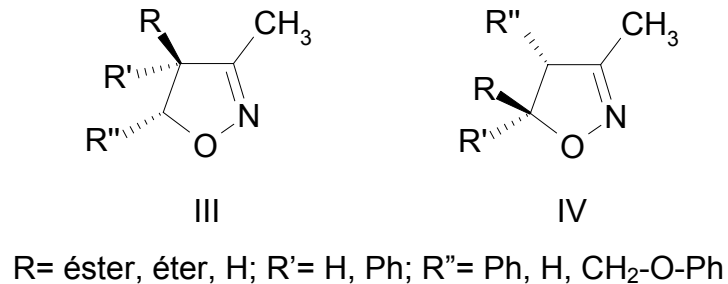


Figura 3 - 4,5-diidroisoxazóis testados, regioisômero A (III) e regioisômero B (IV)

Em um outro trabalho do ano 2000, Aiello e col.⁶¹ sintetizaram e testaram uma série de novos 3-(1-*R*-3(5)-metil-4-nitroso-1*H*-5(3)-pirazolil)-5-metilisoxazóis (Figura 4) quanto a sua atividade antibacteriana e antifúngica, contra diferentes patógenos humanos, pelo método de microdiluição em série. Miconazol, fluconazol e anfotericina B foram usados como antifúngicos de referência e estreptomicina como antibacteriano de referência. Todos os compostos testados apresentaram significantes atividades contra fungos, sendo que dois dos compostos se mostraram mais potentes e seletivos que o miconazol. Nenhum dos compostos testados apresentou atividade significativa contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

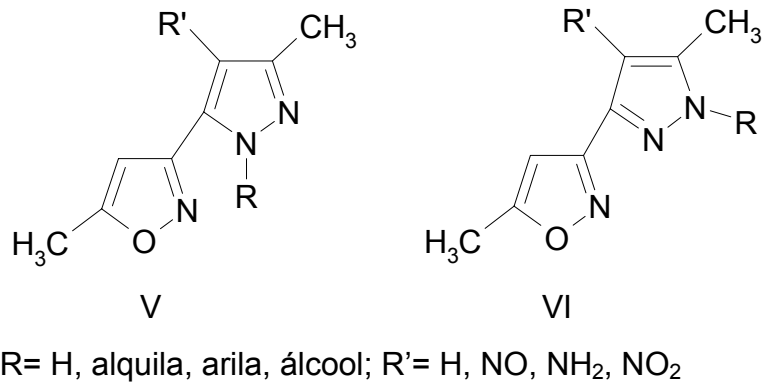


Figura 4 - 3-(1-*R*-3-metil-4-nitroso-1*H*-5-pirazolil)-5-metilisoxazóis (V) e 3-(1-*R*-5-metil-4-nitroso-1*H*-3-pirazolil)-5-metilisoxazóis (VI).

Menozzi e col.⁶², em 2001, sintetizaram e avaliaram biologicamente derivados azóis, análogos do bifonazol, com os núcleos fenilisoxazol (Figura 5) e fenilpirimidina. Os compostos foram testados *in vitro* contra uma série de fungos e bactérias patogênicos, pelo método de diluição em caldo. Os resultados provaram que a mudança da porção bifenila do bifonazol para um fenilisoxazolil ou fenilpirimidinil não é interessante para a atividade antimicrobiana.

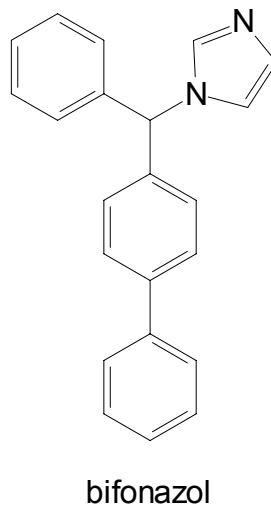


Figura 5. Estrutura química do bifonazol.

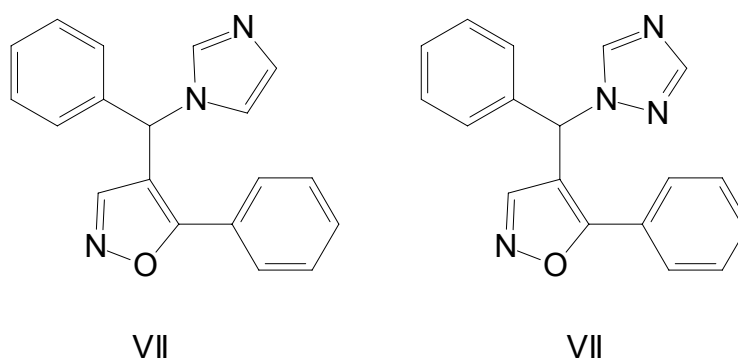
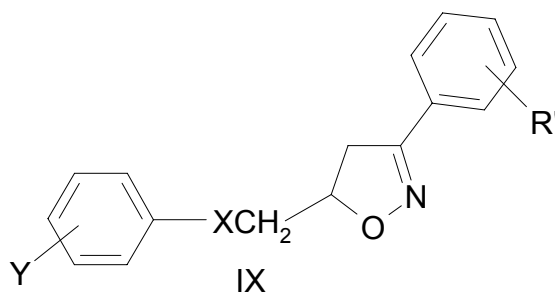


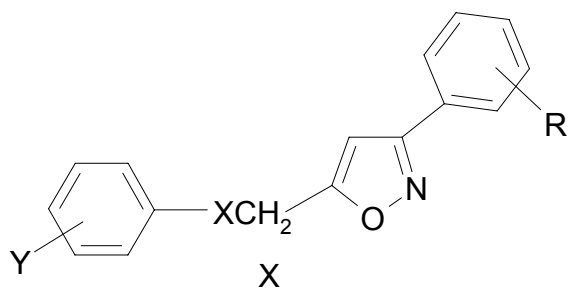
Figura 6 – 4-[1*H*-imidazol-1-il-(fenil)metil]-5-fenilisoxazol (VII) e 1-[fenil(5-fenilisoxazol-4-il)metil]-1*H*-1,2,4-triazol (VIII).

Em 2003, Velikorodov e col.⁶³, sintetizaram e testaram quanto à atividade antimicrobiana isoxazolinas e isoxazóis 3,5-dissubstituídas com grupos carbamato (Figura 6). A atividade antimicrobiana dos carbamatos derivados de isoxazolinas e isoxazóis sintetizados foi determinada testando contra cepas padrões de *S. aureus* e *E. coli* e com culturas de *Micrococcus* de isolados clínicos. A resistência das culturas testadas contra os compostos sintetizados foi estudada pela difusão direta no meio nutriente e pelo método de difusão em disco, usando gentamicina como droga de referência. Muitos dos compostos sintetizados possuíam propriedades antimicrobianas, a qual depende da natureza do substituinte e sua posição no núcleo benzênico do átomo de C3 do fragmento azólico, sendo que a atividade antimicrobiana foi mais pronunciada nos isoxazóis do que nas isoxazolinas.

Calí e col.⁶⁴ em 2004, identificaram uma série de derivados isoxazol-3-ácido hidroxâmico (Figura 7), como uma nova classe de inibidores não-peptídicos da peptídeo deformilase (PDF), sendo a síntese, inibição enzimática e investigação preliminar do modelo de ligação e seu potencial como composto antibacteriano relatados. Os ácidos hidroxâmicos foram avaliados quanto a sua atividade inibitória *in vitro* contra enzimas PDF de *E. coli* e *S. aureus*. A atividade dos compostos foi comparada com a actionina, sendo que apresentaram fraca atividade antibacteriana.



X= NHCO₂, O; Y= H, NHCO₂Me;
 R'= H, 4-OMe, 3,4-OCH₂O, 4-Cl, 4-Br, 3-NO₂, 4-NO₂, 2-OMe, 3-Br, 3,4(OMe)₂



R= alquila; X= NHCO₂; Y= H
 R'= H, 4-OMe, 3,4-OCH₂O, 4-Cl, 4-Br, 3-NO₂, 4-NO₂, 2-OMe, 3-Br, 3,4(OMe)₂

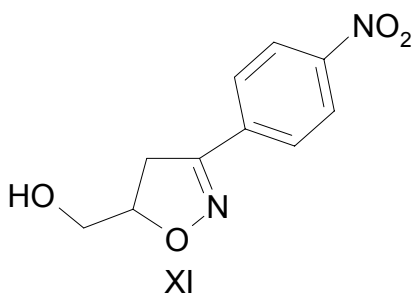


Figura 7 – isoxalinas (IX e XI) e isoxazóis (X) 3,5-dissubstituídos.

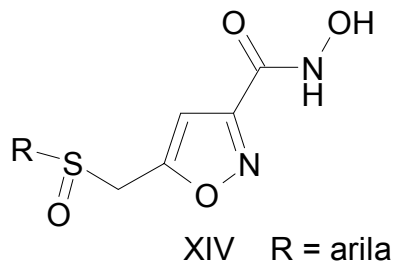
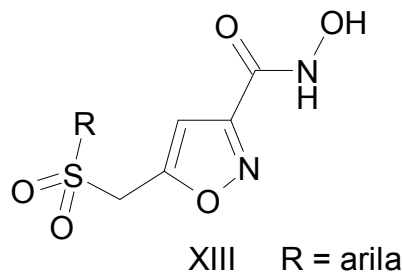
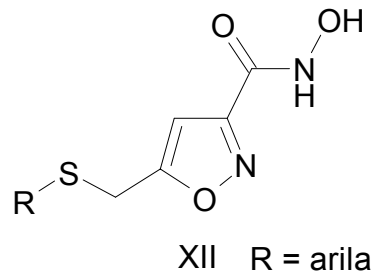


Figura 8 - derivados isoxazol-3-ácido hidroxâmico.

Também em 2004, Sadashiva e *col.*⁶⁵ sintetizaram e testaram quanto à inibição microbiana novas isoxazolidinas 5-imidazolil substituídas (Figura 8). Os novos compostos foram avaliados quanto a sua atividade antibacteriana pelo método de difusão em disco, usando estreptomicina como controle positivo. A concentração inibitória mínima (CIM) contra *S. aureus*, *E. coli* e *B. subtilis* foi definida e alguns compostos apresentaram cerca de 50% da inibição quando comparado com a estreptomicina. Quanto à atividade antifúngica, os compostos foram testados por dois métodos, *cup borer* e turbidimétrico, usando nistatina como controle positivo. Alguns compostos exibiram valores de CIM contra *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus niger* e *Cephalosporium acremonium*, melhores que a nistatina.

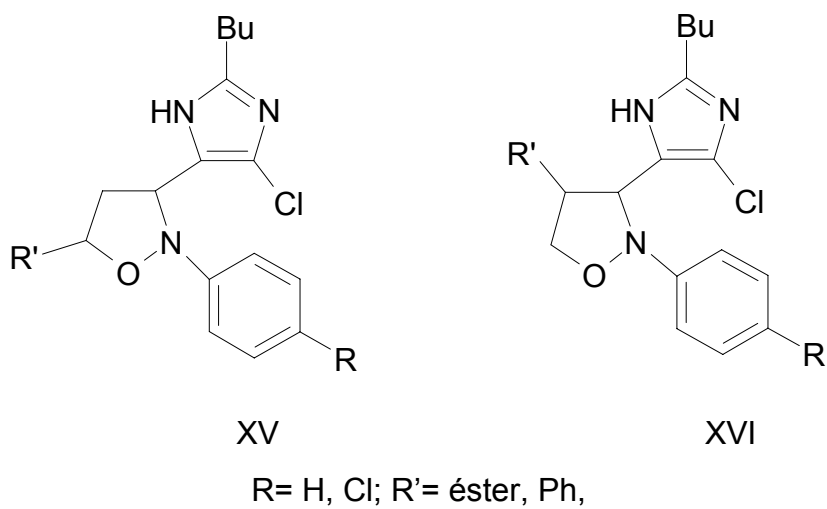
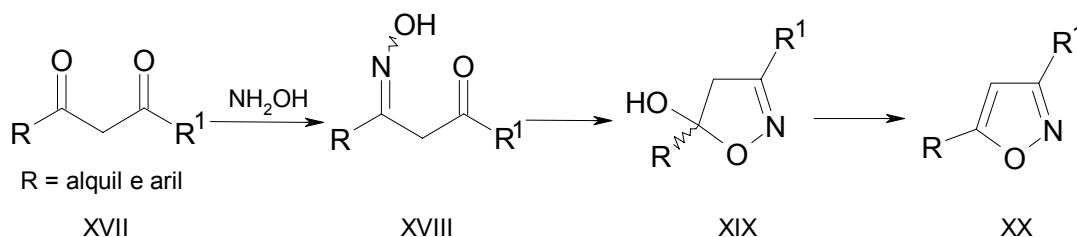


Figura 9 - isoxazolidinas 5-imidazolil substituídas, regioisômero A (XV) e regioisômero B (XVI)

2.2 Síntese de isoxazóis

A condensação de β -dicetonas (XVII) com hidroxilamina, foi o primeiro método utilizado para a síntese de isoxazóis. O mecanismo aceito para a ciclocondensação entre β -dicetonas e hidroxilamina em pH \sim 5,0 se processa através dos intermediários monoxima (XVIII) e 5-hidroxi-4,5-diidroisoxazol (XIX) (Esquema 1). Estes intermediários (XVIII e XIX) podem ser isolados dependendo dos substituintes R e R¹ e do meio reacional usado. Geralmente, quando R e R¹ são alquilas o intermediário XIX é facilmente convertido ao respectivo isoxazol (XX) por tratamento com ácidos ou bases, ou por aquecimento.⁶⁶ O uso de β -dicetonas é muito conveniente para a preparação de isoxazóis com substituintes idênticos nas posições 3 e 5, possibilitando a variação de substituintes na posição 4.⁶⁶

Esquema 1.



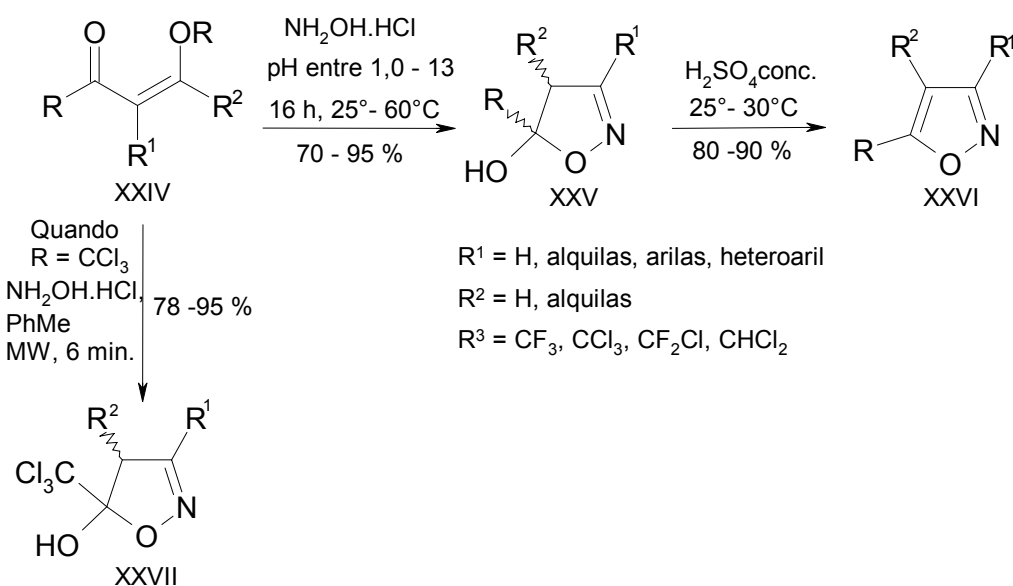
Entretanto, a reação de β -dicetonas não simétricas com hidroxilamina produz uma mistura isomérica de isoxazóis, o que implica na diminuição do rendimento do produto desejado e em problemas práticos para separação, principalmente quando R e R¹ são semelhantes nos efeitos químicos produzidos sobre os carbonos eletrofílicos. A diferenciação do potencial eletrofílico das carbonilas através dos efeitos químicos dos substituintes R e R¹ em β -dicetonas pode levar a predominância de um isômero sobre o outro ou mesmo tornar a reação seletiva.⁶⁶

Já foi observado que a estrutura do produto principal pode ser prevista com base na diferença de eletrofilicidade das carbonilas. Além de aldeídos e cetonas, um dos carbonos terminais pode ser de outros grupos funcionais, como por exemplo, de ésteres, de amidas, de acetais e de nitrilas.^{66,67}

O que tem sido apresentado na literatura com substratos 1,3-dieletrófilos onde R e R¹ são alquilas ou arilas e Y = OR, NR₂ foi a obtenção de misturas isoméricas de isoxazóis, com a preferência por uma das formas dependendo mais do meio reacional usado do que da diferença reacional dos carbonos eletrofilicos.⁶⁶

Nosso grupo de trabalho⁵ assim como outros grupos de pesquisadores interessados na química de isoxazóis^{69,70} demonstraram a obtenção regioespecífica de isoxazóis 5-halometilsubstituídos. Nossos resultados demonstram que partindo de 1,1,1-trifluor(cloro)-4-alcoxi-3-alquen-2-onas e cloreto de hidroxilamina em várias condições de pH, a temperatura entre 30 - 50° C, sempre foram obtidos os 5-halometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazóis, resultantes do ataque do nitrogênio nucleofílico da hidroxilamina no carbono vinílico (posição β) e do oxigênio nucleofílico da hidroxilamina com o carbono carbonílico. Essas reações de ciclocondensação também foram feitas sob irradiação de microondas em fornos comerciais, e a regioquímica da reação permaneceu a mesma. Os produtos 5-hidroxi-5-trialometil-4,5-diidroisoxazóis obtidos nos modos convencionais foram convertidos em 5-halometil-isoxazóis por eliminação de água usando ácido sulfúrico concentrado. A grande estabilidade dos 5-halometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazóis foi atribuída à presença do grupo halogenado na porção hemiacetal da molécula. Durante os processos de síntese usados em nosso grupo de trabalho não foram isoladas as oximas/enaminonas intermediárias (Esquema 3).⁵

Esquema 3.

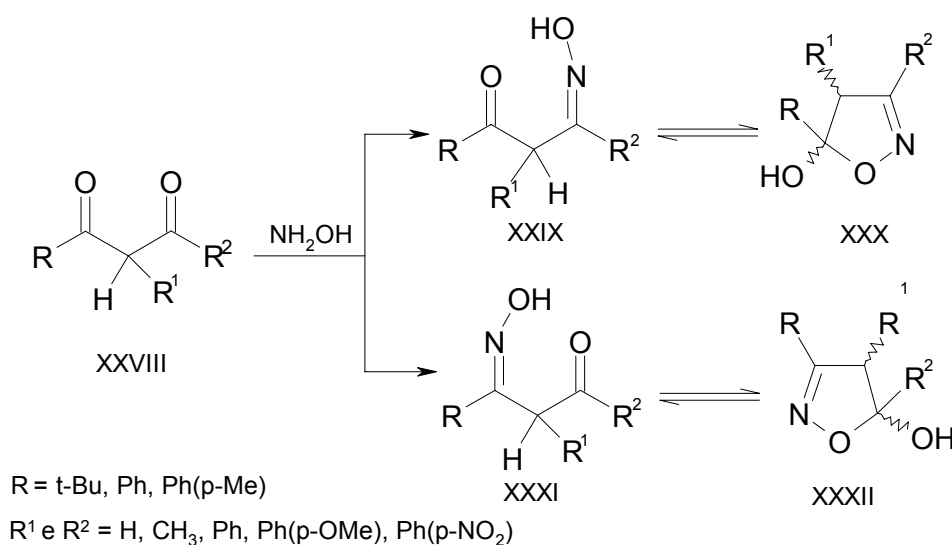


2.3 Isolamento de 5-hidroxi-4, 5-diidroisoxazóis (2-isoxazolin-5-óis)

Os 5-hidroxi-4,5-diidroisoxazóis (2-isoxazolin-5-óis) são os intermediários nas sínteses de isoxazóis a partir de β -dicetonas ou de cetonas α,β -insaturadas. Alguns pesquisadores têm estudado o tautomerismo ciclo \leftrightarrow cadeia aberta, o qual pode ser observado em algumas reações de condensação de cloreto de hidroxilamina com alquil e aril β -dicetonas e β -cetoaldeídos, Esquema 4.⁷¹

Escale e col.⁷¹ estudaram esse equilíbrio sob várias condições de pH. Os autores demonstraram que o tautômero cíclico é estabilizado com o aumento da quantidade e do volume dos substituintes nas posições 3, 4 e/ou 5, sendo que a dissustituição na posição 4 (efeito *gem*) apresenta o efeito mais notável. A presença de um grupo aril na posição 5 diminui a reatividade da carbonila vizinha e desloca o equilíbrio em direção ao tautômero de cadeia aberta, especialmente quando o anel aromático possui um substituinte retirador de elétrons. Atualmente sabe-se que 5-triclorometil- e 5-polialoalquil- (incluindo 5-trifluormetil-)-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazóis são moléculas estáveis ao ambiente e pouco reativas para a aromatização do sistema isoxazol. A aromatização do anel isoxazol com eliminação de água só acontece em meios reacionais extremamente ácidos.⁶

Esquema 4.



2.4 Testes de atividade antimicrobiana *in vitro*

A sensibilidade dos microrganismos à ação das drogas antimicrobianas pode ser testada *in vitro* por meio de antibiograma. O teste verifica o efeito bactericida (ou fungicida) ou bacteriostático (ou fungistático) e as concentrações das drogas que exercem estes efeitos. O antibiograma consiste no cultivo do microrganismo, cujo comportamento se quer verificar, em presença da droga em teste, observando-se a ausência do desenvolvimento do microrganismo se está presente uma droga ativa, ou o desenvolvimento normal do microrganismo se está presente uma droga não ativa.^{22,23}

O antibiograma pode ser realizado de modo qualitativo (método de difusão) ou quantitativo (método de diluição).

No método qualitativo uma concentração fixa do antibiótico é aplicada ao meio onde o microrganismo está sendo cultivado. O teste é geralmente realizado em meio sólido, sendo o antibiótico contido em discos de papel ou orifícios no meio de cultura. A droga difunde-se no meio de cultura provocando um halo de inibição do crescimento do microrganismo no local de difusão, caso ele seja sensível ao medicamento. Este halo de inibição está relacionado à atividade da droga contra a cepa que está sendo testada.^{22,23} Esta técnica é simples, no que diz respeito a sua execução e seu custo é relativamente baixo.

No método quantitativo se faz a determinação das concentrações em que a droga é ativa (concentração inibitória mínima - CIM e concentração bactericida mínima – CBM ou concentração fungicida mínima - CFM).

2.4.1 Determinação de CIM, CBM e CFM

O método de diluição é realizado em meios líquidos, fazendo-se concentrações decrescentes da droga em teste e submetendo-as a presença do microrganismo, determinando-se assim a menor concentração capaz de inibir o crescimento (CIM, a qual corresponde à concentração bacteriostática ou fungistática). Para se determinar a concentração bactericida ou fungicida da droga, faz-se repiques das diluições da droga, após ter sido submetida à presença do

microrganismo, para meios desprovidos da droga e verifica-se qual a menor concentração onde os repiques não apresentam crescimento.²³

2.4.2 Técnica atualmente preconizada

O *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) estabeleceu um grupo de pesquisa a fim de encontrar um teste de suscetibilidade padrão para microrganismos. Este grupo estudou os fungos e levou em consideração diversos fatores, tais como: as características biológicas dos fungos, as propriedades físico-químicas dos antifúngicos e, sobretudo, as condições técnicas.⁷²

Em dezembro de 1992, o NCCLS publicou os resultados das pesquisas sob a forma de um documento codificado como M27-A, com uma segunda edição lançada em 2002, o qual propõe uma metodologia padronizada, empregando-se a técnica de diluição em caldo.^{32,73,74}

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Síntese dos compostos 2a-m, 3k, l, m e 4j, 4p-t, 5j, 5p-t

Os compostos 5-triclorometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazóis **2a-m** foram sintetizados de acordo com as técnicas relatadas na referência 5f, os compostos isoxazóis-5-ácido carboxílico **3a-o** foram sintetizados conforme relatado na referência 6, e os compostos 3-aryl-5-tricloro(flúor)metilisoxazóis, **4j, 4p-t, 5j, 5p-t** foram sintetizados de acordo com a referência 5c.

3.2 Síntese dos compostos 2n e 2o

3.2.1 Técnicas de identificação e determinação da pureza

3.2.1.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de ^1H (200MHz) foram obtidos em um Espectrômetro BRUKER DPX 200 (Departamento de Química – UFSM). Para a aquisição dos espectros foi utilizado CDCl_3 como solvente deuterado, tendo como referência para $\delta = 0\text{ppm}$ o tetrametil-silano, TMS, em tubos de 5mm.

3.1.2.2 Espectroscopia de massa

Os espectros de massa e respectivos cromatogramas foram obtidos através de um cromatógrafo gasoso HP 6890 acoplado a um detector de massa seletivo HP 5973 equipado com injetor split-splitless autosampler, coluna capilar cross-linked HP 5, com diâmetro interno 30mm, 0,32mm, sendo usado hélio como gás de arraste.

3.1.2.3 Ponto de fusão

Os compostos obtidos tiveram seus pontos de fusão determinados em um aparelho kofler REICHERT – THEMOVAR com termômetro não aferido.

3.2.2 Reagentes e solventes

3.2.2.1 Reagentes e solventes purificados

Os solventes foram purificados e secos antes de serem utilizados, conformes as técnicas usuais.

- Piridina: destilada sobre KOH.
- Metanol: tratado com Mg metálico e destilado.
- Clorofórmio: seco com CaCl_2 , refluxado com P_2O_5 e destilado.

3.2.2.2 Reagentes e solventes não-purificados

- 4-tiometil-2-pentanona
- 4-fenil-2-butanona
- Trimetilortoformiato
- Cloreto de tricloroacetila
- Cloridrato de hidroxilamina
- Ácido p-toluenossulfônico

3.2.3 Técnica para a síntese dos acetais

Em um erlenmeyer de 250mL foi misturado a 3-tiometil-2-butanona (5,9g, 50mmol) ou a 4-fenil-2-butanona (7,4g, 50mmol), o trimetilortoformiato (10,6g, 100mmol), o ácido p-toluenossulfônico em quantidade catalítica e 50mL de metanol seco. Após repouso por 24h a temperatura ambiente, o meio reacional foi neutralizado com MgSO_4 anidro e filtrado em funil comum. A seguir, o solvente e o trimetilortoformiato foram retirados por destilação à pressão reduzida.

3.2.4 Síntese das β -alcoxiviniltriclorometilcetonas **1n** e **1o**

A síntese das β -alcoxiviniltriclorometilcetonas **1n** e **1o** foi feita através da acilação do acetal correspondente com cloreto de tricloroacetila. Em um balão de 250mL, foi adicionado cloreto de tricloroacetila (18,2g, 100mmol) e 50mL de CHCl_3 seco e em um funil de adição foi adicionado o acetal correspondente, 3-tiometil-2-butanona dimetilacetal (8,2g, 50mmol) ou 4-fenil-2-butanona dimetilacetal (9,7g, 50mmol) e piridina purificada (7,9g, 100mmol). O conteúdo do funil foi gotejado lentamente sobre o conteúdo do balão a 0°C , sob agitação magnética. Após a adição a mistura reacional foi mantida a temperatura ambiente, sob agitação magnética, por 24h.

3.2.5 Síntese dos compostos **2n** e **2o**

A técnica de obtenção das isoxazolininas **2n** e **2o**, a partir da condensação das β -alcoxiviniltriclorometilcetonas **1n** e **1o**, com cloridrato de hidroxalamina, foi feita da seguinte forma:

Em um balão de 100mL, sob agitação magnética, foi adicionado a β -alcoxiviniltriclorometilcetona correspondente **1n** (13,9g, 50mmol) ou **1o** (15,4g, 50mmol), piridina purificada (5,9g, 75mmol) e uma solução de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (5,2g, 75mmol) em 50mL de água. Foi adaptada uma coluna de refluxo e a temperatura foi elevada até ocorrer refluxo brando por 5h seguidas. No final deste tempo, o solvente foi evaporado em rotaevaporador, a mistura reacional lavada com solução de HCl 0,5N (1 x 100mL) e com água destilada (2 x 100mL) e o produto extraído com clorofórmio. A seguir, o produto foi seco com MgSO_4 anidro e filtrado em funil comum. O produto resultante foi purificado, o solvente evaporado e os produtos **2n** e **2o** secos sob vácuo.

3.2.6 Dados espectroscópicos e constantes físicas dos compostos **2n** e **2o**

5-triclorometil-5-hidroxi-3-(1-tiometil-etil)-4,5-diidroisoxazol (**2n**): o produto foi obtido na forma de um sólido branco (85%); (P.F. = 128°C); ^1H RMN (400MHz, CDCl_3) δ = 1.48 (d, 3H, H-(R)SMe); 2.05 (d, 3H, H- CH_3 (R)); 3.33 (dd, 1H, H-4_A); 3.8 (dd, 1H, H-4_B); 3.7 (m, 1H, H-(R)CH); 4.05 (s, 1H, H-OH); Fórmula Molecular: $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{Cl}_3\text{NO}_2\text{S}$; Peso Molecular: 278,58g/mol; EM (m/z , %) 281 ($\text{M}^+ + 4$, <5); 279 ($\text{M}^+ + 2$, <5); 277 (M^+ , <5); 235 ($\text{M}^+ + 4$ -SMe, 33); 233 ($\text{M}^+ + 2$ -SMe, 96); 231 (M^+ -SMe, 100); 114 (231 - SMe, 21); 75 (MeCH(SMe), 92). Espectros em anexo.

5-triclorometil-3-(2-fenil-etil)-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazol (**2o**): o produto foi obtido na forma de um sólido branco (80%); (P.F. = 143°C); ^1H RMN (400MHz, CDCl_3) δ = 2.87 (t, 2H, H-(R)CH₂(1)); 2.65 (m, 2H, H-(R)CH₂(2)); 3.04 (dd, 1H, H-4_A); 3.45 (dd, 1H, H-4_B); 3.75 (s, 1H, H-OH); 7.19 (m, 5H, H-(R)Ph). Fórmula Molecular: $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{Cl}_3\text{NO}_2$. Peso Molecular: 308,59g/mol. EM (m/z , %) 309 ($\text{M}^+ + 2$, 3,8) 307 (M^+ , 3,8) 146 (Cl_3CCO , 10) 144 (Cl_3CCO , 12) 105 ($\text{Ph}(\text{CH}_2)_2$, 30) 91 (PhCH_2 , 100). Espectros em anexo.

3.3 Microrganismos

3.3.1 Procedência

Utilizou-se na execução dos testes de atividade antimicrobiana cepas provenientes do *American Type Culture Collection* (ATCC). As espécies testadas foram as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25322 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e as leveduras *Candida albicans* ATCC 44373, *Candida tropicalis* ATCC 13803, *Candida lusitanae* ATCC 66035, *Cryptococcus neoformans* A ATCC 90012, *Cryptococcus neoformans* var. sorotipo “gattii” B ATCC 56990, *Cryptococcus neoformans* var. sorotipo “gattii” C ATCC 56341, e *Cryptococcus neoformans* D ATCC 28957.

3.3.2 Isolamento

As cepas foram isoladas em tubos inclinados, sendo que para bactérias utilizou-se como meio de cultura ágar Müeller-Hinton (Merck®) e para fungos utilizou-se ágar Sabouraud Dextrose (Merck®).

3.4 Meios de cultura

3.4.1 Meio de cultura utilizado para o isolamento de bactérias, para a manutenção de cepas isoladas de bactérias e para a determinação da CBM: ágar Müeller-Hinton (Merck®)

3.4.2 Meio de cultura utilizado para o isolamento de leveduras, para a manutenção de cepas isoladas de leveduras e para a determinação da CFM: ágar Sabouraud Dextrose (Merck®)

3.4.3 Meio de cultura utilizado para a determinação da suscetibilidade de bactérias: caldo Müeller-Hinton (Merck®)

3.4.4 Meio de cultura utilizado para a determinação da suscetibilidade de leveduras: caldo Sabouraud Dextrose (Merck®)

3.4.5 Preparação dos meios de cultura

Os componentes sólidos foram pesados de acordo com a informação do fabricante e transferidos para um balão, sendo dissolvidos em água destilada. Os meios sólidos e líquidos foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos e armazenados em geladeira até o momento do uso.

3.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

A técnica utilizada para a determinação da atividade contra bactérias e leveduras, foi uma adaptação da técnica M-27A do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) de diluição em caldo para avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) frente a fungos leveduriformes.⁷⁴

3.5.1 Preparação do inóculo

As bactérias foram semeadas em placas contendo ágar Müeller-Hinton e incubadas a 37°C, durante 18-24h e as leveduras foram semeadas em placas contendo ágar Sabouraud e incubadas a 28°C, durante 24-48h. Decorrido este período, foi preparada uma suspensão dos microrganismos em caldo Müeller-Hinton, no caso das bactérias, ou em caldo Sabouraud, no caso das leveduras, ajustando-se a turvação visualmente de acordo com o tubo nº 0,5 da escala de McFarland.

3.5.2 Preparação das soluções estoques dos compostos testados

As soluções estoques de todos os compostos isoxazóis testados foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) para se obter uma concentração de 5mg/mL.

3.5.3 Testes de avaliação antimicrobiana

3.5.3.1 Diluição em série

Preparou-se uma seqüência de 7 tubos, cada um contendo 0,5mL de caldo Müeller-Hinton ou Sabouraud. No primeiro tubo adicionou-se 0,5mL da solução estoque de 5mg/mL. Retirou-se 0,5mL da solução do primeiro tubo e adicionou-se ao segundo, e assim sucessivamente. No final da diluição, cada tubo continha 0,5mL da

solução do composto teste diluído no meio de cultura. Após a diluição, adicionou-se 0,5mL da solução de microrganismo preparada conforme descrito anteriormente. As concentrações finais em cada tubo ficaram, respectivamente, 1,25, 0,625, 0,312, 0,156, 0,078, 0,039, 0,019 mg/mL. Os testes foram realizados em triplicata.

Os tubos foram incubados a 37°C, durante 18-24h, nos testes antibacterianos e a 28°C, durante 24-48h, nos testes antifúngicos.

3.5.3.2 Determinação da CIM

Decorrido o tempo de incubação, a leitura dos tubos foi feita visualmente e a menor concentração em que não havia crescimento microbiano foi determinada como a concentração inibitória mínima (CIM).

3.5.3.3 Determinação da CBM ou CFM

Para se determinar a concentração bactericida ou fungicida dos compostos, fez-se repiques das diluições em que não havia crescimento de microrganismos, em placas de Petri contendo meios sólidos (ágar Müller-Hinton ou Sabouraud) desprovidos dos compostos em teste. As placas foram incubadas a 37°C, durante 18-24h, no caso das bactérias, e a 28°C, durante 24-48h, no caso dos fungos. Após o período de incubação, verificou-se qual a menor concentração em que os repiques não apresentavam crescimento microbiano, a qual foi determinada como concentração bactericida mínima (CBM), nos testes antibacterianos ou concentração fungicida mínima (CFM), nos testes antifúngicos.

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1 Síntese dos isoxazóis avaliados quanto à atividade antimicrobiana

A síntese dos compostos 5-triclorometil-4,5-diidroisoxazóis,⁵ ácidos isoxazóis-5-carboxílicos⁶ e 3-aryl-5-tricloro(fluor)metilisoxazóis⁵ testados quanto a sua atividade antimicrobiana foi feita a partir das técnicas já usadas nos laboratórios do NUQUIMHE e descritos nas referências 5 e 6 e suas estruturas químicas encontram-se na Figura 9. A síntese dos compostos **2n** e **2o**, os quais foram sintetizados pela primeira vez para o testes desta dissertação, é encontrada no esquema 5. As Tabelas 2 e 3 apresentam a nomenclatura dos compostos sintetizados e avaliados quanto a atividade antimicrobiana.

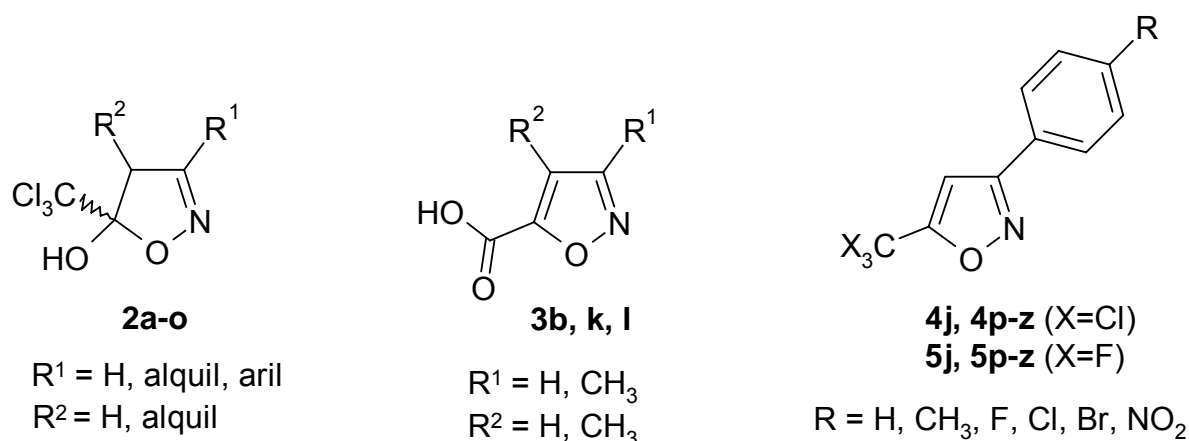


Figura 10 - 5-triclorometil-4,5-diidroisoxazóis **2a-o**, ácidos isoxazóis-5-carboxílicos **3b, k, l** e 3-aryl-5-tricloro(fluor)metilisoxazóis **4j, 4p-t, 5j, 5p-t**.

Esquema 5.

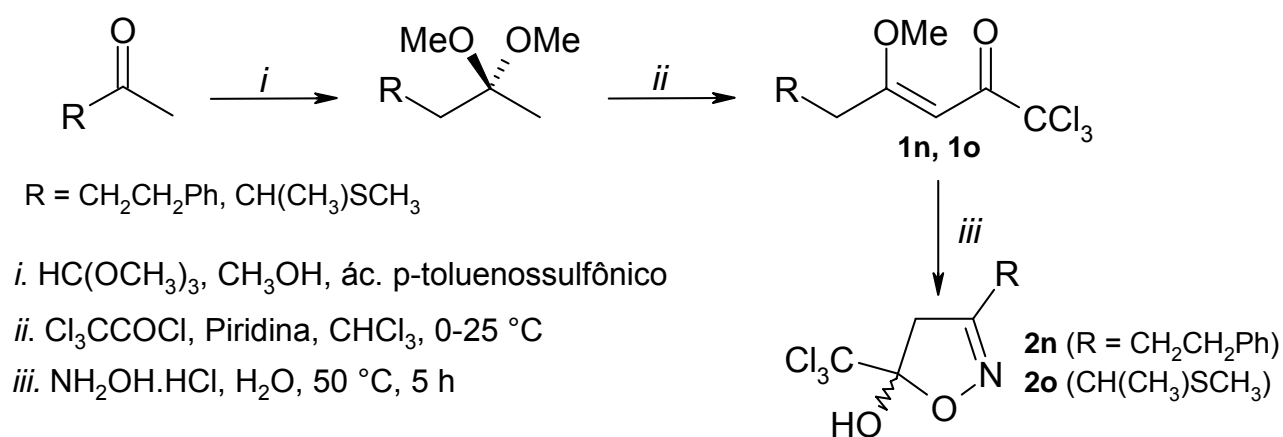


Tabela 2 – Nomenclatura dos compostos 5-triclorometil-4,5-diidroisoxazóis **2a-o** e isoxazóis-5-ácido carboxílico **3b, k, l**.

Composto	R ¹	R ²	Nomenclatura
2a	H	H	5-triclorometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazol
2b	CH ₃	H	5-triclorometil-5-hidroxi-3-metil-4,5-diidroisoxazol
2c	CH ₂ CH ₃	H	5-triclorometil-3-etil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazol
2d	<i>n</i> -Pr	H	5-triclorometil-5-hidroxi-3- <i>n</i> -propil-4,5-diidroisoxazol
2e	<i>iso</i> -Pr	H	5-triclorometil-5-hidroxi-3- <i>iso</i> -propil-4,5-diidroisoxazol
2f	<i>n</i> -Bu	H	3- <i>n</i> -butil-5-triclorometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazol
2g	<i>terc</i> -Bu	H	3- <i>terc</i> -butil-5-triclorometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazol
2h	CH ₂ Br	H	3-bromometil-5-triclorometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazol
2i	CHBr ₂	H	3-dibromometil-5-triclorometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazol
2j	Ph	H	5-triclorometil-3-fenil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazol
2k	H	CH ₃	5-triclorometil-5-hidroxi-4-metil-4,5-diidroisoxazol
2l	<i>ciclo</i> - (CH ₂) ₄ -		5-triclorometil-5-hidroxi-3,5-tetrametileno-4,5-diidroisoxazol
2m	<i>ciclo</i> -Pr	H	5-triclorometil-5-hidroxi-3- <i>ciclo</i> -propil-4,5-diidroisoxazol
2n	CH(CH ₃)SCH ₃	H	5-triclorometil-5-hidroxi-3-(1-tiometil-etil)-4,5-diidroisoxazol
2o	C ₂ H ₄ Ph	H	5-triclorometil-3-(2-fenil-etil)-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazol
3b	CH ₃	H	ácido 3-metilisoxazol-5-carboxílico
3k	H	CH ₃	ácido 4-metilisoxazol-5-carboxílico
3l	<i>ciclo</i> -(CH ₂) ₄ -		ácido 3,4-tetrametilenoisoxazol-5-carboxílico

Tabela 3 – Nomenclatura dos compostos 3-aryl-5-tricloro(flúor)metilisoxazóis **4j, 4p-t, 5j, 5p-t**.

Composto	X	R	Nomenclatura
4j	Cl	H	5-triclorometil-3-fenil-isoxazol
4p	Cl	NO ₂	5-triclorometil-3-(4-nitrofenil)-isoxazol
4q	Cl	Br	3-(4-bromofenil)-5-triclorometil-isoxazol
4r	Cl	F	5-triclorometil-3-(4-fluorfenil)-isoxazol
4s	Cl	CH ₃	5-triclorometil-3-(4-metilfenil)-isoxazol
4t	Cl	Cl	3-(4-clorofenil)-5-triclorometil-isoxazol
5j	F	H	3-fenil-5-trifluometil-isoxazol
5p	F	NO ₂	5-trifluometil-3-(4-nitrofenil)-isoxazol
5q	F	Br	3-(4-bromofenil)-5-trifluometil-isoxazol
5r	F	F	3-(4-fluorfenil)-5-trifluometil-isoxazol
5s	F	CH ₃	5-trifluometil-3-(4-metilfenil)-isoxazol
5t	F	Cl	3-(4-clorofenil)-5-trifluometil-isoxazol

4.2 Avaliação antimicrobiana

A partir da execução dos testes de avaliação antimicrobiana conforme descrito no item 4 (Materiais e Métodos) foram obtidos os resultados mostrados nas Tabelas 4-26, seguidas de textos comentando e comparando os valores obtidos.

4.2.1 Resultados obtidos para os isoxazóis **2a-o** na série de microorganismos testados

Tabela 4 - Valores de CIM e CBM contra *S. aureus* para os compostos **2a-o** testados.

Composto	R ¹	R ²	CIM	CBM
			(mg/mL)	
2a	H	H	0,312	0,625
2b	Me	H	0,625	--
2c	Et	H	1,25	--
2d	<i>n</i> -Pr	H	1,25	--
2e	<i>iso</i> -Pr	H	1,25	--
2f	<i>n</i> -Bu	H	1,25	--
2g	<i>terc</i> -Bu	H	--	--
2h	CH ₂ Br	H	0,078	0,156
2i	CHBr ₂	H	0,156	0,312
2j	Ph	H	1,25	--
2k	H	Me	1,25	--
2l	<i>ciclo</i> - (CH ₂) ₄ -		1,25	--
2m	<i>ciclo</i> -Pr	H	1,25	--
2n	CH(CH ₃)SCH ₃	H	1,25	--
2o	C ₂ H ₄ Ph	H	0,156	0,625
Padrão	Ampicilina		0,039	n.t.

CIM = concentração inibitória mínima, CBM = concentração bactericida mínima, -- = sem ação.

Observando-se os valores de CIM dos compostos **2a-2g** na Tabela 4, é possível perceber que a presença de alquilas, com aumento da cadeia do substituinte de metila até butila ou a ramificação com $R^1 = i\text{-Pr}$, diminuiu a atividade antimicrobiana do modelo 4,5-diidroisoxazol frente à bactéria Gram-positiva *S. aureus*. Fazendo a comparação entre os valores de CIM dos compostos **2a** e **2b**, observou-se que a presença da metila em R^1 (**2b**) diminuiu a atividade à metade (o valor da CIM aumenta duas vezes). A presença de substituintes alquilas com mais carbonos **2c** $R^1 = \text{Et}$, **2d** $R^1 = n\text{-Pr}$ e **2f** $R^1 = n\text{-Bu}$ ou o substituinte alquila ramificado **2e** $R^1 = i\text{-Pr}$ na posição 3 do modelo 4,5-diidroisoxazol causou a diminuição da atividade em quatro vezes em relação a **2a** $R^1 = \text{H}$, até que o composto 4,5-diidroisoxazol com o maior substituinte alquil ramificado **2g** $R^1 = t\text{-Bu}$ não apresentou atividade nas concentrações testadas. O composto mais ativo, ou seja, com o menor valor de CIM com atividade contra *S. aureus*, foi o 4,5-diidroisoxazol **2h**, o qual possui o substituinte bromometil na posição 3 do heterociclo ($R^1 = \text{CH}_2\text{Br}$). O valor da CIM = 0,078mg/mL foi somente o dobro da concentração ativa do padrão ampicilina, demonstrando portanto a metade da atividade da ampicilina.

Entretanto, a presença do substituinte dibromometil em R^1 , diminuiu a atividade do modelo 4,5-diidroisoxazol. O composto dibromado **2i** apresentou tanto a CIM, como a CBM, com valores quatro vezes e duas vezes maiores, respectivamente, em relação ao 3-bromometil-4,5-diidroisoxazol **2h**. Os modelos 4,5-diidroisoxazóis **2j-m** tiveram os seus valores de CIM constantes, com valor igual ao do modelo **2c**. Portanto, a fenila, o ciclo-propil ou o (1-tiometil)etil na posição 3 do 4,5-diidroisoxazol não causam variação na atividade antimicrobiana contra o *S. aureus* do modelo 5-triclorometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazol quando comparados as alquilas comuns. Do mesmo modo, a presença da metila na posição 4 do 4,5-diidroisoxazol não substituído na posição 3 (**2k**) ou a dissstituição com alquilas nas posições 3 e 4 do ciclo 4,5-diidroisoxazol (**2l**) não causaram variação na atividade antimicrobiana contra o *S. aureus* com os valores de CIM permanecendo 1,25 mg/mL para os dois compostos.

Já o composto **2o** com o substituinte $R^1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ apresentou o valor de CIM = 0,156mg/mL menor do que aqueles valores medidos para os modelos substituídos com alquilas (**2b-f**) e do que o modelo de 5-triclorometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazol não substituído nas posições 3 e 4.

Esses resultados demonstram que os substituintes bromometil, dibromometil e 2-feniletil são melhores modelos farmacofóricos para a atividade antibacteriana contra *S. aureus* do que o 5-triclorometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazol.

Tabela 5 - Valores de CIM e CBM contra *E. coli* para os compostos **2a-o** testados.

Composto	R ¹	R ²	CIM	CBM
			(mg/mL)	
2a	H	H	0,312	0,625
2b	Me	H	0,625	--
2c	Et	H	0,625	--
2d	<i>n</i> -Pr	H	0,625	--
2e	<i>iso</i> -Pr	H	0,625	--
2f	<i>n</i> -Bu	H	0,312	0,625
2g	<i>terc</i> -Bu	H	--	--
2h	CH ₂ Br	H	0,312	0,625
2i	CHBr ₂	H	0,156	0,312
2j	Ph	H	0,625	1,25
2k	H	Me	0,625	--
2l	<i>ciclo</i> - (CH ₂) ₄ -		0,625	1,25
2m	<i>ciclo</i> -Pr	H	0,625	--
2n	CH(CH ₃)SCH ₃	H	0,625	1,25
2o	C ₂ H ₄ Ph	H	0,625	--
Padrão	Ampicilina		0,039	--

CIM = concentração inibitória mínima, CBM = concentração bactericida mínima, -- = sem ação.

Contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*, da mesma forma que para Gram-positiva, a substituição na posição 3 do heterociclo com alquilas diminuiu a atividade do modelo 4,5-diidroisoxazol. A presença das alquilas causou a diminuição da atividade pela metade, aumentando o valor da CIM em duas vezes em relação ao 4,5-diidroisoxazol não substituído (**2a**). A variação no tamanho da cadeia ou a ramificação dos alquil substituintes na posição 3 do 4,5-diidroisoxazol (R¹ = CH₃ até *i*-Pr), não causou variação da atividade antibacteriana contra *E. coli* dentro da série

2b-e. Entretanto, o composto **2f** demonstrou atividade antibacteriana contra *E. coli* igual ao composto **2a** (Tabela 5). Novamente o composto 4,5-diidroisoxazol **2g** com $R^1 = t\text{-Bu}$ não apresentou atividade nas concentrações testadas. Os modelos **2j**, **2k**, **2m** e **2n** também não apresentaram variação significativa na atividade antibacteriana contra *E. coli*, todos apresentando valores de CIM = 0,625 mg/mL, com atividade 16 vezes menor do que o padrão ampicilina.

A diss substituição com alquilas nas posições 3 e 4 diminuiu ainda mais a atividade antibacteriana contra *E. coli*, o modelo **2l** apresentou valor de CIM = 1,25 mg/mL, demonstrando atividade 32 vezes menor do que o padrão ampicilina.

Portanto, é possível afirmar que a presença de alquilas não causa melhora na atividade antimicrobiana do modelo 5-triclorometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazol, pois os valores de CIM e CBM medidos para **2a** ($R^1 = \text{H}$) e **2f** ($R^1 = n\text{-Bu}$) foram iguais, CIM = 0,312 mg/mL, atividade antibacteriana contra *E. coli* 8 vezes menor do que o padrão.

O modelo **2h** com o substituinte bromometil na posição 3 do 4,5-diidroisoxazol apresentou valor de CIM igual aos valores medidos para os modelos não substituído **2a** e substituído com a butila normal na posição 3, CIM = 0,312 mg/mL. Contra a *E. coli* o modelo com o substituinte dibromometil foi o mais ativo, com CIM = 0,156 mg/mL, demonstrando atividade somente 4 vezes menor do que o padrão ampicilina.

Tabela 6 - Valores de CIM e CBM contra *P. aeruginosa* para os compostos **2a-o** testados.

Composto	R ¹	R ²	CIM	CBM
			(mg/mL)	
2a	H	H	0,312	0,625
2b	Me	H	0,625	1,25
2c	Et	H	0,625	1,25
2d	<i>n</i> -Pr	H	0,625	1,25
2e	<i>iso</i> -Pr	H	0,625	1,25
2f	<i>n</i> -Bu	H	0,625	1,25
2g	<i>terc</i> -Bu	H	--	--
2h	CH ₂ Br	H	0,312	0,625
2i	CHBr ₂	H	0,625	1,25
2j	Ph	H	0,625	1,25
2k	H	Me	0,625	1,25
2l	<i>ciclo</i> - (CH ₂) ₄ -		0,625	1,25
2m	<i>ciclo</i> -Pr	H	0,625	--
2n	CH(CH ₃)SCH ₃	H	0,312	--
2o	C ₂ H ₄ Ph	H	0,625	--
Padrão	Ampicilina		0,156	--

CIM = concentração inibitória mínima, CBM = concentração bactericida mínima, -- = sem ação.

Nas medidas de atividade antibacteriana contra a bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa* dos modelos 5-triclorometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazóis (Tabela 6), foi observado, novamente, que a substituição da posição 3 do heterociclo com alquilas causou decréscimo na atividade. O modelo **2a** apresentou valor de CIM = 0,312 mg/mL somente o dobro do valor da CIM do padrão ampicilina, esse mesmo valor de CIM foi medido também para os modelos **2h** R¹ = CH₂Br e **2n** R¹ = CH(CH₃)SCH₃, porém para os modelos **2b-2f**, **2m** e **2o** com alquil substituintes na posição 3 do 4,5-diidroisoxazol, para o modelo **2j** com a fenila na posição 3 e para o modelo **2l** disubstituído com alquilas nas posições 3 e 4 do 4,5-diidroisoxazol foi medido o mesmo valor de CIM = 0,625 mg/mL. O composto **2g** novamente não foi ativo nas

concentrações testadas. Portanto, é possível afirmar que os substituintes presentes na série de modelos 5-triclorometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazol testados não melhoram a atividade do próprio 5-triclorometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazol sem substituintes nas posições 3 e/ou 4 contra a bactéria *P. aeruginosa*.

As diferenças no comportamento das diferentes cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas frente aos compostos **2a-o** e ao padrão, certamente é devido às diferenças morfológicas das paredes celulares dessas classes bacterianas. Isso influencia na penetração dos compostos no ambiente celular devido as diferenças de solubilidade dos compostos testados.

Além disso, as diferenças de comportamento entre bactérias Gram-negativas podem ser devido aos diferentes mecanismos de resistência das bactérias. A bactéria *P. aeruginosa* ter se mostrado mais resistente, pode refletir a sua capacidade em formar biofilmes que bloqueiam a penetração do agente químico estranho ou também em causar efluxo ativo, o que diminui efetivamente as concentrações intracelulares dos compostos em teste.⁷⁵

Tabela 7 - Valores de CIM e CFM contra *C. albicans* para os compostos **2a-o** testados.

Composto	R ¹	R ²	CIM	CFM
			(mg/mL)	
2a	H	H	0,625	1,25
2b	Me	H	1,25	--
2c	Et	H	1,25	--
2d	<i>n</i> -Pr	H	0,625	--
2e	<i>iso</i> -Pr	H	0,312	0,625
2f	<i>n</i> -Bu	H	0,625	1,25
2g	<i>terc</i> -Bu	H	0,312	0,625
2h	CH ₂ Br	H	0,156	1,25
2i	CHBr ₂	H	n.t.	n.t.
2j	Ph	H	0,312	1,25
2k	H	Me	0,312	0,625
2l	<i>ciclo</i> - (CH ₂) ₄ -		0,312	1,25
2m	<i>ciclo</i> -Pr	H	0,312	0,625
2n	CH(CH ₃)SCH ₃	H	0,625	--
2o	C ₂ H ₄ Ph	H	0,625	--
Padrão	Fluconazol		0,156	--

CIM = concentração inibitória mínima, CFM = concentração fungicida mínima, -- = sem ação, n.t. = não testado.

Contra a levedura *C. albicans* não houve relação evidente e facilmente racionalizável entre a estrutura química e atividade antifúngica. É possível observar na Tabela 7 que o modelo não substituído **2a** apresentou valor de CIM = 0,625 mg/mL assim como os modelos **2d** R¹ = *n*-Pr, **2f** R¹ = *n*-Bu, **2n** R¹ = CH(CH₃)SCH₃ e **2o** R¹ = CH₂CH₂Ph, entretanto, os modelos substituídos na posição 3 do heterociclo com CH₃ (**2b**) e com CH₂CH₃ (**2c**) apresentaram somente metade dessa atividade, com valores de CIM = 1,25 mg/mL. Já os modelos com substituintes *i*-Pr (**2e**), *t*-Bu (**2g**), Ph (**2j**) e *ciclo*-Pr (**2m**) na posição 3 do 4,5-diidroisoxazol além dos modelos com o substituinte CH₃ na posição 4 do ciclo (**2k**) e aquele dissubstituído nas

posições 3 e 4 do ciclo (**2l**) apresentaram o dobro de atividade em relação ao modelo não substituído com valores de CIM = 0,312 mg/mL.

Além disso, o composto mais ativo contra *C. albicans* foi o modelo **2h** com o substituinte 3-bromometil, com valor de CIM = 0,156 mg/mL, idêntico ao valor do padrão fluconazol.

Portanto, é possível dizer que a substituição do modelo 5-triclorometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazol com metil ou etil na posição 3 diminui a atividade desse modelo frente ao *C. albicans*, entretanto a substituição com grupos lineares mais volumosos como propil, butil e 2-feniletil mantém a atividade igual àquela do modelo não substituído. Porém a ramificação da cadeia alquílica na posição 3, a substituição com fenila na posição 3, a substituição com metila na posição 4 e a dissubstituição nas posições 3 e 4 com a alquila cíclica causam o aumento na atividade, diminuindo pela metade o valor da CIM (a metade da atividade do fluconazol). Entretanto, o modelo mais ativo contra *C. albicans* foi o **2h**, substituído na posição 3 do 4,5-diidroisoxazol com o volumoso bromometil.

Tabela 8 - Valores de CIM e CFM contra *C. tropicalis* para os compostos **2a-o** testados.

Composto	R ¹	R ²	CIM	CFM
			(mg/mL)	
2a	H	H	0,625	1,25
2b	Me	H	1,25	--
2c	Et	H	1,25	--
2d	<i>n</i> -Pr	H	0,625	1,25
2e	<i>iso</i> -Pr	H	0,625	--
2f	<i>n</i> -Bu	H	0,312	1,25
2g	<i>terc</i> -Bu	H	0,625	--
2h	CH ₂ Br	H	0,312	1,25
2i	CHBr ₂	H	n.t.	n.t.
2j	Ph	H	0,312	--
2k	H	Me	0,625	--
2l	<i>ciclo</i> - (CH ₂) ₄ -		0,625	1,25
2m	<i>ciclo</i> -Pr	H	0,625	--
2n	CH(CH ₃)SCH ₃	H	0,625	--
2o	C ₂ H ₄ Ph	H	0,312	--
Padrão	Fluconazol		0,078	--

CIM = concentração inibitória mínima, CFM = concentração fungicida mínima, -- = sem ação, n.t. = não testado.

Na Tabela 8 que mostra os resultados obtidos nos testes de avaliação da atividade antifúngica da série de 5-triclorometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazóis contra a levedura *C. tropicalis* é possível observar que os compostos mais ativos apresentaram atividade 4 vezes menor do que o padrão fluconazol, eles foram os modelos **2f**, **2h**, **2j** e **2o**, todos com valor de CIM = 0,312 mg/mL. A relação entre estrutura molecular e atividade antimicrobiana nestes testes também é de difícil racionalização, tanto o modelo não substituído **2a** e os modelos 3-alkil substituídos **2d**, **2e**, **2g** e **2m** apresentaram valores equivalentes de atividade com CIM = 0,625 mg/mL, atividade antifúngica contra *C. tropicalis* 8 vezes menor do que o padrão fluconazol. Os modelos **2b** e **2c** substituídos na posição 3 do heterociclo,

respectivamente, com CH₃ e CH₂CH₃ são ainda menos ativos, demonstraram a metade da atividade do modelo não substituído, valores de CIM = 1,25 mg/mL. A presença do substituinte CH₃ na posição 4 do heterociclo, modelo **2k** e a dissustituição com alquilas nas posições 3 e 4 do heterociclo, modelo **2l** mantém a atividade destes modelos no patamar do padrão não substituído **2a**, CIM = 0,625 mg/mL.

Tabela 9 - Valores de CIM e CFM contra *C. lusitaniae* para os compostos **2a-o** testados.

Composto	R ¹	R ²	CIM	CFM
			(mg/mL)	
2a	H	H	0,625	1,25
2b	Me	H	--	--
2c	Et	H	1,25	--
2d	<i>n</i> -Pr	H	0,625	1,25
2e	<i>iso</i> -Pr	H	0,312	1,25
2f	<i>n</i> -Bu	H	0,156	0,625
2g	<i>terc</i> -Bu	H	0,312	1,25
2h	CH ₂ Br	H	0,312	0,625
2i	CHBr ₂	H	n.t.	n.t.
2j	Ph	H	0,312	1,25
2k	H	Me	0,625	1,25
2l	<i>ciclo</i> - (CH ₂) ₄ -		0,625	1,25
2m	<i>ciclo</i> -Pr	H	0,625	1,25
2n	CH(CH ₃)SCH ₃	H	0,625	--
2o	C ₂ H ₄ Ph	H	0,312	1,25
Padrão	Fluconazol		0,078	--

CIM = concentração inibitória mínima, CFM = concentração fungicida mínima, -- = sem ação, n.t. = não testado.

Na Tabela 9, que mostra os resultados obtidos nos testes de avaliação da atividade antifúngica da série de 5-triclorometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazóis contra a levedura *C. lusitaniae* é possível observar que o modelo mais ativo possui 2 vezes menos atividade do que o padrão fluconazol, ele foi o modelo **2f** com valor de CIM = 0,156 mg/mL. Nestes testes também de difícil racionalização, pois não são percebidas correlações imediatas entre estrutura e atividade, o modelo não substituído foi ativo, porém com atividade 8 vezes menor do que o padrão fluconazol, a substituição da posição 3 do 4,5-diidroisoxazol com a metila tornou o modelo inativo, entretanto a substituição da posição 3 do heterociclo com etila tornou o modelo novamente ativo, embora com a metade da atividade do modelo não substituído **2a**. Continuando a análise da série homóloga, partindo do modelo **2c** com a posição 3 do 4,5-diidroisoxazol substituída com a etila CIM = 1,25 mg/mL, passando pelo **2d** com R¹= *n*-Pr CIM = 0,625 mg/mL e chegando ao modelo **2f** R¹= *n*-Bu CIM = 0,156 mg/mL é possível afirmar que houve progressão exponencial da atividade para cada carbono adicionado à cadeia alquílica do substituinte 3. Comparando os modelos **2d**, **2e** e **2m** observa-se que ocorreu aumento de 2 vezes na atividade antimicrobiana com a ramificação do substituinte, modelo **2d** com R¹= *n*-Pr CIM = 0,625 mg/mL e modelo **2e** com R¹= *i*-Pr CIM = 0,312 mg/mL, a ciclização da cadeia no modelo **2m** R¹= *ciclo*-Pr manteve o mesmo padrão de atividade do substituinte linear. Contudo, na comparação dos modelos **2f** R¹= *n*-Bu CIM = 0,156 mg/mL e **2g** R¹= *t*-Bu CIM = 0,312 mg/mL observa-se a redução da atividade pela metade com a ramificação da cadeia. Porém os dois modelos com substituintes alquílicos ramificados, **2e** e **2g** mantêm o mesmo padrão de atividade. Esse mesmo padrão de atividade se repete para os modelos com o substituinte 3-bromometil- (**2h**), com o substituinte 3-fenil- (**2j**) e com o substituinte 3-(2-feniletil)- (**2o**), todos apresentaram o mesmo valor de CIM = 0,312 mg/mL.

Tabela 10 - Valores de CIM e CFM contra *C. neoformans* A para os compostos **2a-o** testados.

Composto	R ¹	R ²	CIM	CFM
			(mg/mL)	
2a	H	H	0,312	0,625
2b	Me	H	0,625	1,25
2c	Et	H	1,25	--
2d	<i>n</i> -Pr	H	0,312	0,625
2e	<i>iso</i> -Pr	H	0,312	0,625
2f	<i>n</i> -Bu	H	0,039	0,312
2g	<i>terc</i> -Bu	H	0,039	0,312
2h	CH ₂ Br	H	0,078	0,312
2i	CHBr ₂	H	n.t.	n.t.
2j	Ph	H	0,078	0,312
2k	H	Me	0,156	0,625
2l	<i>ciclo</i> - (CH ₂) ₄ -		0,156	1,25
2m	<i>ciclo</i> -Pr	H	0,312	0,625
2n	CH(CH ₃)SCH ₃	H	0,156	1,25
2o	C ₂ H ₄ Ph	H	0,039	1,25
Padrão	Fluconazol		0,019	--

CIM = concentração inibitória mínima, CFM = concentração fungicida mínima, -- = sem ação, n.t. = não testado.

Na Tabela 10, que mostra os resultados obtidos nos testes de avaliação da atividade antifúngica da série de 5-triclorometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazóis contra a levedura *C. neoformans* A é possível observar que esse é um microorganismo mais sensível à ação antifúngica tanto do padrão fluconazol CIM = 0,019 mg/mL quanto dos modelos isoxazolínicos testados.

O modelo não substituído **2a** apresentou atividade antimicrobiana 16 vezes menor do que aquela do padrão, com CIM = 0,312 mg/mL. A substituição na posição 3 do 4,5-diidroisoxazol com CH₃ diminui ainda mais a ação do modelo isoxazolínicos, o modelo **2b** apresentou a metade da atividade do modelo **2a**. A substituição da posição 3 do 4,5-diidroisoxazol com CH₂CH₃ novamente causou a diminuição da atividade, o modelo apresentou valor de CIM = 1,25 mg/mL significando que possui

metade da atividade do modelo **2b** e $\frac{1}{4}$ da atividade do modelo não substituído **2a**. Entretanto, os modelos com substituintes propil na posição 3 do heterociclo **2d** $R^1 = n\text{-Pr}$, **2e** $R^1 = i\text{-Pr}$ e **2m** $R^1 = \text{ciclo-Pr}$ apresentaram o mesmo padrão de atividade com CIM = 0,312 mg/mL, atividade igual aquela do modelo não substituído **2a**. Já a substituição da posição da posição 3 do 4,5-diidroisoxazol com alquilas de quatro carbonos, **2f** $R^1 = n\text{-Bu}$ e **2g** $R^1 = t\text{-Bu}$ ou com o substituinte 2-feniletil- aumentou a atividade em 8 vezes em relação ao modelo não substituído, CIM = 0,039 mg/mL. Esses modelos demonstraram possuir a metade da atividade do padrão fluconazol contra *C. neoformans* A. A presença do substituinte 3-bromometil- (**2h**) e 3-fenil- (**2j**) diminuiu a atividade antimicrobiana dos modelos 4,5-diidroisoxazóis pela metade em relação aos modelos mais ativos **2f** e **2g**, porém foram 4 vezes mais ativos do que o modelo não substituído. O modelo 4,5-diidroisoxazol com a metila na posição 4 do heterociclo (**2k**), aquele dissustituído (**2l**) e o modelo com o substituinte (tiometil)etil (**2n**) demonstraram boa atividade antifúngica contra *C. neoformans* A, com CIM = 0,156 mg/mL eles possuem $\frac{1}{4}$ da atividade dos modelos mais ativos porém o dobro da atividade do modelo não substituído.

Tabela 11 - Valores de CIM e CFM contra *C. neoformans gattii* B para os compostos **2a-o** testados.

Composto	R ¹	R ²	CIM	CFM
			(mg/mL)	
2a	H	H	0,312	0,625
2b	Me	H	0,312	0,625
2c	Et	H	0,625	1,25
2d	<i>n</i> -Pr	H	0,312	0,625
2e	<i>iso</i> -Pr	H	0,312	0,625
2f	<i>n</i> -Bu	H	0,312	0,625
2g	<i>terc</i> -Bu	H	0,312	0,625
2h	CH ₂ Br	H	0,078	0,312
2i	CHBr ₂	H	n.t.	n.t.
2j	Ph	H	0,312	0,625
2k	H	Me	0,312	1,25
2l	<i>ciclo</i> - (CH ₂) ₄ -		0,312	1,25
2m	<i>ciclo</i> -Pr	H	0,312	1,25
2n	CH (CH ₃)SCH ₃	H	0,156	--
2o	C ₂ H ₄ Ph	H	0,312	1,25
Padrão	Fluconazol		0,019	--

CIM = concentração inibitória mínima, CFM = concentração fungicida mínima, -- = sem ação, n.t. = não testado.

Na Tabela 11 com os resultados dos testes de atividade antifúngica da série de compostos 5-triclorometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazoles contra a levedura *C. neoformans gattii* B, pode-se observar que todos os compostos testados apresentaram ação, entretanto, na maioria dos casos, as alterações estruturais dos substituintes nos modelos não causaram variação na atividade quando comparados ao modelo não substituído (**2a**) que apresentou CIM = 0,312 mg/mL, portanto com atividade 16 vezes menor do que o padrão fluconazol. Somente os compostos 4,5-diidroisoxazóis com os substituintes 3-etil-(**2c**), 3-bromometil (**2h**) ou 3-(1-tiometil)etil (**2n**) mostraram variação em relação ao modelo não substituído. A presença do 3-etil-substituinte reduziu a atividade do modelo à metade daquela do modelo **2a**, apresentou CIM = 0,625 mg/mL. O substituinte 3-(1-tiometil)etil- causou melhora na

atividade reduzindo o valor de CIM para 0,156 mg/mL, demonstrando o dobro de atividade em relação a maioria do 4,5-diidroisoxazóis testados. Porém o modelo mais ativo foi o **2h** com o substituinte 3-bromometil, o qual apresentou CIM = 0,078 mg/mL, atividade 4 vezes maior do que os outros modelos e somente 4 vezes menor do que aquela do padrão fluconazol.

Tabela 12 - Valores de CIM e CFM contra *C. neoformans gattii* C para os compostos **2a-o** testados.

Composto	R ¹	R ²	CIM	CFM
			(mg/mL)	
2a	H	H	0,156	0,312
2b	Me	H	0,039	0,078
2c	Et	H	0,039	0,625
2d	<i>n</i> -Pr	H	0,039	0,312
2e	<i>iso</i> -Pr	H	0,039	0,156
2f	<i>n</i> -Bu	H	0,019	0,039
2g	<i>terc</i> -Bu	H	0,039	0,078
2h	CH ₂ Br	H	0,039	0,312
2i	CHBr ₂	H	n.t.	n.t.
2j	Ph	H	0,039	0,156
2k	H	Me	0,039	0,312
2l	<i>ciclo</i> - (CH ₂) ₄ -		0,039	1,25
2m	<i>ciclo</i> -Pr	H	0,078	0,156
2n	CH(CH ₃)SCH ₃	H	0,156	0,312
2o	C ₂ H ₄ Ph	H	0,019	0,039
Padrão	Fluconazol		0,019	--

CIM = concentração inibitória mínima, CFM = concentração fungicida mínima, -- = sem ação, n.t. = não testado.

Os resultados dos testes de atividade antimicrobiana, apresentados na Tabela 12, demonstram que a levedura *C. neoformans gattii* C foi o microrganismo testado mais susceptível à atividade antimicrobiana da série de 5-triclorometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazoles **2a-o**, sendo que todos os compostos apresentaram baixos valores

de CIM. Os modelos não substituído **2a** e **2n** com o substituinte 3-(1-tiometil)etil- foram os menos ativos com valores de CIM = 0,156 mg/mL, demonstrando ser 8 vezes menos ativos do que o padrão fluconazol (CIM = 0,019 mg/mL). Duas vezes mais ativo do que esses foi o modelo **2m** com valor de CIM = 0,078 mg/mL. Depois temos a maioria dos modelos testados, **2b-e** e **2g-l**, todos com o mesmo valor de CIM = 0,039 mg/mL e somente duas vezes menos ativos do que o padrão. O resultado mais promissor foi com os modelos **2f** e **2o** que demonstraram atividade antifúngica contra *C. neoformans gattii* C igual aquela do padrão fluconazol, CIM = 0,019 mg/mL.

Tabela 13 - Valores de CIM e CFM contra *C. neoformans* D para os compostos **2a-o** testados.

Composto	R ¹	R ²	CIM (mg/mL)	CFM
2a	H	H	0,312	0,625
2b	Me	H	0,625	1,25
2c	Et	H	0,625	1,25
2d	<i>n</i> -Pr	H	0,312	0,625
2e	<i>iso</i> -Pr	H	0,312	0,625
2f	<i>n</i> -Bu	H	0,312	0,625
2g	<i>terc</i> -Bu	H	0,312	0,625
2h	CH ₂ Br	H	0,039	0,312
2i	CHBr ₂	H	n.t.	n.t.
2j	Ph	H	0,312	0,625
2k	H	Me	0,312	0,625
2l	<i>ciclo</i> - (CH ₂) ₄ -		0,156	1,25
2m	<i>ciclo</i> -Pr	H	0,312	--
2n	CH ₂ (CH ₃)SCH ₃	H	0,625	--
2o	C ₂ H ₄ Ph	H	0,312	1,25
Padrão	Fluconazol		0,019	--

CIM = concentração inibitória mínima, CFM = concentração fungicida mínima, -- = sem ação, n.t. = não testado.

Finalmente, na Tabela 13 estão apresentados os resultados dos testes de atividade antifúngica da série de 4,5-diidroisoxazóis **2a-o** contra a levedura *C. neoformans* D. Neste caso os modelos testados podem ser divididos em quatro grupos. O modelo não substituído **2a**, assim como para a maioria dos modelos 3-substituídos **2d-g**, **2j**, **2m** e **2o**, e o modelo com o substituinte na posição 4 do isoxazol, **2k**, apresentaram valor de CIM = 0,312 mg/mL, demonstrando atividade 16 vezes menor do que aquela do padrão fluconazol. A substituição com 3-metil- (**2b**), 3-etil-(**2c**) ou 3-(1-tiometil)etil- (**2n**) diminuiu ainda mais a atividade do modelo 5-triclorometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazol, esses compostos apresentaram valores de CIM = 0,625 mg/mL, portanto com metade da atividade dos modelos anteriores. O modelo dissustituído **2l** nesse caso apresentou boa atividade sendo duas vezes mais ativo do que o modelo não substituído, CIM = 0,156 mg/mL. Porém, o modelo mais ativo foi o composto **2h**, para o qual foi medida CIM = 0,039 mg/mL, demonstrando atividade somente duas vezes menor do que o padrão e 8 vezes maior do que o modelo não substituído **2a**.

4.2.2 Resultados obtidos para a série de ácidos isoxazol-5-carboxílicos **3**.Tabela 14 - Valores de CIM e CBM contra *S. aureus* para os compostos **3** testados.

Composto	R ¹	R ²	CIM	CBM
(mg/mL)				
3b	Me	H	0,625	1,25
3k	H	Me	0,625	1,25
3l	ciclo – (CH ₂) ₄		0,625	1,25
Padrão	Ampicilina		0,039	--

Tabela 15 - Valores de CIM e CBM contra *E. coli* para os compostos **3** testados.

Composto	R ¹	R ²	CIM	CBM
(mg/mL)				
3b	Me	H	0,625	1,25
3k	H	Me	0,625	1,25
3l	ciclo – (CH ₂) ₄		0,312	1,25
Padrão	Ampicilina		0,039	--

Tabela 16- Valores de CIM e CBM contra *P. aeruginosa* para os compostos **3** testados.

Composto	R ¹	R ²	CIM	CBM
(mg/mL)				
3b	Me	H	0,625	1,25
3k	H	Me	0,625	1,25
3l	ciclo – (CH ₂) ₄		0,625	1,25
Padrão	Ampicilina		0,156	--

CIM = concentração inibitória mínima, CBM = concentração bactericida mínima, n.t. = não testado.

Nas Tabelas 14, 15 e 16 são apresentados os resultados obtidos na avaliação antibacteriana dos modelos ácidos isoxazol-5-carboxílicos, foram testados os compostos **3b**, **3k** e **3l** contra as bactérias teste *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. De maneira geral, a comparação preliminar dos resultados mostrados nas Tabela 4,

5 e 6 para os testes da série de 5-triclorometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazóis **2**, contra o mesmo conjunto de bactérias, com estes obtidos com o conjunto de ácidos **3** demonstra que a alteração da estrutura do modelo isoxazolínico causou pouca variação na atividade biológica dos modelos. Assim, quando comparamos a atividade antibacteriana contra *S. aureus* do modelo **2b** CIM = 0,625 mg/mL com a aquela do modelo **3b**, CIM = 0,625 mg/mL, observa-se o mesmo padrão de atividade. Entretanto, para os modelos **3k** e **3l** a variação do modelo estrutural do isoxazol da forma 5-triclorometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazol para o ácido isoxazol-5-carboxílico com o mesmo padrão de substituição nas posições 3 e 4 do ciclo isoxazolínico melhorou a *performance* da atividade antibacteriana reduzindo a CIM à metade, **2k** e **2l** CIM = 1,25 mg/mL e **3k** e **3l** CIM = 0,625 mg/mL. Portanto, esses últimos modelos isoxazolínicos aromáticos foram duas vezes mais ativos do que os respectivos modelos 4,5-diidroisoxazóis.

Também nos testes realizados para avaliação da atividade antibacteriana contra *E. coli* dos modelos ácidos isoxazol-5-carboxílicos é possível a comparação com os respectivos 4,5-diidroisoxazóis, considerando o mesmo padrão de substituição nas posições 3 e 4 do ciclo isoxazolínico. Nesse caso para os modelos **3b** e **3k** não houve nenhuma variação da atividade com a mudança estrutural do isoxazol, os modelos ácidos continuaram com a mesma atividade dos 4,5-diidroisoxazóis, com CIM = 0,625 mg/mL. Porém, para o modelo dissubstituído com a alquila cíclica nas posições 3 e 4 do ciclo a variação estrutural de 4,5-diidroisoxazol para ácido isoxazol-5-carboxílico melhorou a atividade anti *E.coli*, aumentando-a em 4 vezes. O modelo **2l** apresentou CIM = 1,25 mg/mL, enquanto o ácido **3l** apresentou CIM = 0,312 mg/mL.

A bactéria *P. aeruginosa* se mostrou menos sensível aos agentes químicos 4,5-diidroisoxazóis, naqueles testes também foram observadas poucas variações na atividade dos modelos em função dos diferentes substituintes ou padrões de substituição do ciclo isoxazolínico. Do mesmo modo, nesses testes de atividade dos modelos ácidos **3** contra *P. aeruginosa*, os três modelos apresentaram o mesmo padrão de atividade, assim como mostrado anteriormente para os modelos **2**. Além disso a mudança do modelo 4,5-diidroisoxazol para o modelo ácido isoxazol-5-carboxílico também não variou a capacidade antibacteriana contra *P. aeruginosa* todos, **2** ou **3** apresentaram o mesmo valor de CIM = 0,625 mg/mL, todos 4 vezes menos ativos do que o padrão ampicilina.

4.2.3 Resultados Obtidos para a Série de 5-trialometil-3-aril-isoxazóis **4** e **5**.Tabela 17 - Valores de CIM e CBM contra *S. aureus* para os compostos **4** e **5** testados.

Composto	X	R	CIM	CBM
			(mg/mL)	
4j	Cl	H	1,25	--
4p	Cl	CH ₃	0,312	0,625
4q	Cl	F	0,625	1,25
4r	Cl	Cl	0,156	--
4s	Cl	Br	0,625	1,25
4t	Cl	NO ₂	0,312	1,25
5j	F	H	1,25	--
5p	F	CH ₃	1,25	--
5q	F	F	1,25	--
5r	F	Cl	0,625	--
5s	F	Br	0,312	0,625
5t	F	NO ₂	0,625	1,25
Padrão	Ampicilina		0,039	--

CIM = concentração inibitória mínima, CBM = concentração bactericida mínima, -- = sem ação, n.t. = não testado.

A Tabela 17 apresenta os resultados dos testes de avaliação da atividade antibacteriana da série de compostos 5-trialometil-3-aril-isoxazóis **4** e **5** contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus*. Essa série de compostos permite a comparação do efeito do grupo substituinte na posição 4 do grupamento 3-aril- do heterociclo dentro das séries de isoxazóis triclorometil- e trifluorometil-substituídos, além da comparação dos efeitos de cada um desses últimos para um mesmo substituinte 3-aril no ciclo isoxazol.

De modo geral a série de modelos triclorometil-substituídos foi mais ativa, apresentando o modelo mais ativo na série contra *S. aureus*, o composto **4r**, com o substituinte 4-clorofenil- na posição 3 do isoxazol. Esse modelo foi somente 4 vezes menos ativo que o padrão ampicilina, apresentando CIM = 0,156 mg/mL. Na série dos derivados triclorometil-substituídos ainda é possível destacar os compostos **4p** e

4t, com os substituintes 4-metilfenil- e 4-nitrofenil- na posição 3 do isoxazol, respectivamente, com CIM = 0,312 mg/mL, demonstrando a metade da atividade do modelo mais ativo **4r**. Os compostos isoxazóis **4q** com o substituinte 3-(4-fluorfenil)- e **4s** com o substituinte 3-(4-bromofenil)- somente $\frac{1}{4}$ da atividade do modelo mais ativo com CIM = 0,625 mg/mL. E, finalmente, o modelo 5-triclorometil-3-fenil-isoxazol foi o menos ativo da série contra *S. aureus* com CIM = 1,25 mg/mL, sendo 8 vezes menos ativo do que **4r** e 32 vezes menos ativo do que o padrão. Observou-se ainda que apenas dois dos compostos 5-triclorometil substituídos não apresentaram CBM nas concentrações testadas.

Na série de isoxazóis trifluormetil-substituídos o modelo mais ativo foi o composto **5s**, 3-(4-bromofenil)-5-trifluormetil-isoxazol, com CIM = 0,312 mg/mL, a metade da atividade do modelo triclorometil-substituído mais ativo. Porém com o dobro da atividade do seu análogo **4s**. Já para os modelos **5r**, 3-(4-clorofenil)-5-trifluormetil-isoxazol e **5t**, 5-trifluormetil-3-(4-nitrofenil)-isoxazol o valor de CIM = 0,625mg/mL indica metade da atividade do modelo **5s**. E, também, quando comparados com os análogos triclorados observa-se redução de atividade, o modelo **5r** é 4 vezes menos ativo do que **4r** e o modelo **5t** é duas vezes menos ativo do que **4t**. Apenas dois dos compostos 5-trifluormetil substituídos apresentaram CBM nas concentrações testadas.

Essa mesma redução de atividade é observada quando o modelo **5q**, 3-(4-fluorfenil)-5-trifluormetil-isoxazol com CIM = 1,25 mg/mL e **5p**, 5-trifluormetil-3-(4-metilfenil)-isoxazol com CIM = 1,25 mg/mL são comparados aos seus análogos triclorometil-substituídos. Assim, **5p** possui somente $\frac{1}{4}$ da atividade do modelo **4p**, e **5q** possui somente a metade da atividade do modelo **4q**.

Outra observação importante foi que os modelos com a fenila não substituída, tanto triclorometil-substituído **4j** quanto trifluormetil-substituído **5j** demonstraram o mesmo grau de atividade contra *S. aureus* com CIM = 1,25 mg/mL.

Considerando, ainda, que os compostos **4p** e **5s** apresentaram valores de CIM e CBM idênticos, ou seja, a mesma atividade, é possível dizer que esses modelos são bioisósteros* em relação a atividade antibacteriana contra *S. aureus*.

Tabela 18 - Valores de CIM e CBM contra *E. coli* para os compostos **4** e **5** testados.

Composto	X	R	CIM	CBM
			(mg/mL)	
4j	Cl	H	0,625	--
4p	Cl	CH ₃	0,625	1,25
4q	Cl	F	0,625	--
4r	Cl	Cl	0,625	--
4s	Cl	Br	0,625	1,25
4t	Cl	NO ₂	0,625	1,25
5j	F	H	1,25	--
5p	F	CH ₃	1,25	--
5q	F	F	--	--
5r	F	Cl	0,625	1,25
5s	F	Br	1,25	--
5t	F	NO ₂	0,625	1,25
Padrão	Ampicilina		0,039	--

CIM = concentração inibitória mínima, CBM = concentração bactericida mínima, -- = sem ação, n.t. = não testado.

A Tabela 18 apresenta os resultados dos testes de avaliação da atividade antimicrobiana da série de compostos 5-trialometil-3-aril-isoxazóis **4** e **5** contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*. Todos os compostos testados apresentaram atividade, porém, os valores de CIM e CBM demonstraram atividades no mínimo 16 vezes menor do que o padrão ampicilina.

Na série de 5-triclorometil-isoxazóis **4** não houve variação do grau de atividade em função da variação do substituinte 3-fenil-, todos os modelos apresentaram a mesma CIM = 0,625 mg/mL, demonstrando 16 vezes menor atividade do que o padrão. Já na série de 5-trifluormetil-isoxazóis **5**, foi possível observar variações no grau da atividade antibacteriana contra *E. coli* em função da variação do substituinte do grupo 3-fenil- do isoxazol. Os compostos **5j**, **5p** e **5s** apresentaram atividade contra *E. coli* ainda menor do que os análogos **4**, com CIM = 1,25 mg/mL, portanto a variação estrutural do modelo 5-triclorometil-isoxazol para 5-trifluorometil-isoxazol diminuiu a atividade. Além disso, o modelo **5q** não foi ativo, em nenhuma das concentrações testadas. Os modelos **5r** e **5t** demonstraram o mesmo

grau de atividade contra *E. coli* que os modelos **4**, com valores de CIM = 0,625 mg/mL.

Deste modo, os modelos **4p**, **4s**, **4t**, **5r**, **5t** apresentaram valores de CIM e CBM idênticos, ou seja, a mesma atividade, sendo possível dizer que estes modelos são bioisómeros em relação a atividade antibacteriana contra *E. coli*.

Tabela 19 - Valores de CIM e CBM contra *P. aeruginosa* para os compostos **4** e **5** testados.

Composto	X	R	CIM (mg/mL)	CBM
4j	Cl	H	0,625	1,25
4p	Cl	CH ₃	0,156	1,25
4q	Cl	F	0,625	1,25
4r	Cl	Cl	0,625	--
4s	Cl	Br	0,312	1,25
4t	Cl	NO ₂	0,312	1,25
5j	F	H	0,625	--
5p	F	CH ₃	0,625	1,25
5q	F	F	0,625	1,25
5r	F	Cl	0,625	1,25
5s	F	Br	0,625	--
5t	F	NO ₂	0,625	1,25
Padrão	Ampicilina		0,156	--

CIM = concentração inibitória mínima, CBM = concentração bactericida mínima, -- = sem ação, n.t. = não testado.

A Tabela 19 apresenta os resultados dos testes de avaliação da atividade antibacteriana da série de compostos 5-trialometil-3-aryl-isoxazóis **4** e **5** contra a bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa*. Todos os compostos testados apresentaram atividade, e novamente pode-se observar que os compostos da série dos 3-aryl-5-triclorometil-isoxazóis **4** foram mais ativos do que os análogos da série de 3-aryl-5-trifluormetil-isoxazóis. Na série de modelos **4**, o modelo sem substituinte na fenila **4j**, assim como os modelos **4q** 3-(4-fluorfenil)-5-triclorometil-isoxazol e **4r** 3-(4-

clorofenil)-5-triclorometil-isoxazol apresentaram o mesmo padrão de atividade com CIM = 0,625 mg/mL $\frac{1}{4}$ da atividade do padrão. Entretanto, os modelos com os substituintes 4-bromofenil- (**4s**) e 4-nitrofenil- (**4t**) apresentaram o dobro da atividade do modelo com a fenila não substituída, CIM = 0,312 mg/mL, e ainda mais, o modelo com o substituinte 4-metilfenil- **4p** apresentou 4 vezes mais atividade do que o modelo com a fenila não substituída e o mesmo grau de atividade do padrão ampicilina, CIM = 0,156.

Os modelos trifluormetil-substituídos apresentaram todos o mesmo grau de atividade sem variar em função da variação do substituinte da posição 4 da fenila na posição 3 do isoxazol, todos apresentaram valor de CIM = 0,625 mg/mL, demonstrando $\frac{1}{4}$ da atividade do padrão ampicilina.

Também foi observado, que contra a *P. aeruginosa* aconteceu o bioisosterismo entre **4j**, **4q**, **5p**, **5r**, **5q** e **5t**.

Tabela 20 - Valores de CIM e CFM contra *C. albicans* para os compostos **4** e **5** testados.

Composto	X	R	CIM	CFM
			(mg/mL)	
4j	Cl	H	0,625	--
4p	Cl	CH ₃	0,625	--
4q	Cl	F	0,625	--
4r	Cl	Cl	1,25	--
4s	Cl	Br	0,156	--
4t	Cl	NO ₂	0,625	--
5j	F	H	0,312	--
5p	F	CH ₃	0,312	1,25
5q	F	F	0,156	--
5r	F	Cl	0,156	1,25
5s	F	Br	0,312	0,625
5t	F	NO ₂	0,156	--
Padrão	Fluconazol		0,156	--

CIM = concentração inibitória mínima, CFM = concentração fungicida mínima, -- = sem ação, n.t. = não testado.

A Tabela 20 apresenta os resultados dos testes de avaliação da atividade antifúngica da série de compostos 5-trialometil-3-aryl-isoxazóis **4** e **5** contra a levedura *C. albicans*. Todos os compostos testados apresentaram atividade contra *C. albicans*, observando-se que a série de modelos 5-trifluormetil-isoxazol **5** apresentou maior número de compostos com alta atividade e também apresentou maiores variações no grau da atividade em função dos substituintes da fenila na posição 3 do isoxazol.

Dentro da série de modelos 5-triclorometil-isoxazóis o composto **4r**, 3-(4-clorofenil)-5-triclorometil-isoxazol foi o que apresentou a menor atividade. Com valor de CIM = 1,25 mg/mL, demonstrou ser 8 vezes menos ativo do que o padrão fluconazol. Já os modelos **4j**, **4p**, **4q** e **4t** apresentaram duas vezes mais atividade do que **4r** e, portanto, 4 vezes menor atividade do que o padrão, CIM = 0,625 mg/mL. O destaque da série foi o modelo **4s** 3-(4-bromofenil)-5-triclorometil-isoxazol com atividade igual aquela do padrão, CIM = 0,156 mg/mL. Nenhum dos compostos 5-triclorometil substituídos apresentou CFM nas concentrações testadas.

A série dos modelos 5-trifluormetil-isoxazóis ficou dividida em dois grupos, os modelos **5j**, **5p** e **5s** demonstraram ser duas vezes menos ativos do que o padrão com CIM = 0,312 mg/mL. Quando comparados aos seus análogos triclorometil-substituídos os compostos **5j** e **5p** tiveram melhoria da atividade, eles foram duas vezes mais ativos do que **4j** e **4p**. Porém, quando foram comparados **4s** e **5s** observou-se que o derivado triclorometil-substituído é duas vezes mais ativo do que o análogo trifluormetil-substituído.

O segundo grupo dos modelos trifluormetil-substituídos foi formado pelos modelos com mesmo grau de atividade do padrão fluconazol contra *C. albicans*, **5q**, **5r** e **5t** apresentaram CIM = 0,156 mg/mL, todos muito mais ativos do que os seus respectivos análogos triclorometil-substituídos, porém, dentre estes, o composto **5r** foi o único que apresentou CFM nas concentrações testadas, portanto se mostrando mais ativo.

Tabela 21 - Valores de CIM e CFM contra *C. tropicalis* para os compostos **4** e **5** testados.

Composto	X	R	CIM (mg/mL)	CFM
4j	Cl	H	0,312	--
4p	Cl	CH ₃	0,625	--
4q	Cl	F	0,625	1,25
4r	Cl	Cl	0,312	--
4s	Cl	Br	0,625	--
4t	Cl	NO ₂	0,625	--
5j	F	H	0,625	--
5p	F	CH ₃	0,625	--
5q	F	F	0,625	--
5r	F	Cl	0,312	1,25
5s	F	Br	0,625	--
5t	F	NO ₂	0,625	--
Padrão	Fluconazol		0,078	--

CIM = concentração inibitória mínima, CFM = concentração fungicida mínima, -- = sem ação, n.t. = não testado.

Na Tabela 21 observa-se a os resultados dos testes de avaliação da atividade antifúngica da série de modelos 5-trialometil-3-aryl-isoxazóis **4** e **5** contra a levedura *C. tropicalis*. Toda a série de modelos 5-trialometil-isoxazóis **4** e **5** apresentaram valores de CIM muito altos em relação ao padrão e apenas dois modelos apresentaram CFM nas concentrações testadas.

Na série dos modelos 5-triclorometil-isoxazóis, não houve melhora de atividade em relação ao modelo **4j** R = H CIM = 0,312, com nenhuma variação no substituinte na posição 4 da fenila no isoxazol. Somente o composto **4q** apresentou CFM nas concentrações testadas.

Quanto a variação do substituinte na posição 4 da fenila no isoxazol nos modelos 5-trifluórometil isoxazóis, houve melhora na atividade em relação ao modelo **5j** R=H CIM = 0,625 somente no composto **5r** R = Cl, com CIM = 0,312. Ainda, apenas o composto **5r** apresentou CFM nas concentrações testadas.

Tabela 22 - Valores de CIM e CFM contra *C. lusitaniae* para os compostos **4** e **5** testados.

Composto	X	R	CIM (mg/mL)	CFM
4j	Cl	H	0,625	--
4p	Cl	CH ₃	0,156	--
4q	Cl	F	0,312	1,25
4r	Cl	Cl	0,312	--
4s	Cl	Br	0,625	--
4t	Cl	NO ₂	0,625	--
5j	F	H	0,625	--
5p	F	CH ₃	0,625	1,25
5q	F	F	0,625	1,25
5r	F	Cl	0,039	1,25
5s	F	Br	0,625	--
5t	F	NO ₂	0,312	1,25
Padrão	Fluconazol		0,078	--

CIM = concentração inibitória mínima, CFM = concentração fungicida mínima, -- = sem ação, n.t. = não testado.

A Tabela 22 demonstra que alguns dos modelos das séries de compostos 5-trialometil-3-aryl-isoxazóis **4** e **5** testados apresentaram uma excelente atividade com a levedura *C. lusitanea*. O modelo **5r** foi o mais promissor da série de modelos 5-triflúormetil isoxazóis, apresentando uma atividade duas vezes maior que a do padrão fluconazol, com CIM = 0,039mg/mL.

Ainda, entre a série de modelos 5-triflúormetil isoxazóis, também houve melhora da atividade em relação ao composto **5j** R = H CIM = 0,625mg/mL, com a substituição na posição 4 da fenila no isoxazol por NO₂, sendo que o composto **5t** apresentou CIM = 0,312mg/mL. Apenas dois dos modelos 5-triflúormetil isoxazóis não apresentaram CFM contra *C. lusitaniae* nas concentrações testadas.

No caso dos modelos 5-triclorometil isoxazóis, houve aumento na atividade contra *C. lusitaniae* em relação ao composto **4j** com a substituição na posição 4 da fenila no isoxazol por F, Cl, e CH₃, sendo que o composto **4p** R = CH₃ apresentou metade da atividade do fluconazol, com CIM de 0,156mg/mL.

Tabela 23 - Valores de CIM e CFM contra *C. neoformans* A para os compostos **4** e **5** testados.

Composto	X	R	CIM (mg/mL)	CFM
4j	Cl	H	0,156	1,25
4p	Cl	CH ₃	0,039	1,25
4q	Cl	F	0,156	1,25
4r	Cl	Cl	0,156	--
4s	Cl	Br	0,156	0,625
4t	Cl	NO ₂	0,039	--
5j	F	H	0,156	1,25
5p	F	CH ₃	0,039	1,25
5q	F	F	0,039	--
5r	F	Cl	0,039	0,625
5s	F	Br	0,039	1,25
5t	F	NO ₂	0,156	0,625
Padrão	Fluconazol		0,019	--

CIM = concentração inibitória mínima, CFM = concentração fungicida mínima, -- = sem ação, n.t. = não testado.

A Tabela 23 mostra valores de CIM que variam de 0,039 a 0,156mg/mL, valores muito próximos do padrão, para todos os modelos das séries de compostos 5-trialometil-3-aril-isoxazóis **4** e **5** testados contra a levedura *C. neoformans* A.

No caso dos modelos com 5-triclorometil isoxazóis, houve aumento na atividade em 4 vezes em relação ao composto **4j** R = H CIM = 0,156mg/mL, com a substituição na posição 4 da fenila no isoxazol por NO₂ (**4t**) e CH₃(**4p**), diminuindo o valor da CIM para 0,039mg/mL, valor apenas duas vezes maior que o padrão.

Na série de modelos 5-triflúormetil isoxazóis, não houve aumento da atividade em relação ao modelo **5j** R = H CIM = 0,156mg/mL, apenas com a substituição na posição 4 da fenila no isoxazol por NO₂. Todos os outros modelos apresentaram CIM = 0,039mg/mL, sendo apenas duas vezes menos ativos que o padrão, sendo que dentre estes, destacou-se o modelo **5r** R = Cl que apresentou o menor valor de CFM.

De modo geral, os modelos substituídos por triflúormetil na posição 5 do isoxazol foram mais ativos contra *C. neoformans* A do que substituídos por triclorometil.

Tabela 24 - Valores de CIM e CFM contra *C. neoformans gattii* B para os compostos **4** e **5** testados.

Composto	X	R	CIM	CFM
			(mg/mL)	
4j	Cl	H	0,156	1,25
4p	Cl	CH ₃	0,039	0,312
4q	Cl	F	0,078	0,625
4r	Cl	Cl	0,156	0,625
4s	Cl	Br	0,156	0,625
4t	Cl	NO ₂	0,039	--
5j	F	H	0,156	1,25
5p	F	CH ₃	0,039	1,25
5q	F	F	0,039	1,25
5r	F	Cl	0,039	0,625
5s	F	Br	0,039	1,25
5t	F	NO ₂	0,156	0,625
Padrão	Fluconazol		0,019	--

CIM = concentração inibitória mínima, CFM = concentração fungicida mínima, -- = sem ação, n.t. = não testado.

Observa-se que todos os modelos das séries de compostos **4** e **5** foram muito ativos contra *C. neoformans gattii* B, uma vez que os valores de CIM apresentados na Tabela 24 variaram de 0,039 a 0,156mg/mL, muito próximos do padrão.

Entre os modelos 5-triflúormetil isoxazóis, o modelo **5j** R = H apresentou CIM = 0,156mg/mL, ocorrendo aumento na atividade com a substituição na posição 4 da fenila no isoxazol por F, uma vez que o modelo **4q** apresentou CIM = 0,078mg/mL e, também, por NO₂ (**4t**) ou CH₃ (**4p**), pois nestes casos a CIM = 0,039mg/mL. Estes valores de CIM demonstram que os modelos **4t** e **4p** apresentaram metade da atividade do padrão. Os modelos **4r** e **4s** apresentaram o mesmo valor de CIM que o

modelo **4j**, porém pode-se considerar que houve uma melhora na atividade, pois os dois modelos apresentaram valores de CFM menores que o modelo **4j**.

Considerando-se os modelos 5-trifluórmethyl isoxazóis, o composto **5j** R = H apresentou CIM = 0,156mg/mL, sendo que ocorreu diminuição da CIM para 0,039mg/mL com a maioria das substituições na posição 4 da fenila no isoxazol, exceto com a substituição por NO₂ (**5t**), porém pode-se dizer que o modelo **5t** apresentou melhora na atividade, pois teve menor CFM que o modelo **5j**. Dentre os compostos com CIM = 0,039mg/mL, o composto **5r** destacou-se por apresentar o menor valor de CFM.

Novamente, de modo geral, os modelos 5-trifluórmethyl isoxazóis apresentaram melhor atividade antifúngica do que os modelos 5-triclorometil isoxazóis.

Dentre todos os modelos das séries **4** e **5**, apenas o composto **4t** não apresentou ação fungicida contra *C. neoformans gattii* B nas concentrações testadas.

Tabela 25 - Valores de CIM e CFM contra *C. neoformans gattii* C para os compostos **4** e **5** testados.

Composto	X	R	CIM	CFM
			(mg/mL)	
4j	Cl	H	0,039	0,312
4p	Cl	CH ₃	0,039	0,312
4q	Cl	F	0,156	0,312
4r	Cl	Cl	0,039	0,078
4s	Cl	Br	0,156	0,312
4t	Cl	NO ₂	0,039	1,25
5j	F	H	0,039	0,625
5p	F	CH ₃	0,039	0,312
5q	F	F	0,039	0,625
5r	F	Cl	0,039	0,078
5s	F	Br	0,039	0,312
5t	F	NO ₂	0,039	0,312
Padrão	Fluconazol		0,019	--

CIM = concentração inibitória mínima, CFM = concentração fungicida mínima, -- = sem ação, n.t. = não testado.

Assim como para a série de modelos **2**, *C. neoformans gattii* C se mostrou o microrganismo testado mais susceptível aos modelos das séries **4** e **5**, uma vez que todos os modelos apresentaram ação fungicida nas concentrações testadas e valores baixos de CIM (Tabela 25). A maioria dos compostos se mostrou apenas duas vezes menos ativos que o padrão.

Considerando os modelos 5-triclorometil isoxazóis, o modelo **4j** R = H apresentou CIM = 0,039mg/mL e CFM = 0,312mg/mL, sendo que a maioria das substituições na posição 4 da fenila no isoxazol não melhoram e, até mesmo, diminuíram a atividade em relação ao modelo **4j**. Apenas o modelo **4r** R = Cl apresentou um aumento na atividade, pois apesar de apresentar a mesma CIM do modelo **4j**, apresentou CFM muito mais baixa, com um valor de 0,078mg/mL.

Para os modelos 5-triflúormetil isoxazóis, observou-se que todos os modelos na série apresentaram a mesma CIM, com um valor de 0,039mg/mL, havendo aumento na atividade em relação ao modelo **5j** R = H somente quando se considera a CFM dos compostos. A maioria das variações na posição 4 da fenila no isoxazol causaram uma diminuição no valor da CFM em relação ao modelo **5j**, com exceção do modelo **5q**. Da mesma forma que com os modelos 5-triclorometil isoxazóis, a melhor substituição foi por Cl, pois o modelo **5r** apresentou CFM = 0,078mg/mL.

Mais uma vez, os modelos 5-triflúormetil isoxazóis, de modo geral, tiveram mais atividade antifúngica do que os modelos 5-triclorometil isoxazóis.

Os modelos **4r** e **5r** destacaram-se dentro das séries de compostos **4** e **5** contra *C. neoformans gattii* C, ambos com de CIM=0,039mg/mL e CFM=0,078mg/mL.

Tabela 26 - Valores de CIM e CFM contra *C. neoformans* D para os compostos **4** e **5** testados.

Composto	X	R	CIM (mg/mL)	CFM
4j	Cl	H	0,156	1,25
4p	Cl	CH ₃	0,625	1,25
4q	Cl	F	0,156	1,25
4r	Cl	Cl	0,156	0,625
4s	Cl	Br	0,156	0,312
4t	Cl	NO ₂	0,039	--
5j	F	H	0,156	1,25
5p	F	CH ₃	0,039	0,625
5q	F	F	0,039	1,25
5r	F	Cl	0,039	0,312
5s	F	Br	0,156	1,25
5t	F	NO ₂	0,156	0,625
Padrão	Fluconazol		0,019	--

CIM = concentração inibitória mínima, CFM = concentração fungicida mínima, -- = sem ação, n.t. = não testado.

Contra *C. neoformans* D, a maioria dos modelos **4** e **5** testados apresentaram CIM próxima do padrão fluconazol (Tabela 26), sendo que apenas o composto **4t** não apresentou ação fungicida.

Considerando os modelos **4**, 5-triclorometil isoxazóis, o composto **4j** R = H apresentou CIM = 0,156mg/mL e CFM = 1,25mg/mL, sendo que a maioria das substituições na posição 4 da fenila no isoxazol, com exceção do modelo **4p**, aumentou a atividade em relação ao modelo **4j**. O composto mais ativo foi o **4t**, com CIM = 0,039mg/mL, apenas duas vezes menos ativo que o padrão, porém não apresentando CFM nas concentrações testadas.

Com relação aos modelos **5**, 5-trifluórmethyl isoxazóis, para o composto **5j** R = H observou-se CIM = 0,156mg/mL e CFM = 1,25mg/mL. A maioria das substituições na posição 4 da fenila no isoxazol diminuiu a CIM dos compostos, aumentando a atividade, exceto quando substituído por NO₂, pois o modelo **5t** apresentou CIM e CFM idênticas ao composto **5j**. Três dos modelos (**5p**, **5q**, **5r**) apresentaram CIM =

0,039mg/mL, e dentre estes destacou-se o modelo **5r**, que apresentou o menor valor de CFM.

Novamente, os modelos 5-triflúormetil isoxazóis tiveram maior atividade antifúngica do que os 5-triclorometil isoxazóis.

5. CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos, todos os compostos estudados demonstraram atividade antimicrobiana.

Para a série de compostos **2**, 5-triclorometil-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazóis, observou-se que o aumento da cadeia alquílica em R¹ não é interessante para a atividade antibacteriana. Os compostos bromados foram os mais ativos contra *S. aureus* e *E. coli*. Contra *S. aureus* o mais ativo foi o composto **2h** (R¹= CH₂Br). Já contra *E. coli*, o mais ativo foi o **2i** (R¹= CHBr₂). De modo geral, *P. aeruginosa* se mostrou mais resistente a todos os compostos **2**.

Contra fungos do gênero *Candida* não se observou uma relação evidente entre a estrutura química dos compostos **2**. Nesta série destacou-se a atividade do composto **2h** contra *C. albicans*, idêntica ao padrão fluconazol. Observou-se uma maior atividade da maioria dos compostos **2** contra *C. neoformans gattii* C, com boa atividade quando comparados com o padrão fluconazol.

Foi observado que para a série de compostos **3**, isoxazóis 5-ácido carboxílico, houve uma relativa diminuição da atividade antibacteriana quando comparados com a série de compostos **2**, portanto a substituição do carbono 5 do isoxazol com o grupo COOH não foi interessante para a atividade antibacteriana, frente aos microrganismos testados.

Para a série de compostos **4** e **5**, isoxazóis 3-aryl substituídos, pode-se observar que a substituição com o grupo triclorometil no carbono 5 do isoxazol é melhor para a atividade antibacteriana do que com o grupo trifluormetil. O composto **4p** demonstrou atividade contra *P. aeruginosa* idêntica ao padrão ampicilina.

Por outro lado, a presença do grupamento trifluormetil no carbono 5 do isoxazol é mais favorável para a atividade antifúngica do que a presença do grupamento triclorometil. O composto **5r** foi o composto mais ativo contra todas as espécies de fungos testadas, demonstrando uma excelente atividade contra *C. lusitaniae*, sendo neste caso duas vezes mais ativo que o padrão fluconazol.

6. SUGESTÕES PARA A CONTINUIDADE DO TRABALHO

Os importantes resultados deste trabalho contribuem para o avanço da formação de pessoal habilitado nesta interface das ciências química e farmacêutica, entretanto é fundamental a continuidade dos trabalhos no sentido de avaliação de outras características destas substâncias como toxicidade, mecanismo de ação antimicrobiano, entre outros testes *in vitro* e *in vivo*.

Assim, sugerimos para continuidade deste trabalho, a correlação dos valores encontrados na avaliação da atividade antimicrobiana com parâmetros físico-químicos, que podem ser obtidos por um programa computacional de química teórica, a fim de se promover um estudo de relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade dos compostos em estudo.

Além disso, sugerimos a implementação da avaliação sistemática da atividade farmacológica de outras séries de substâncias produzidas no NUQUIMHE.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. a) Katritzky, A. R.; Rees, C. W.; Eds Comprehensive Heterocyclic Chemistry vol. 6, cap. 4.16, *Pergamon Press*, New York, **1984**. b) Katritzky, A. R.; Rees, C. W. Scriven, E. F. V.; Eds Comprehensive Heterocyclic Chemistry vol. 3, cap. 3.03, *Pergamon Press*, New York, **1996**.
2. a) Gilchrist, T. L.; *Heterocyclic Chemistry*, *Logman*, Harlow, **1985**. b) Davies, D. T.; *Aromatic Heterocyclic Chemistry*, *Oxford Science Publications*, Oxford, **1992**.
3. a) Martins, M. A. P.; Siqueira, G. M.; Flores, A. F. C.; Clar, G.; Zanatta, N.; *Quím. Nova* **1994**, 17(1), 24. b) Martins, M. A. P.; Colla, A.; Clar, G.; Krimmer, S.; Fischer, P.; *Synthesis* **1991**, 483.
4. a) Martins, M. A. P.; Bastos, G. P.; Bonacorso, H. G.; Zanatta, N.; Flores, A. F. C.; Siqueira, G. M.; *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 4309. b) Bonacorso, H. G.; Martins, M. A. P.; Bittencourt, S. R. T.; Lourega, R. V.; Zanatta, N.; Flores, A. F. C.; *J. Fluorine Chem.* **1999**, 99, 177. c) Flores, A. F. C.; Brondani, S.; Zanatta, N.; Rosa, A.; Martins, M. A. P.; *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 8701.
5. a) Martins, M. A. P.; Flores, A. F. C.; Freitag, R. A.; Zanatta, N.; *J. Heterocyclic Chem.* **1995**, 32, 731. b) Martins, M. A. P.; Flores, A. F. C.; Freitag, R. A.; Zanatta, N.; *J. Heterocyclic Chem.* **1996**, 33, 1223. c) Martins, M. A. P.; Siqueira, G. M.; Bastos, G. P.; Bonacorso, H. G.; Zanatta, N. *J. Heterocyclic Chem.* **1996**, 33, 1619. d) Martins, M. A. P.; Flores, A. F. C.; Bastos, G. P.; Zanatta, N.; Bonacorso, H. G.; *J. Heterocyclic Chem.* **1999**, 36, 837. e) Martins, M. A. P.; Sinhoin, A. P.; Zimmermann, N. E. K.; Zanatta, N.; Bonacorso, H. G.; Bastos, G. P.; *Synthesis* **2001**, 13, 1959. f) Martins, M. A. P.; Beck, P.; Cunico, W.; Pereira, C. M. P.; Sinhoin, A. P.; Blanco, R. F.; Peres, R.; Bonacorso, H. G.; Zanatta, N.; *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 7005.
6. Martins, M. A. P.; Flores, A. F. C.; Bastos, G. P.; Sinhoin, A.; Bonacorso, H. G.; Zanatta, N.; *Tetrahedron Letters* **2000**, 41, 293.

7. a) Mello, C. F.; Souza, F. R.; Souza, V. T.; Ratzlaff, V.; Borges, I. P.; Oliveira, M. R.; Bonacorso, H. G.; Zanatta, N.; Martins, M. A. P.; *Eur. J. Pharm.* **2002**, *451*, 141. b) Morsch, V. M.; Cechin, S. R.; Schetinger, M. R. C.; Zanatta, N.; Madruga, C. C.; Pacholski, I. L.; Flores, D. C.; Bonacorso, H. G.; Martins, M. A. P.; *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 1433. c) Souza, F. R.; Figuera, M. R.; Lima, T. T. F.; Bastiani, J.; Barcellos, I. B.; Almeida, C. E.; Oliveira, M. R.; Bonacorso, H. G.; Flores, A. E.; Mello, C. F.; *Pharm. Biochem. Behav.* **2001**, *68*, 525.
8. Sidrim, J. J. C.; Moreira, J. L. B.; Fundamentos Clínicos e Laboratoriais de Micologia Médica, *Guanabara Koogan*, Rio de Janeiro, **1998**.
9. Bodey, G. P.; *Clin. Infect Dis.* **1992**, *14*, 161.
10. Quindós, G.; *Rev. Iberoamericana de Micologia* **2002**, *19*, 1.
11. Lee, Y. M., Almqvist, F., Hultgren, S.J.; *Curr. Opinion Pharm.* **2003**, *3*, 513.
12. Calderone, R. A., Fonzi, W. A.; *TRENDS Microbiol.* **2001**, *9*, 327. (12)
13. Borg, M.; Ruchel, R.; *Infect. Immun.* **1988**, *56*, 626. (13)
14. Mitchell, T. G.; Perfect, J. R.; *Clin. Microbiol. Rev.* **1995**, *8*, 515. (14)
15. Ministério da Saúde – Coordenação Nacional de DST/AIDS. Disponível em <http://www.aids.gov.br>. Acesso em: 25 jan. 2005.
16. Murray, P. R.; Microbiologia Médica, 3 ed., *Guanabara Koogan*, Rio de Janeiro, **2000**.
17. Otto, M.; *FEMS Microbiology Lett.* **2004**, *241*, 135.
18. Lyczak, J. B., Cannon, C. L., Píer, G. B.; *Microbes and infection* **2000**, *2*, 1051.
19. Bodey, G. P.; *Clin. Infect Dis.* **1992**, *14*, 161.
20. Quindós, G.; *Rev. Iberoamericana de Micologia* **2002**, *19*, 1.
21. Kozel, T. R.; *TRENDS Microbiol.* **1995**, *3*, 295.
22. Chambers, H. F.; Sande, M. A. in: Goodman and Gilman, 6 ed., *McGraw Hill*, México, **1996**.
23. Tavares, W.; Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfecciosos, 2 ed., *Atheneu*, São Paulo, **1996**.
24. Dowell, S. F.; *Seminars in Pediatric Infections Diseases* **2004**, *15*, 99.
25. Heinemann, J. A.; *Drug Disc. Today* **1999**, *4*, 72.
26. Coast, J.; Smith, R. D.; *Drug Disc. Today* **2003**, *8*, 1.
27. Wingard, J. R., Leather, H.; *Biology of Blood and Marrow Transplantation* **2004**, *10*, 73.

28. Edmond, M. B.; Wallace, S. E.; McClish, D. K.; Pfaller, M. A. Jones, R. N.; Wenzel, R. P.; *Clin. Infect. Dis.* **1999**, 29, 239.
29. Rees, J. R.; Pinner, R. W.; Hajjeh, R. A.; Brandt, M. E.; Reingold, A. L.; *Clin. Infect. Dis.* **1998**, 7, 1138.
30. Sheehan, D. J.; Hitchcock, C.; Sibley, C. M.; *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, jan., 40.
31. Jeu, L.; Piacenti, F. J.; Lyakhovetskiy, A. G.; Fung, H. B.; *Clin. Therap.* **2003**, 25, 1321.
32. Canuto, M. M.; Rodero, F. G.; *THE LANCET Infect. Dis.* **2002**, 2, 550.
33. Taylor, P. W.; Stapleton, P. D.; Luzio, J. P.; *Drug Disc. Today* **2002**, 7, 1086.
34. Karakurt, A., Dalkara, S., Özalp, M., Özbey, S.; *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, 36, 421.
35. Matysiak, J., Niewiadomy, A., Krajewsaka-Kulak, E., Macik-Niewiadomy, G.; *Farmaco* **2003**, 58, 455.
36. Na, Y. M., Le Borgne, M., Pagniez, F., Le Baut, G., Le Pape, P.; *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, 38, 75.
37. Ulusoy, N., Gürsoy, A., Ötük, G.; *Farmaco* **2001**, 56, 947.
38. Silvestri, R., Ártico, M., La Regina, G., Di Pasquali, A., De Martino, G., D'Auria, F. D., Nencioni, L., Palamara, A. T.; *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 3924.
39. Tafi, A.; Costi, R.; Botta, M.; Di Santo, R.; Corelli, F.; Massa, S.; Ciacci, A.; Manetti, F.; Ártico, M.; *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 2720.
40. Menozzi, G., Merello, L., Fossa, P., Schenone, S., Ranise, A., Mosti, L., Bondavalli, F., Loddo, R., Murgioni, C., Mascia, V., La Colla, P., Tamburini, E. *Bioorg. Med. Chem.*; **2004**, 12, 5465.
41. Daidone, G., Maggio, B., Plescia, S., Raffa, D., Musiu, C., Milia, C., Perra, G., Morongiu, M. E.; *Eur. J. Med. Chem.* **1998**, 33, 375.
42. Küçükgülzel, S. G., Rollas, S., Erdeniz, H., Kiraz, M., Ekincir, A. C., Vidin, A.; *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, 35, 761.
43. Pimenova, E. V., Voronina, É. V.; *Pharm. Chem. J.* **2001**, 35, 602.
44. Küçükgülzel, S. G., Oruç, E. E., Rollas, S., Sahin, F., Özbek, A.; *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, 37, 197.
45. Tsushima, M., Kano, Y., Umemura, E., Iwamatsu, K., Tamura, A., Shibahara, S.; *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 1641.

46. Beuchet, P., Varache-Lembège, M., Neveu, A., Léger, J. M., Vercauteren, J., Larrouture, S., Deffieux, G., Nuhrich, A.; *Eur. J. Med. Chem.* **1999**, *34*, 773.
47. Baraldi, P. G., Pavani, M. G., Nuñez, M. C., Brigidi, P., Vitali, B., Gambari, R., Romagnoli, R.; *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 449.
48. Narayana, B., Raj., K. K. V., Ashalatha, B. V., Kumari, N. S., Sarojini, B. K.; *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, *39*, 867.
49. Fringuelli, R., Pietrella, D., Schiaffella, F., Guarraci, A., Perito, S., Bistoni, F., Vecchiarelli, A.; *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, *10*, 1681.
50. Ören, I., Temiz, Ö., Yaçın, I, sener, E., Altanlar, N.; *Eur. J. Pharm. Sciences* **1998**, *7*, 153.
51. Lee, C. S., Allwine, D. A., Barbachyn, M. R., Grega, K. C., Dolak, L. A., Ford, C. W., Jensen, R. M., Seest, E. P., Hamel, J. C., Schaadt, R. D., Stapert, D., Yagi, B. H., Zurenko, G. E., Genin, M. J.; *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 3243.
52. Lee, J. S., Cho, Y. S., Chang, M. H., Koh, H. Y., Chung, B. Y., Pae, A. N.; *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *13*, 4117.
53. Genin, M. J., Allwine, D. A., Anderson, D. J., Barbachyn, M. R., Emmert, D. E., Garmon., S. A., Graber, D. R., Grega, K. C., Hester, J. B., Hutchinson, D. K., Morris, J., Reischer, R. J., Ford, C. W., Zurenko, G. E., Hamel, J. C., Schaadt, R. D., Stapert, D., Yagi, B. H.; *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, 953.
54. Tyrkov, A. G., Sukhenko, L. T.; *Pharm. Chem. J.* **2002**, *36*, 14.
55. Kocabalkanli, A.; Ates, Ö.; Ötük, G.; *Farmaco* **2001**, *56*, 975.
56. Papakonstantinou-Garoufalias, S., Pouli, N., Marakos, P., Chytyroglou-Ladas, A.; *Farmaco* **2002**, *57*, 973.
57. Gülerman, N. N.; Dogan, H. N.; Rollas, S.; Johansson, C.; Celik, C.; *Farmaco* **2001**, *56*, 953.
58. Mares, D.; Romagnol, C., Andreotti, E.; Manfrini, M.; Vicentini, C. B.; *J. Agric. Food. Chem.* **2004**, *52*, 2003.
59. Raffa, D., Daidone, G., Maggio, B., Schillaci, D., Plescia, F., Torta, L.; *Farmaco* **1999**, *54*, 90.
60. Zadrozna, I., Kurkowska, J., Kruszewska, H., Makuch, I.; *Farmaco* **2000**, *55*, 499.
61. Aiello, E., Aiello, S., Mingoia, F., Bacchi, A., Pelizzi, G., Musiu, C., Setzu, M. G., Pani, A., La Colla, P., Marongiu, M. E.; *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *8*, 2719.

62. Menozzi, G., Mosti, L., Fossa, P., Musiu, C., Murgioni, C., La Colla, P.; *Farmaco* **2001**, *56*, 633.
63. Velikorodov, A. V., Sukhenko, L. T.; *Pharm. Chem. J.* **2003**, *37*, 22.
64. Calí, P., Nærum, L., Mukhija, S., Hjelmencrantz, A.; *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *14*, 5597.
65. Sadashiva, M. P., Mallesha, H., Hitesh, N. A., Rangappa, K. S.; *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *14*, 6389.
66. Grünanger, P.; Vita-Finzi, P.; *The Chemistry of Heterocyclic Compounds – Isoxazoles*, Weissenberger and Taylor Eds., *Wiley-Interscience*, New York, **1991**.
67. Sorensen, U. S.; Falch, E.; Kroggaard-Larsen, P.; *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1003.; Katritzky, A. R.; Barczynski, P.; Ostercamp, D. L.; Yousaf, T. I.; *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4037.
68. Sato, K.; Sugai, S.; Tomita, K.; *Agric. Biol. Chem.* **1986**, *62*, 1940.
69. Sloop, J. C.; Bumgardner, C. L.; Loehle, W. D.; *J. Fluorine Chem.* **2002**, *118*, 135.
70. a) Umada, A.; Okano, T.; Eguchi, S.; *Synthesis* **1994**, 1457. b) Bravo, P.; Diliddo, D.; Resnati, G.; *Tetrahedron* **1994**, *50* (29), 8827.
71. Escale, R.; Jacquier, R.; Ly, B.; Petrus, F.; *Tetrahedron* **1974**, *32*, 1369.
72. Galgani, J. N.; Rinaldi, M. G.; Polak, A. M.; Pfaller, M. A. *J. Méd. Vet. Mycol.* **1992**, *30*, 213.
73. Hospenthal, D. R.; Murray, C. K.; Rinaldi, M. G.; *Diagnostic Microbiology and Infections Diseases* **2004**, *48*, 153.
74. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27-1**. Document M27-A, 1997; 17:1-29.
75. Drenkard, E.; *Microbes and Infection* **2003**, *5*, 1213.

ANEXO

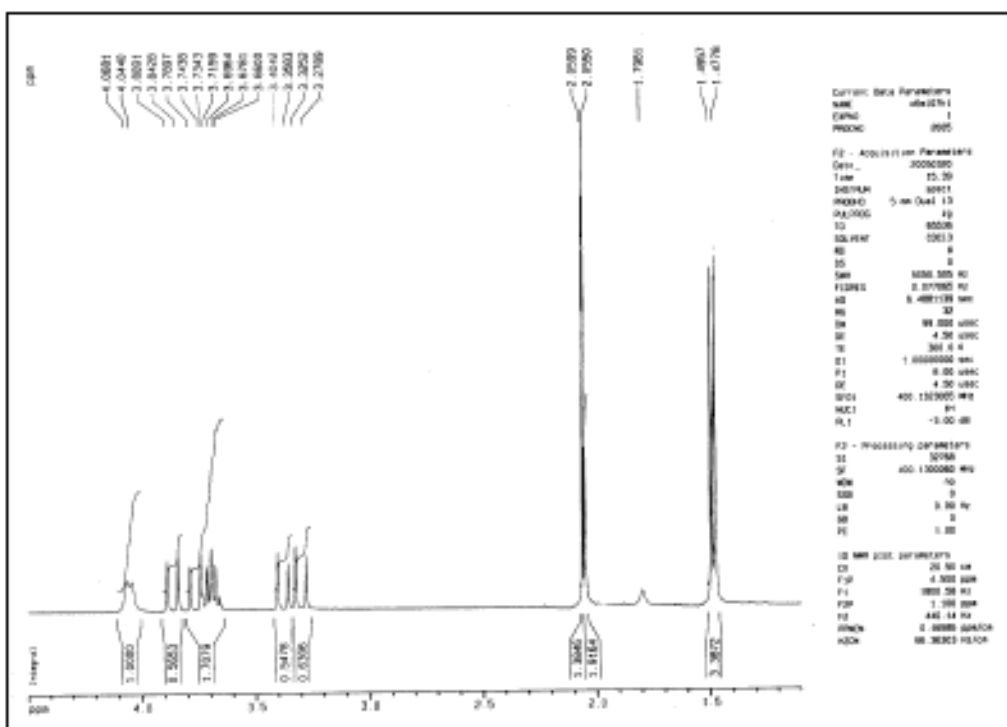
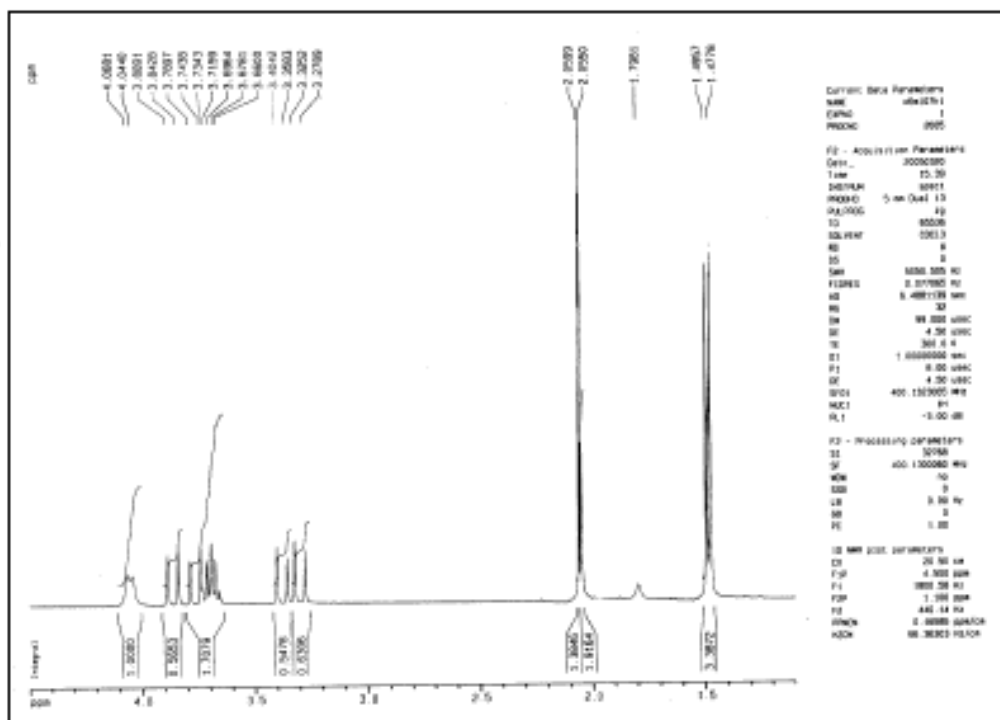
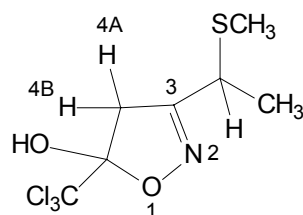


FIGURA 11. (a) Espectro de ^1H RMN de 5-triclorometil-5-hidroxi-3-(1-tiometil-etil)-4,5-dihidroisoxazol (**2n**); (b) expansão do espectro.

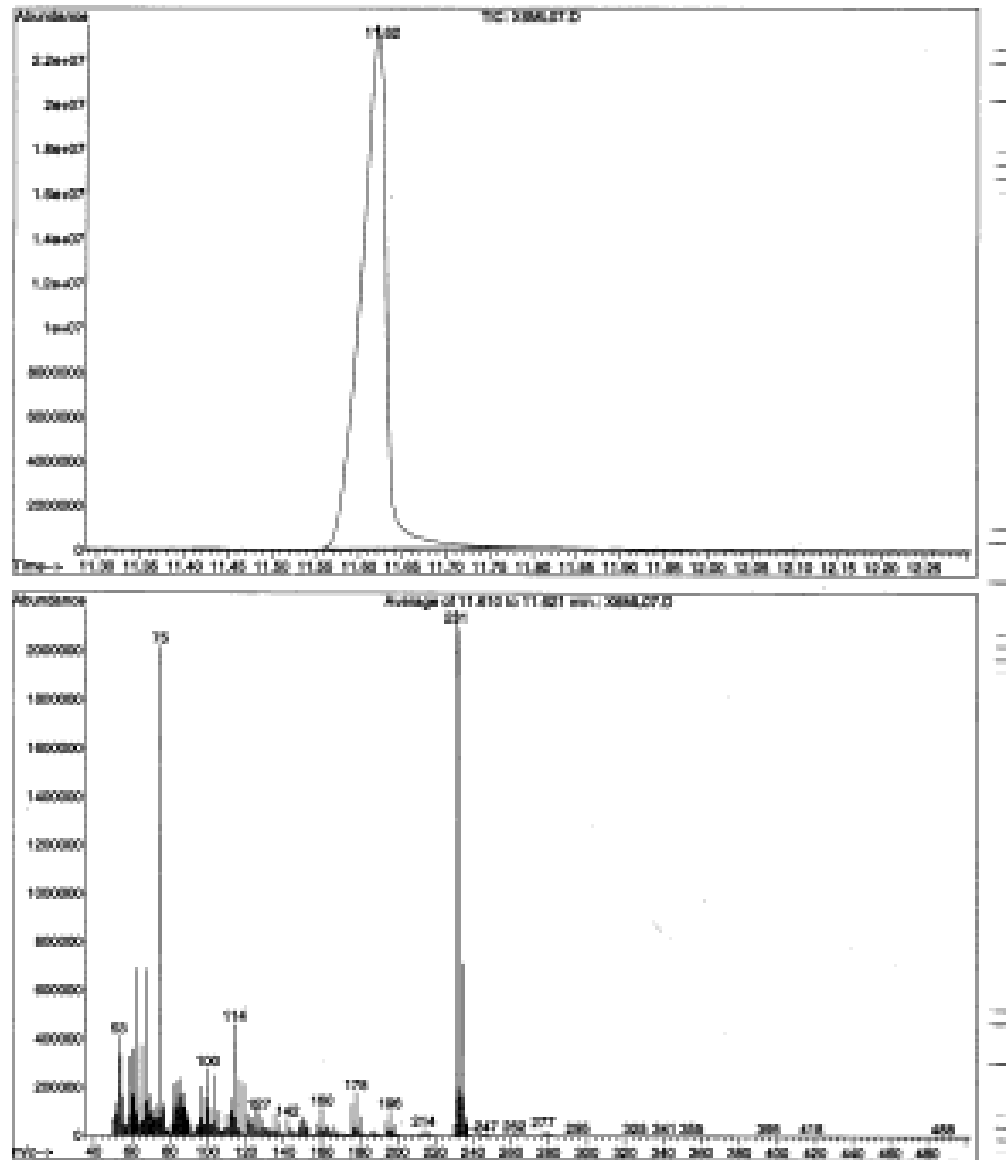


FIGURA 12. Espectro de CG/EM de 5-triclorometil-5-hidroxi-3-(1-tiometil-etil)-4,5-diidroisoxazol (**2n**).

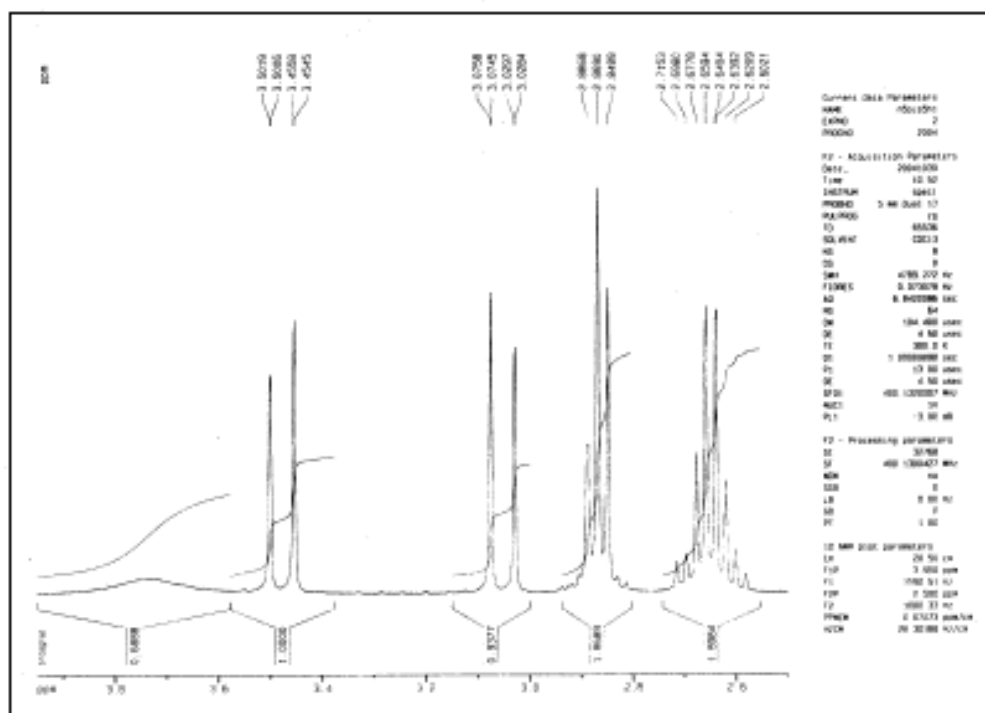
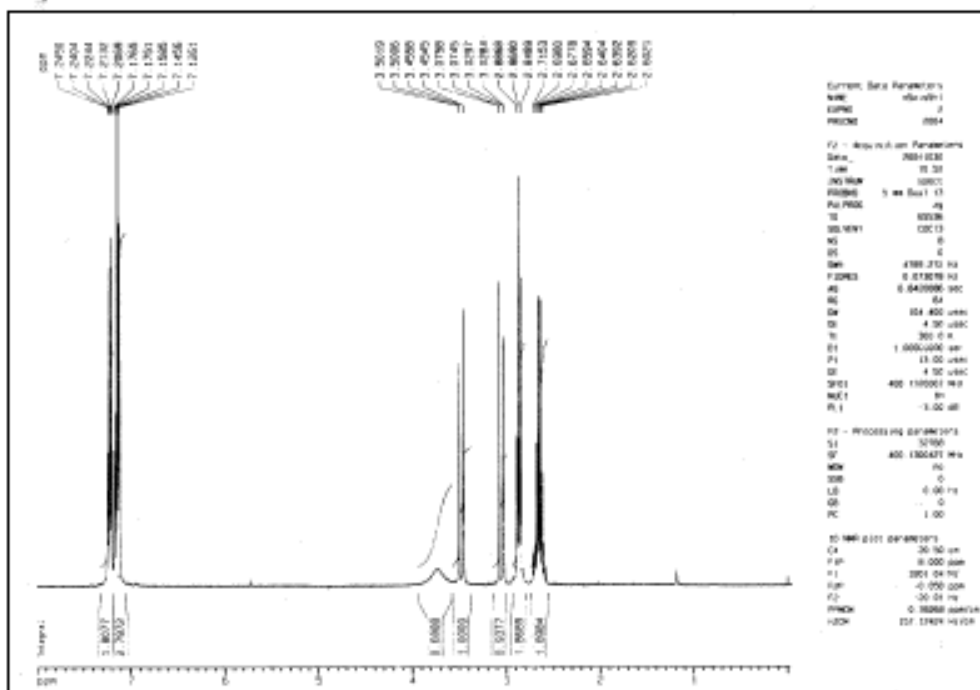
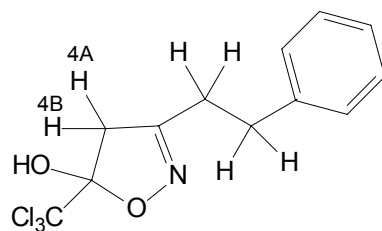


FIGURA 13. (a) Espectro de ^1H RMN de 5-triclorometil-3-(2-fenil-etil)-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazol (**20**); (b) expansão do espectro.

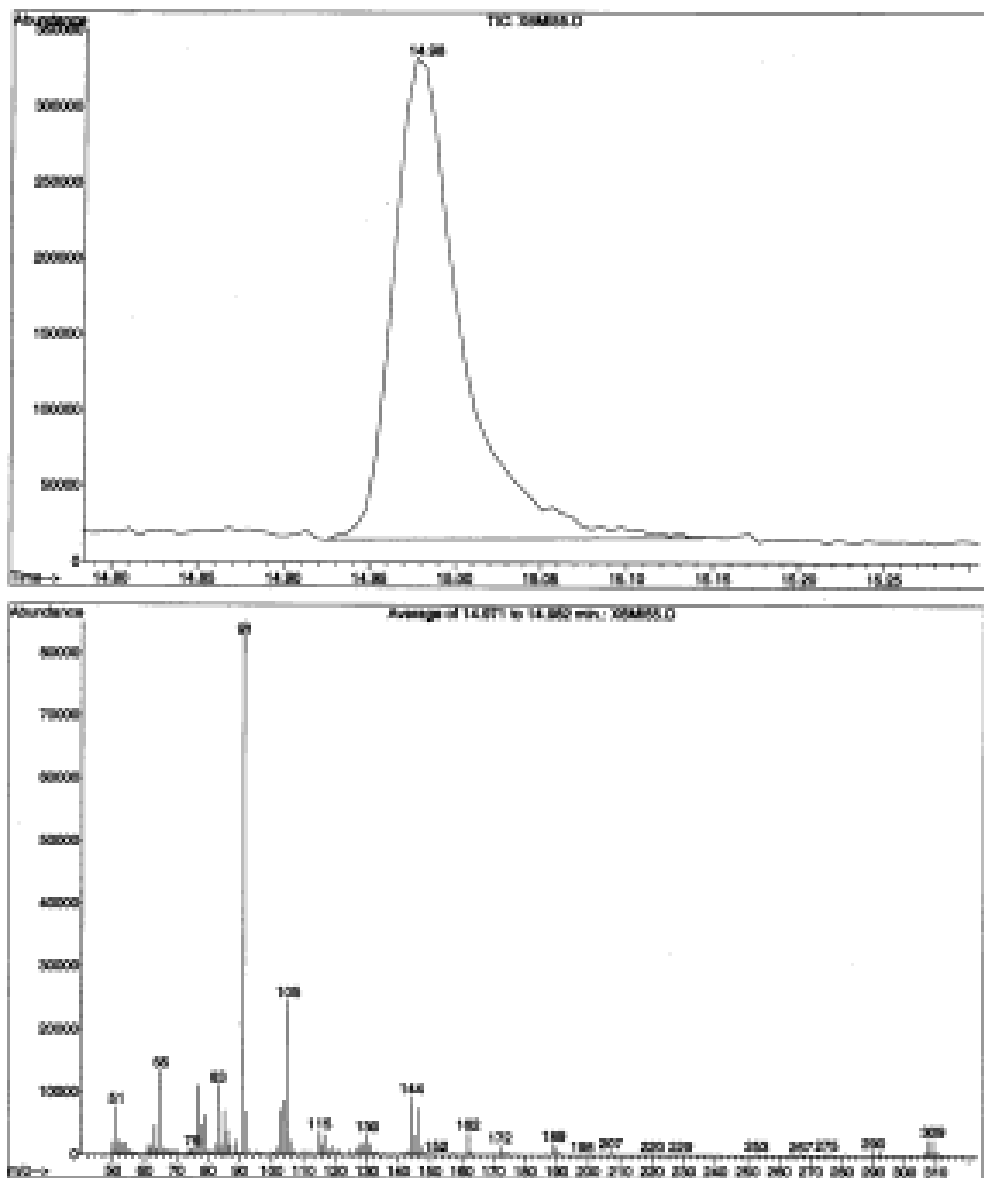


FIGURA 14. Espectro de CG/EM de 5-triclorometil-3-(2-fenil-etil)-5-hidroxi-4,5-diidroisoxazol (2o).