

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Camille Carvalho de Mendonça

Síntese e avaliação da ação antitumoral de derivados 1,2,4-oxadiazólicos em modelos *in vitro* de linhagens de tumores humanos e animais

Juiz de Fora

2019

Camille Carvalho de Mendonça

Síntese e avaliação da ação antitumoral de derivados 1,2,4-oxadiazólicos em modelos *in vitro* de linhagens de tumores humanos e animais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração: Química Orgânica, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Mara Rubia Costa Couri

Juiz de Fora

2019

Dedico este trabalho à minha família, pelo apoio, carinho e paciência, que com certeza torceram e continuam torcendo por mim.

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares que perto ou longe me apoiaram e torceram para que essa conquista fosse alcançada. A minha filha de 4 patas, Cloe, pelos lambeijos sempre necessários. E em especial aos meus pais, Marcos e Dayse, que não mediram esforços e sempre priorizaram a importância da educação na minha vida e na vida da minha irmã, Caroline.

A minha irmã Caroline que sempre me apoiou a lutar pelos meus objetivos.

Ao meu namorado Guilherme pelo amor, carinho, compressão e apoio emocional nos altos e baixos que a pesquisa acadêmica proporciona.

Aos amigos, os melhores e são meus. Anna, Isabela, Lorena, Bárbara, Izabelle, Maíra, Wilson e Yulli. Que choram, reclamam, riem e celebram junto comigo em todos os momentos, mesmo cada um morando em um lugar diferente desse mundo.

Aos amigos de laboratório, agregados e todos que se sentem à vontade de passar uns minutos do seu dia no NECSO. Rafaela, Pedro, Ana, Beatriz, Laura, Juliana, Júlia, Júlio, Ju, João, Wiliam e Mathias, obrigada pela companhia e por fazerem os dias de trabalho ficarem mais leves. Fillipe e Letícia muito obrigada pela paciência que tiveram comigo e pela colaboração nesse trabalho. Em especial quero agradecer à (Tia) Karine pela enorme paciência com os ensinamentos e pela companhia nas aventuras em busca de resultados nos testes biológicos.

Aos amigos que ganhei na minha trajetória pela UFJF, Gabriel, Jefferson, Moyra, Eduarda, Pamela, Giovana, Jéssica e Isa. Obrigada por compartilhar os perrengues e as alegrias da vida universitária.

À professora Mara Rubia pelos ensinamentos, paciência, confiança e apoio desde a graduação e especialmente para realização desse trabalho.

À professora Heveline Silva pelos ensinamentos, paciência, confiança e apoio desde a graduação e especialmente pela realização dos testes de citotoxicidade.

À Professora Luciana Maria e toda sua equipe do Serviço de Biologia Celular da Fundação Ezequiel Dias pelos ensinamentos e confiança para realização dos testes biológicos, em especial a pesquisadora Dra. Christiane Contigli.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química.

Às agências de fomento pela estrutura e apoio financeiro.

Obrigada a todos que de algum modo contribuíram para que esse momento se concretizasse.

*"Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e,
ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva
por toda a humanidade."*

(Marie Curie, 1922, *The Story of My Life, The Delineator*, Tradução pela própria autora)

RESUMO

O câncer está entre um dos maiores causadores de morte no mundo. Sabendo que existem padrões crescentes de incidência e mortalidade, e que há uma deficiência do arsenal quimioterapêutico, a sociedade científica procura novos compostos com atividade antitumoral que apresentem maior eficácia no tratamento e alta seletividade. Tendo em vista o panorama, esse trabalho consistiu na síntese e avaliação da atividade antitumoral de derivados 1,2,4-oxadiazólicos substituídos nas posições 3 e 5. Foram obtidos vinte e dois compostos a partir da síntese de três diferentes nitrilas com hidroxilamina, gerando três amidoximas. Em seguida a reação das amidoximas com brometo de bromo acetila seguido de ciclização, levou a obtenção de três intermediários 5-(bromometil) -1,2,4-oxadiazol aromáticos. A reação desses intermediários com etilenodiamina, propanodiamina, butanodiamina e piperazina levou a obtenção de outros seis derivados oxadiazólicos. Por fim os três derivados contendo piperazina sofreram reação de *N*-alquilação com haletos de alquila de cadeia longa levando a obtenção de dez compostos. Todos os compostos sintetizados tiveram suas estruturas elucidadas através de espectros de infravermelho e de RMN de ^1H e ^{13}C . Todos os compostos foram avaliados com relação a atividade antitumoral através do ensaio de citotoxicidade para determinação do CI_{50} e índice de seletividade (IS) em linhagens de células animais e humanas. Os compostos sintetizados apresentaram citotoxicidade e seletividade significativas frente as linhagens de células tumorais animais B16F10 ($6,0 \pm 2,2 \mu\text{M} \leq \text{CI}_{50} \leq 27,6 \pm 5,1 \mu\text{M}$; $0,5 \leq \text{IS}_{\text{BHK-21}} \leq 2,5$) e CT26-WT ($2,5 \pm 0,7 \mu\text{M} \leq \text{CI}_{50} \leq 36,1 \pm 2,4 \mu\text{M}$; $0,5 \leq \text{IS}_{\text{BHK-21}} \leq 4,9$). Destacando-se os resultados citotóxicos para três intermediários de síntese e os oxadiazóis *N*-alquilados com 12 átomos de carbono na cadeia. Para a linhagem tumoral humana RKO-AS45-1 obteve-se valores de CI_{50} entre $29,2 \mu\text{g/mL}$ e $672 \mu\text{g/mL}$ com índices de seletividade ($\text{IS}_{\text{WI-26 VA4}}$) menores que 2,0. Foi realizada a avaliação de morte celular por apoptose, para dois dos compostos mais citotóxicos e seletivos (compostos **20** e **22**), nas linhagens RKO-AS45-1 (carcinoma de cólon humano), e WI-26 VA4 (fibroblasto de pulmão humano). Com esses dados foi possível observar que o composto **22** induziu morte por necrose, mecanismo de morte celular indesejável, uma vez que pode gerar processos inflamatórios e outros efeitos colaterais. Por outro lado, pode-se observar que o tratamento com o composto **20** induziu pouca morte celular, ou seja, espera-se que sua citotoxicidade inviabilize o funcionamento celular por outro mecanismo.

Palavras-chave: 1,2,4-oxadiazóis. Câncer. Atividade antitumoral.

ABSTRACT

Cancer is among one of the biggest causes of deaths in the world. It is well known that incidence and mortality related with this disease are increasing, also there is a deficiency in chemotherapeutic treatment; so, the scientific society still looking for new compounds that show antitumor activity and have greater efficiency and high selectivity. Considering the panorama, this work consists in the synthesis and evaluation of antitumor activity of 1,2,4-oxadiazolic derivatives substituted in positions 3 and 5. Twenty-two compounds were synthesized from three different nitriles with hydroxylamine, generating three amidoximes. Then the reaction of amidoximes with bromo acetyl bromide followed by cyclization led to three 5-(bromomethyl)-1,2,4-oxadiazole intermediates. Further, more six other oxadiazol derivatives were obtained by action of these three intermediates with ethylenediamine, propanediamine, butanediamine and piperazine. Finally, more ten compounds were synthesized by reaction of three piperazine-containing derivatives with long chain alkyl halides. All synthesized compounds had their structures elucidated by infrared and ^1H and ^{13}C NMR spectra. All compounds were evaluated for antitumor activity by cytotoxicity assay for IC_{50} and selectivity index (SI) determination in animal and human cell lines. The synthesized compounds showed significant cytotoxicity and selectivity against animal tumor cell lines B16F10 ($6,0 \pm 2,2 \mu\text{M} \leq \text{IC}_{50} \leq 27,6 \pm 5,1 \mu\text{M}$; $0,5 \leq \text{SI}_{\text{BHK-21}} \leq 2,5$) e CT26-WT ($2,5 \pm 0,7 \mu\text{M} \leq \text{IC}_{50} \leq 36,1 \pm 2,4 \mu\text{M}$; $0,5 \leq \text{SI}_{\text{BHK-21}} \leq 4,9$). Specially three 5-(bromomethyl)-1,2,4-oxadiazole intermediates and *N*-alkylated oxadiazoles containing 12 carbon chain. Against human tumor cell line RKO-AS45-1 were obtained IC_{50} values between $29,2 \mu\text{g/mL}$ and $672 \mu\text{g/mL}$ with selective index ($\text{SI}_{\text{WI-26 VA4}}$) lower than 2,0. Cell death by apoptosis was evaluated for two of the most cytotoxic and selective compounds (compounds **20** and **22**) in RKO-AS45-1 (human colon carcinoma) and WI-26 VA4 (human lung fibroblast) cell lines. With these data it was possible to observe that compound **22** induced death by necrosis, undesirable mechanism of cell death, since it can generate inflammatory processes and other side effects. On the other hand, the treatment with compound **20** induced little cell death, so, its cytotoxicity may be related with other mechanism that regulate cell function. Until now, preliminary results from cellular cycle analysis by flow cytometry indicates that cells treated with compound 20 lead to stay in G1 phase.

Keywords: 1,2,4-oxadiazoles. Cancer. Antitumor activity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4T1	Células de carcinoma de mama murino
AcOEt	Acetato de etila
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B16F10	Células de melanoma metastático murinho
BHK-21	Células normal de rim de hamster jovem
cat.	Catalizador
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCS	Cromatografia em coluna de sílica
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CDI	Carbonildiimidazol
CI ₅₀	Concentração inibitória mediana
CT26-WT	Células de carcinoma do cólon murinho
CV	Controle de Vida
DMEM	Meio de cultura celular (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetil sulfóxido deuterado
d	Dupleto
DANT	Doenças e agravos não transmissíveis
DBU	1,8-Diazabicyclo [5,4,0]undec-7-ene
dd	Duplo dupletos
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsufóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eq.	Equivalente
FBS	Soro Fetal Bovino
FF	Faixa de fusão
G1	1 ^a Fase do ciclo celular
G2/M	3 ^a Fase do ciclo celular/Mitose
GCO	The Global Cancer Observatory
HeLa	Células de câncer cervical humano
HIV	Vírus da imunodeficiência humana

Hz	Hertz
IARC	Agência Internacional de Pesquisas do Câncer
INCA	Instituto nacional de câncer
IRP-64	Amberlite IRP-64
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
IV	Infravermelho
IV (ATR)	Infravermelho (Reflexão Total Atenuada)
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	Multiplete
M.O.	Micro-ondas
MCF7	Célula de câncer de mama humano
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
μM	Micromolar
MM	Massa molecular
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazol
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimida
OMS	Organização mundial da saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino
ppm	Parte por milhão
q	Quarteto
RKO-AS45-1	Carcinoma de cólon humano
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RPMI 1640	Meio de cultura celular (Roswell Park Memorial Institute)
s	Simpleto
S	2ª Fase do ciclo celular
SD	<i>Standard Deviation</i>
sl	Simpleto largo
t	Triplete
t.a.	Temperatura Ambiente
UV	Ultravioleta
WI-26-VA4	Fibroblasto de pulmão humano

LISTA DE SÍMBOLOS

Δ	Aquecimento
δ	Deslocamento químico
ν	Estiramento da ligação

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	– Metodologias de obtenção de 1,2,4-oxadiazóis 3,5-disubstituídos.....	19
Esquema 2	– Estratégia de síntese para obtenção de 1,2,4-oxadiazóis via formação de <i>O</i> - acilamidoximas.....	20
Esquema 3	– Plano de síntese das amidoximas.....	27
Esquema 4	– Plano de síntese dos derivados 1,2,4-oxadiazólicos.....	27
Esquema 5	– Plano de síntese dos derivados 1,2,4-oxadiazólicos acoplados a diaminas.....	28
Esquema 6	– Plano de síntese dos derivados 1,2,4-oxadiazólicos alquilados.....	28
Esquema 7	– Síntese das amidoximas 4-6	29
Esquema 8	– Mecanismo proposto para formação das amidoximas.....	30
Esquema 9	– Síntese dos derivados 1,2,4-oxadiazólicos 7-9	32
Esquema 10	– Mecanismo proposto para formação dos derivados 1,2,4-oxadiazólicos.....	33
Esquema 11	– Síntese dos derivados 1,2,4-oxadiazólicos acoplados a diaminas.....	36
Esquema 12	– Síntese dos derivados 1,2,4-oxadiazólicos alquilados.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estimativa de mortes por câncer no mundo para cada ano.....	16
Figura 2	– Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.....	17
Figura 3	– Estrutura dos regioisômeros oxadiazólicos.....	18
Figura 4	– Derivados oxadiazólicos com atividade biológica.....	20
Figura 5	– Derivados 1,2,4-oxadiazólicos com atividade antitumoral.....	21
Figura 6	– Derivados 1,2,4-oxadiazólicos com tiofeno que apresentaram atividade antitumoral.....	21
Figura 7	– Representação esquemática simplificado de eventos apoptóticos.....	22
Figura 8	– Derivados 1,2,4- e 1,3,4-oxadiazólicos sintetizados pelo nosso grupo de pesquisa que apresentaram relevante atividade antitumoral.....	24
Figura 9	– Produtos finais planejados nesse trabalho.....	26
Figura 10	– Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (5).....	31
Figura 11	– Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$; 500 MHz) do composto (5).....	31
Figura 12	– Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$; 125 MHz) do composto (5).....	32
Figura 13	– Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (7).....	34
Figura 14	– Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do composto (7).....	35
Figura 15	– Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) do composto (7).....	35
Figura 16	– Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (14).....	37
Figura 17	– Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do composto (14).....	38
Figura 18	– Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) do composto (14).....	38
Figura 19	– Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (19).....	40
Figura 20	– Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do composto (19).....	41
Figura 21	– Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) do composto (19).....	41
Figura 22	– <i>Dotplots</i> obtidos a partir da análise de morte celular por citometria de fluxo...49	
Figura 23	– Histogramas obtidos a partir da análise do ciclo celular por citometria de fluxo.....	51
Figura 24	– Derivados 1,2,4-oxadiazólicos inéditos sintetizados nesse trabalho.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Concentração inibitória de 50% da viabilidade celular CI_{50} ($\mu\text{M} \pm \text{SD}$).....	43
Tabela 2	– Comparação da atividade citotóxica, para linhagem celular CT26.WT, entre derivados 1,2,4-oxadiazólicos alquilados.....	45
Tabela 3	– Comparação da atividade citotóxica, para linhagem celular B16F10, entre derivados 1,2,4-oxadiazólicos alquilados.....	46
Tabela 4	– Comparação da atividade citotóxica entre derivados 1,2,4-oxadiazólicos com brometo.....	47
Tabela 5	– Concentração inibitória de 50% da viabilidade celular CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$).....	48
Tabela 6	– Percentual das quatro populações de células observadas após cada tratamento.....	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	CÂNCER	16
1.2	OXADIAZÓIS	18
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL.....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	PLANO DE SÍNTESE	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS OXADIAZÓLICOS PROPOSTOS	29
4.1.1	Síntese e caracterização das amidoximas 4, 5 e 6	29
4.1.2	Síntese e caracterização dos derivados 1,2,4 oxadiazólicos 7, 8 e 9.....	32
4.1.3	Síntese e caracterização dos derivados 1,2,4 oxadiazólicos acoplados a diaminas 10 a 15.....	36
4.1.4	Síntese e caracterização dos derivados 1,2,4 oxadiazólicos alquilados 16 a 25... ..	39
4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS DERIVADOS OXADIAZÓLICOS	42
4.2.1	Ensaio de toxicidade e determinação do CI_{50} em linhagens de células animais .	42
4.2.2	Ensaio de toxicidade e determinação do CI_{50} em linhagens de células humanas..	47
4.2.3	Avaliação de morte celular por apoptose em linhagens de células humanas.....	49
4.2.4	Avaliação de ciclo celular por citometria de fluxo em linhagens de células humanas	50
5	PARTE EXPERIMENTAL	52
5.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
5.1.1	Síntese e caracterização dos derivados oxadiazólicos alquilados e seus precursores.....	52
5.1.2	A valiação da atividade antitumoral dos compostos sintetizados em linhagens de células animais	52
5.1.3	Avaliação da atividade antitumoral dos compostos sintetizados em linhagens de células humanas.....	53
5.2	PROCEDIMENTO GERAL PARA PREPARAÇÃO DAS AMIDOXIMAS 4, 5 E 6.....	54

5.3	PROCEDIMENTO GERAL PARA PREPARAÇÃO DOS DERIVADOS OXADIAZÓLICOS 7, 8 E 9	55
5.4	PROCEDIMENTO GERAL PARA PREPARAÇÃO DOS DERIVADOS 1,2,4 OXADIAZÓLICOS ACOPLADOS A DIAMINAS 10 A 15	57
5.5	PROCEDIMENTO GERAL PARA PREPARAÇÃO DOS DERIVADOS 1,2,4 OXADIAZÓLICOS ALQUILADOS 16 A 25	60
6	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	68
	APÊNDICE A - Lista de estruturas dos compostos sintetizados neste trabalho..	71
	APÊNDICE B - Espectros	72

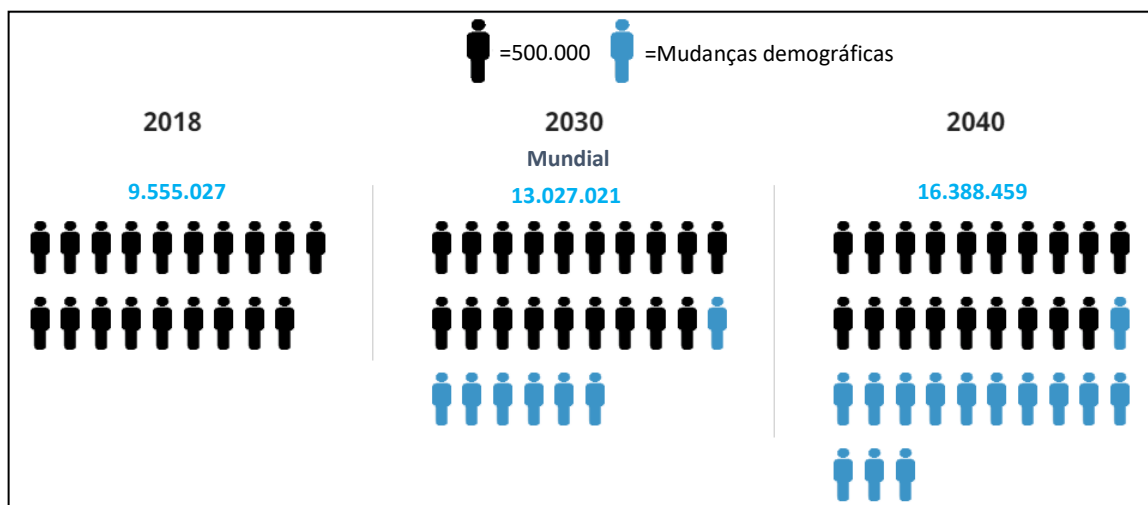
1 INTRODUÇÃO

Nessa seção serão introduzidos aspectos gerais sobre o atual panorama do câncer como um problema de saúde pública, e também serão apresentados relatos e perspectivas na investigação da ação antitumoral do heterociclo 1,2,4-oxadiazólico.

1.1 CÂNCER

A maior causa de óbitos no mundo é dada as doenças e agravos não transmissíveis (DANT), dentre as quais encontra-se o câncer, responsável pela morte de cerca de 9 milhões de pessoas por ano. Segundo dados divulgados na plataforma *The Global Cancer Observatory (GCO)* da Agência Internacional de Pesquisas do Câncer (*IARC*) a estimativa de incidência vai aumentar em 63% e taxa de mortalidade vai aumentar em 71%, chegando a causar mais de 16 milhões de mortes no mundo por ano (Figura 1).


Figura 1 - Estimativa de mortes por câncer no mundo para cada ano.



Fonte: *Global cancer observatory – cancer tomorrow.*

No Brasil, os tipos de câncer mais incidentes nos homens são: próstata (31,7%); traqueia, brônquio e pulmão (8,7%); cólon e reto (8,1%). E nas mulheres os tipos de câncer mais incidentes são: mama (29,5%); cólon e reto (9,4%); colo do útero (8,1%) (Figura 2). Além disso, a estimativa de incidência para o biênio 2018-2019 se manteve se comparado ao biênio anterior, com 600 mil novos casos para cada ano e a estimativa de mortalidade é cerca de 240 mil, deixando o país na sexta posição do ranking de incidência da doença (INCA, 2017).

Figura 2 – Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma*.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%		Homens Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil.

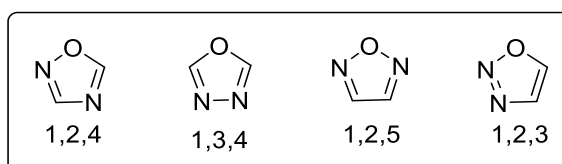
O câncer corresponde a um conjunto de mais de 100 doenças caracterizadas pelo crescimento acelerado de células cancerígenas, ou seja, células que sofreram alguma modificação maléfica devido a agentes carcinogênicos. Por se dividirem rapidamente, essas células podem invadir tecidos e órgãos, além de serem capazes de se espalharem pelo restante do corpo, entrando no processo de metástase, prejudicando a eficácia do tratamento (PECORINO, 2012).

Dependendo do tipo, da localização e da extensão do câncer, o tratamento pode ser feito por uma ou pela combinação das quatro modalidades empregadas atualmente. A cirurgia, para remoção do tumor, costuma ser realizada em casos onde o câncer está bem localizado. O transplante de medula é utilizado em casos que as células do sangue são afetadas e é necessário substituir as células doentes por células normais para reconstruir uma nova medula óssea. A radioterapia é utilizada no intuito de destruir ou impedir que os tumores cresçam. E a quimioterapia utiliza-se de medicamentos que são ministrados por diversas vias, sendo a intravenosa a mais usual. Estes medicamentos são distribuídos para diferentes áreas do corpo afim de alcançarem as células cancerígenas. A maior barreira que essa modalidade de tratamento enfrenta é a falta de seletividade desses medicamentos. Uma vez que eles não são capazes de atuar exclusivamente na célula doente, eles acabam atingindo células normais e gerando assim diversos efeitos colaterais (PECORINO, 2012). Além disso, esses tratamentos não asseguram a cura para diversos tipos da doença o que eleva a importância pela pesquisa no desenvolvimento de novos fármacos eficazes, que diminuam os efeitos colaterais e atuem sobre forma resistentes da doença.

1.2 OXADIAZÓIS

Os heterociclos representam uma classe de importância na construção de novos compostos bioativos. A literatura reporta diversos heterociclos contendo nitrogênio e/ou oxigênio que estão presentes em diversos fármacos já aprovados para uma ampla gama de patologias (VITAKU, *et al.*, 2014; DELOST, *et al.*, 2018). Os oxadiazóis são heterociclos aromáticos de cinco membros contendo dois átomos de nitrogênio e um átomo de oxigênio e a importância da sua presença em compostos biologicamente ativos vem sendo reportada ao longo do tempo na literatura. Seus regioisômeros estão apresentados na Figura 3 (BOSTROM, *et al.* 2012).

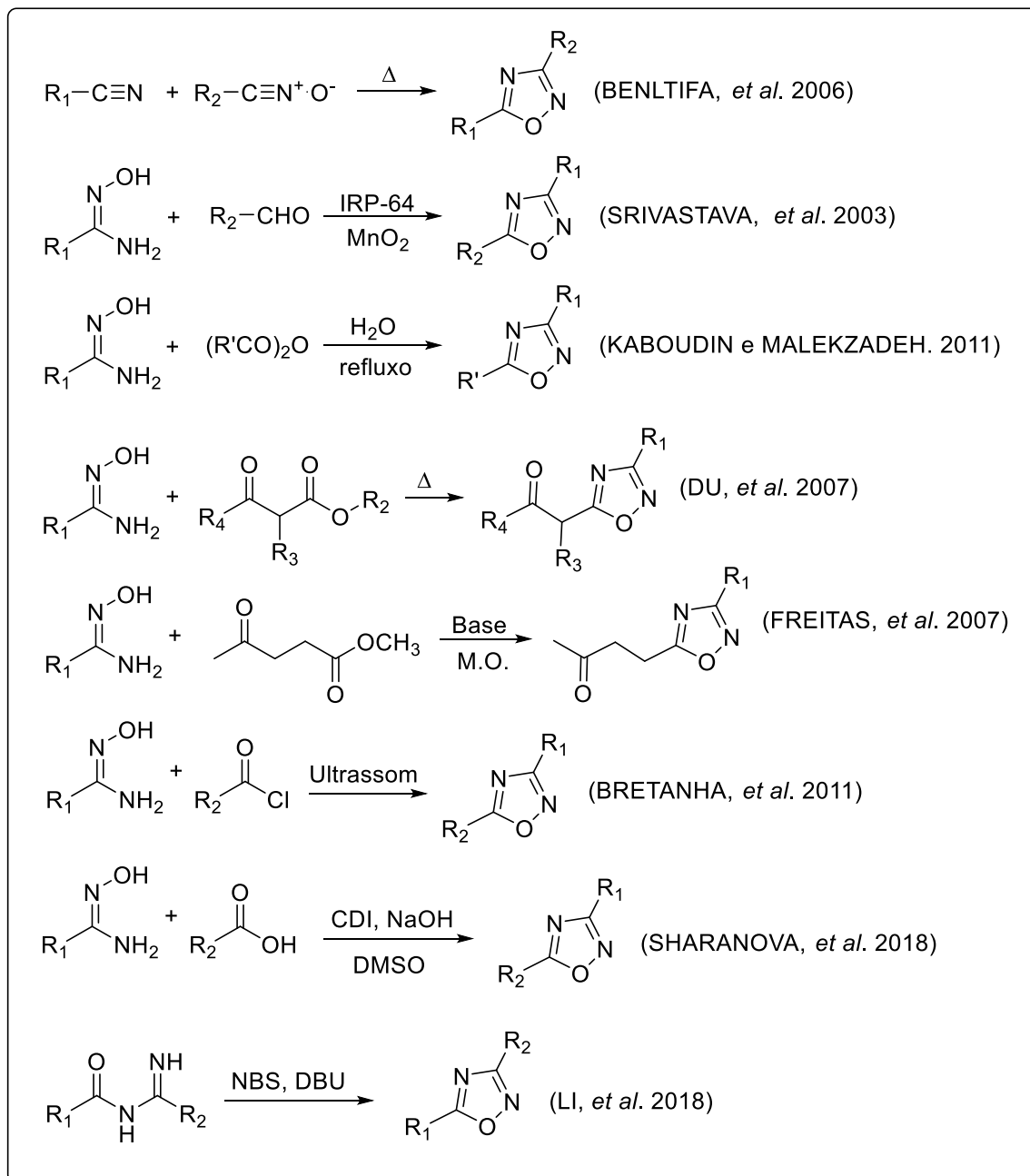
Figura 3 - Estrutura dos regioisômeros oxadiazólicos.



Fonte: Elaborada pela própria autora.

Os regioisômeros 1,2,4-oxadiazólicos são geralmente substituídos nas posições 3 e 5 e na literatura é possível encontrar diversas metodologias sintéticas para sua obtenção. Exemplos dessas metodologias podem ser vistos no Esquema 1 como a cicloadição 1,3,-dipolar de nitrilas e *N*-óxidos e nitrilas (BENLTIFA, *et al.* 2006). Outra estratégia consiste na reação de amidoximas com aldeídos, descrita por Srivastava e colaboradores (SRIVASTAVA, *et al.* 2003), amidoximas com anidridos (KABOUDIN e MALEKZADEH, 2011) e amidoximas com β -ceto ésteres (DU, *et al.* 2007). Também é possível encontrar na literatura trabalhos que utilizam de técnicas não-clássicas de síntese, como irradiação por micro-ondas sem solvente (FREITAS, *et al.* 2007) e irradiação por ultrassom (BRETANHA, *et al.* 2011). A metodologia utilizando a reação entre amidoximas e ácidos carboxílicos é amplamente descrita na literatura, como exemplo podemos citar o trabalho de Sharanova e colaboradores que em 2018 divulgaram um método *one-pot* para essa reação (SHARANOVA, *et al.* 2018). No mesmo ano, Li e colaboradores publicaram a formação de ligação N-O para síntese do núcleo 1,2,4-oxadiazólico com auxílio de NBS e DBU (LI, *et al.* 2018) (Esquema 1).

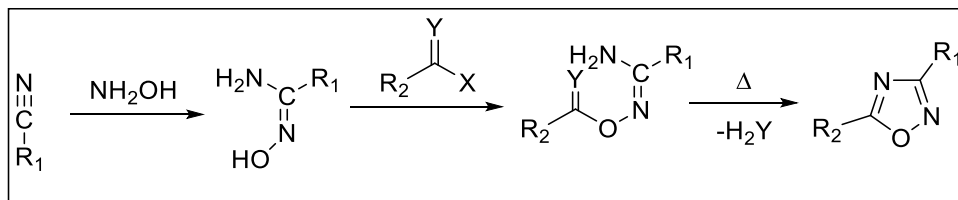
Esquema 1 - Metodologias de obtenção de 1,2,4-oxadiazóis 3,5-disubstituídos.



Fonte: Elaborada pela própria autora.

Além dos métodos descritos no Esquema 1 destaca-se também a formação de 1,2,4-oxadiazóis via formação de *O*-acilamidoximas seguida de ciclização e desidratação (PACE, *et al.*, 2015) (Esquema 2), metodologia usada nesse trabalho.

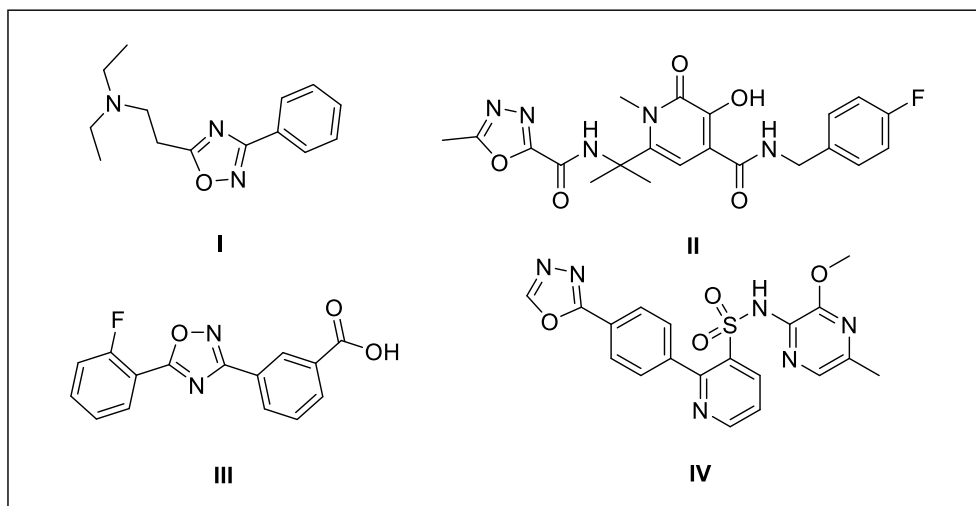
Esquema 2 - Estratégia de síntese para obtenção de 1,2,4-oxadiazóis via formação de *O*-acilamidoximas.



Fonte: Adaptado de (PACE *et al.*, 2015).

O núcleo oxadiazólico está presente na estrutura química de diversos medicamentos, podendo citar como exemplo a oxolamina (**I**), medicamento comercializado na década de 1960. Pode-se destacar também o antirretroviral raltegravir (**II**) que foi lançado no mercado para o tratamento de HIV, o ataluren (**III**), indicado no tratamento da distrofia muscular de Duchenne e o zibotentan (**IV**) que está em estágio clínico avançado para o tratamento do câncer de próstata (BOSTROM *et al.*, 2012) (Figura 4).

Figura 4 - Derivados oxadiazólicos com ação biológica.

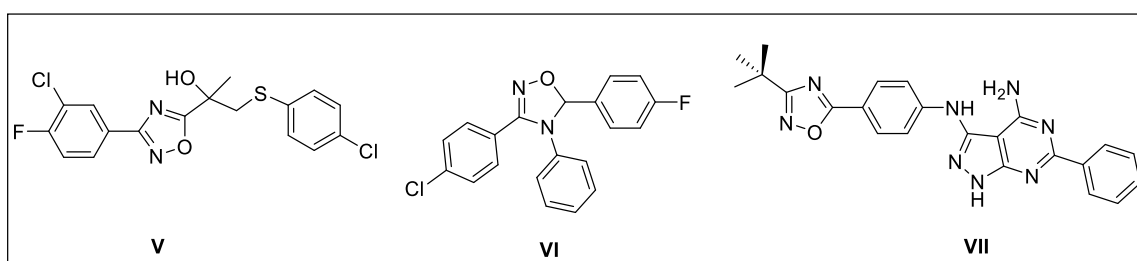


Fonte: Elaborado pela própria autora.

A atividade antitumoral de compostos contendo o núcleo 1,2,4-oxadiazólico é bem descrita na literatura. Em 2012, Khatik e colaboradores sintetizaram uma série de derivados 1,2,4-oxadiazólicos e obtiveram resultados promissores ($CI_{50}=0,50\pm 0,06\mu M$) com o composto (**V**) frente ao câncer de próstata (DU-145), quando comparado ao composto de referência Doxorrubicina ($CI_{50}=5,80\pm 0,58\mu M$) (KHATIK, *et al.*, 2012). No ano seguinte, Miralinaghi e

colaboradores realizaram ensaios biológicos com derivados 1,2,4-oxadiazólicos e destacaram o composto (**VI**) como promissor após avaliação da atividade anticancerígena frente a células de câncer de mama (MCF7) quando comparado com o composto de referência paclitaxel (MIRALINAGHI, *et al.*,2013). E no ano de 2016, Maftai e colaboradores reportaram compostos contendo o núcleo 1,2,4-oxadiazólico que foram avaliados frente a quarenta e duas linhagens de células tumorais humanas, destacando o composto (**VII**) que apresentou CI_{50} entre $1,14\mu M$ a $9,27\mu M$ (MAFTEI, *et al.*, 2016) (Figura 5).

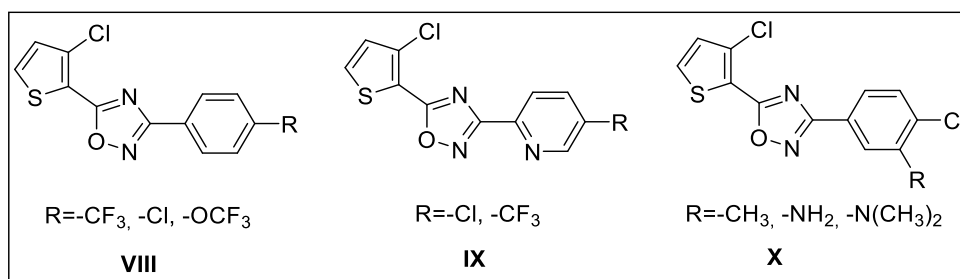
Figura 5 - Derivados 1,2,4-oxadiazólicos com atividade antitumoral.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Os relatos mais recentes na literatura que envolvam a síntese e a avaliação antitumoral de compostos que contenham o núcleo 1,2,4-oxadiazólico e tiofeno datam de 2005 e 2009. Nesses trabalhos foram obtidos oxadiazóis (**VIII-X**) que apresentaram valores de EC_{50} menor que $3,0\mu M$ frente a células cancerígenas de mama e cólon (ZHANG *et al.*,2005) (KEMNITZER *et al.*, 2009) (Figura 6).

Figura 6 - Derivados 1,2,4-oxadiazólicos com tiofeno que apresentaram atividade antitumoral.

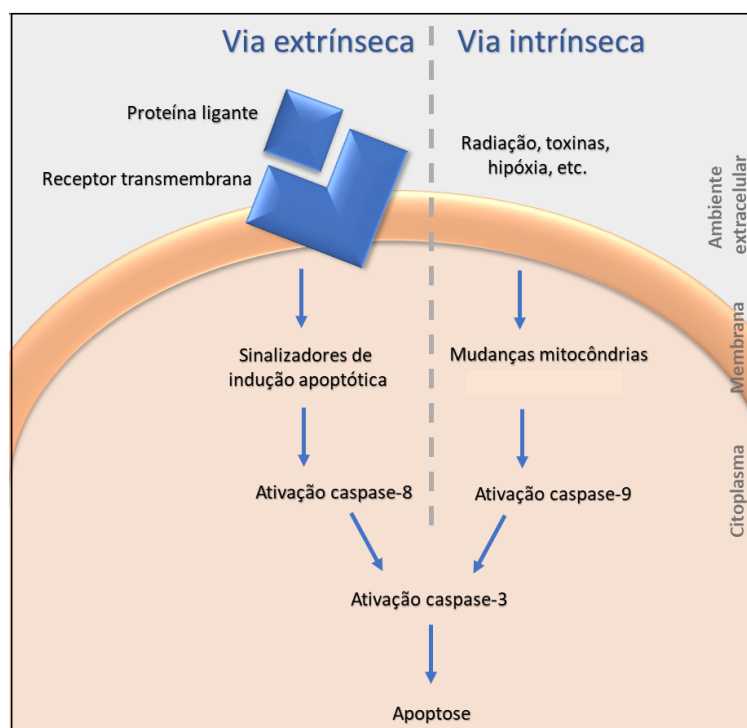


Fonte: Elaborado pela própria autora.

Nos trabalhos de Zhang e de Kemnitzer, os compostos **VIII-X** são reportados como ativadores de caspase-3 (ZHANG *et al.*,2005) (KEMNITZER *et al.*, 2009). Essa enzima tem

um papel importante nas principais vias apoptóticas (via intrínseca e via extrínseca) uma vez que induzem o processo apoptótico celular. Compostos bioativos e apoptóticos podem atuar na via extrínseca, interagindo com proteínas ligantes ou seus receptores transmembrânicos que, por sua vez, iniciam cascatas de sinalizadores citoplasmáticos que levam a apoptose celular. Outra opção é sua atuação na via intrínseca, onde tais compostos podem atuar no ambiente extracelular e induzir condições que ativem mecanismos mitocondriais apoptóticos. (ELMORE, 2007) (Figura 7).

Figura 7 – Representação esquemática simplificada de eventos apoptóticos.



Fonte: Adaptado de Elmore, 2007.

Nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo ao longo dos anos, pesquisas voltadas para a avaliação antitumoral de derivados oxadiazólicos e os resultados obtidos e divulgados até o momento concordam com a literatura e destacam o potencial desses compostos na atividade antitumoral (Figura 8) (CANESCHI, 2013; CANESCHI, 2015; CANESCHI, *et al.* 2019).

Em 2013 nosso grupo de pesquisa sintetizou e avaliou a citotoxicidade de uma série de 1,3,4-oxadiazóis (Figura 8). Dos derivados testados, quatro deles foram ativos contra as linhagens de células tumorais HeLa e RKO, e apresentaram baixa toxicidade com a linhagem

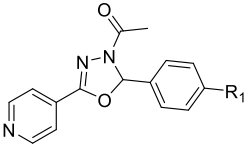
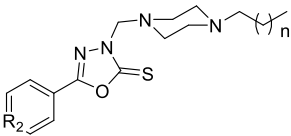
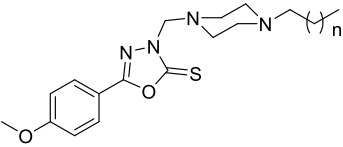
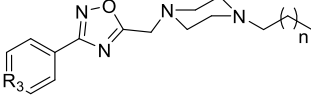
WI-26 VA4, fibroblasto de pulmão que não é considerada uma linhagem tumoral. Um dos compostos foi mais ativo que o fosfato de etoposídeo, um agente anticancerígeno padrão, contra a linhagem HeLa.

O índice de seletividade (IS) pode indicar a seletividade de um composto entre uma linhagem neoplásica e uma normal, indicando o potencial uso deste composto em testes clínicos. Comparando os valores de CI_{50} na relação $IS = CI_{50} \text{ WI-26} / CI_{50} \text{ HeLa}$ ou RKO, nossos compostos apresentaram altos índices de seletividade com valores de 54,5 e 78,9 comparados ao etoposídeo ($IS = 0,4$). Sabe-se que um dos grandes desafios na pesquisa para a busca de antitumorais eficientes é a atuação do fármaco de forma seletiva na célula tumoral preservando assim a célula saudável. Esse trabalho resultou em um depósito de patente em 2013, sendo o pedido depositado no INPI em 30/04/2013 (número do pedido: BR1020130106100) (CANESCHI, 2013).

Resultados publicados em 2019 por nosso grupo de pesquisas (Figura 6) demonstraram que derivados 1,3,4-oxadiazólicos contendo piperazinas lipofílicas apresentaram citotoxicidade promissora para as células testadas, com altos índices de seletividade, variando de 4,3 a 19,6, maiores que o controle positivo. Além disso, os compostos demonstraram um perfil de atividade interessante, no qual verificou um aumento da atividade biológica com o aumento da lipofilicidade dos mesmos. Dessa forma, altos índices citotóxicos e seletivos foram verificados para aqueles compostos contendo a cadeia alquila de doze carbonos, resultados esses similares já encontrados na literatura (CANESCHI *et al.*, 2019). Derivados 1,2,4-oxadiazólicos também descritos no trabalho de Caneschi e colaboradores (2019) apresentaram resultados significativos para as células testadas, os quais continham o grupo piperazina alquilado com cadeias de dez e doze átomos de carbono, com valores de CI_{50} de $1,0 \pm 4,0 \mu\text{M}$ e $8,1 \pm 1,6 \mu\text{M}$, respectivamente. Além disso, os resultados mostraram alto valor de índice de seletividade (IS) para os mesmos contra a linhagem celular 4T1 (carcinoma murinho de mama), variando de 4,7 a 18,8. Foi possível notar também nesse trabalho que, os melhores resultados de citotoxicidade estão relacionados aos derivados 1,2,4-oxadiazólicos e 1,3,4-oxadiazólicos contendo o grupo fenil ligado aos heterociclos, verificando-se a importante influência do heterociclo na atividade citotóxica contra a células tumorais, destacando as altas seletividades que os compostos exibiram, principalmente aquelas estruturas alquiladas com cadeia de dez átomos de carbonos

(CANESCHI *et al.*, 2019) (CANESCHI, 2013) (CANESCHI, 2015) (CANESCHI, 2016) (ENES, 2017).

Figura 8 - Derivados 1,2,4- e 1,3,4-oxadiazólicos sintetizados pelo nosso grupo de pesquisa que apresentaram relevante atividade antitumoral.

	HeLa		RKO		
	Compostos	CI ₅₀ (μM±SD)	IS _{WI-26 V4A}	CI ₅₀ (μM±SD)	IS _{WI-26 V4A}
	X=4F	(59,7±1,7)	5,0	(5,5±0,3)	54,5
	X=4Br	(70,8±4,9)	4,2	(3,8±0,3)	78,9
	X=4CF ₃	(43,0±2,4)	7,0	(65,9±2,4)	4,5
	X=4O(CH ₂) ₁₃ CH ₃	(27,1±2,9)	11,0	(43,3±2,9)	6,9
Etoposídeo	(42,4±1,4)	0,2	(23,8±1,4)	0,4	
	4T1				
	Composto	CI ₅₀ (μM±SD)	IS _{BHK-21}		
	R ₂ =N; n=8	(3,55±0,2)	6,4		
	R ₂ =N; n=10	(2,55±0,1)	6,4		
	R ₂ =N; n=12	(3,20±2,4)	19,6		
	R ₂ =CH; n=8	(1,90±0,1)	16,7		
	R ₂ =CH; n=10	(1,60±0,3)	14,5		
	R ₂ =CH; n=12	(3,10±0,4)	4,3		
Daunorrubicina	(0,3±0,01)	0,3			
	CT26.WT				
	Composto	CI ₅₀ (μM±SD)	IS _{BHK-21}		
	n=8	(3,90±0,1)	5,6		
	n=10	(1,60±0,7)	13,8		
	n=12	(3,40±0,2)	6,2		
Daunorrubicina	(0,42±0,04)	0,2			
	4T1				
	Composto	CI ₅₀ (μM±SD)	IS _{BHK-21}		
	R ₃ =H; n=6	(1,0±4,1)	56,3		
	R ₃ =H; n=8	(3,6±0,5)	18,4		
	R ₃ =H; n=10	(8,1±1,6)	8,8		
	R ₃ =H; n=12	(26,4±9,1)	-		
	R ₃ =CF ₃ ; n=8	(16,6±1,0)	1,0		
	R ₃ =CF ₃ ; n=10	(41,4±3,4)	0,5		
	R ₃ =CF ₃ ; n=12	(25,6±0,5)	0,9		
Daunorrubicina	(0,3±0,01)	0,3			

Fonte: Elaborada pela própria autora.

A especialidade oncológica tem despertado o interesse de muitos pesquisadores para o desenvolvimento de novos fármacos, devido à deficiência de um arsenal terapêutico abrangente e eficaz. Sabe-se que as classes dos heterociclos oxadiazólicos apresentam potenciais biológicos, sendo assim, é importante a síntese de compostos que possuam ambos, para investigação da relação entre a estrutura dos compostos e a atividade antitumoral resultante.

2 OBJETIVOS

Nessa seção serão apresentados os objetivos traçados para esse trabalho a partir das perspectivas citadas na introdução.

2.1 OBJETIVO GERAL

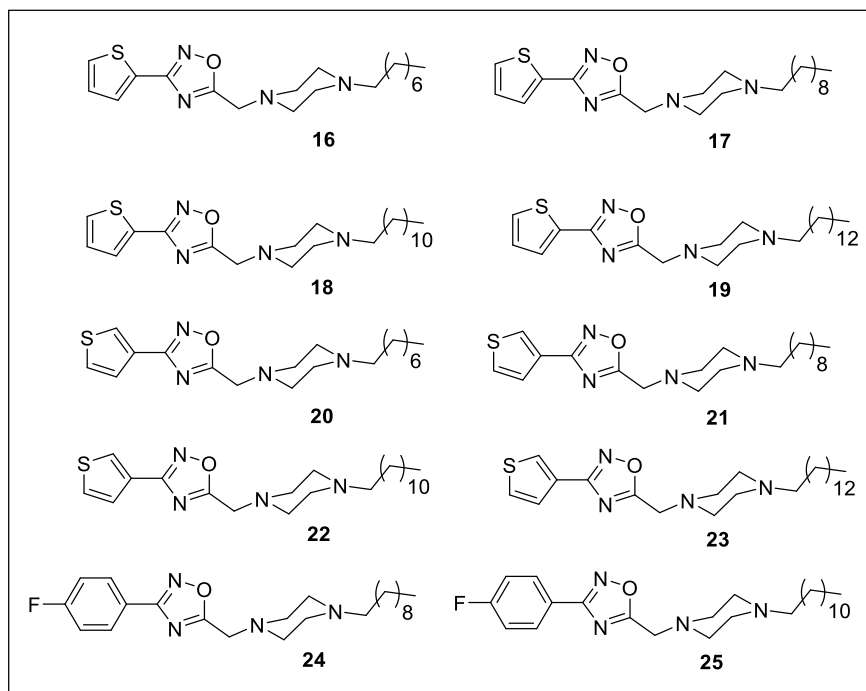
Como comentado anteriormente, trabalhos do nosso grupo de pesquisas demonstraram que os derivados oxadiazólicos possuem um perfil de atividade interessante, no qual verificasse um aumento da atividade biológica com o aumento da lipofilicidade dos mesmos, e além disso, apresentam altos índices de seletividade (CANESCHI, 2016) (CANESCHI *et al*, 2019). Essa mesma constatação é encontrada na literatura, fato esse que pode estar relacionado com a farmacocinética e farmacodinâmica do composto (TAVEIRA *et al.*, 2007) (FERNANDES *et al.*, 2013).

Desse modo, esse trabalho visa a síntese e a caracterização de novos derivados 1,2,4-oxadiazólicos alquilados bem como a avaliação das possíveis citotoxicidades frente a variadas linhagens de células tumorais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Sintetizar, purificar e caracterizar os derivados 1,2,4-oxadiazólicos alquilados 16-19 a partir da 2-tiofenocarbonitrila (Figura 9);
- 2) Sintetizar, purificar e caracterizar os derivados 1,2,4-oxadiazólicos alquilados 20-23 a partir da 3-tiofenocarbonitrila (Figura 9);
- 3) Sintetizar, purificar e caracterizar os derivados 1,2,4-oxadiazólicos alquilados 24 e 25 a partir da 4-fluorbenzonitrila (Figura 9);

Figura 9 - Produtos finais planejados para este trabalho.



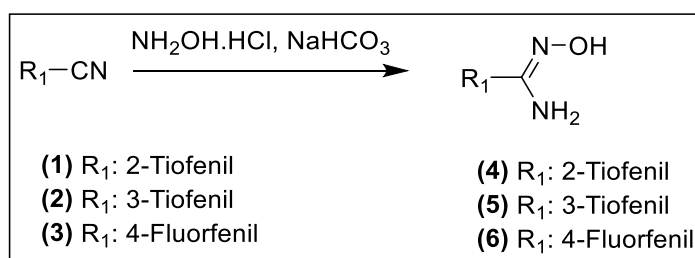
Fonte: Elaborado pela própria autora

4) Avaliar o potencial citotóxico dos oxadiazóis **16-25** e seus precursores por meio da determinação do CI_{50} e da viabilidade celular em diferentes linhagens de células tumorais humanas e animais e uma linhagem não tumoral. Pretende-se ainda realizar ensaio clonogênico, analisar o ciclo celular e a indução de morte celular por apoptose por citometria de fluxo. O ensaio clonogênico permite a avaliação das diferenças na viabilidade reprodutiva entre as células controle não tratadas e as células submetidas a vários tipos de tratamentos, como exposição à radiação ionizante ou componente químico. Sendo assim, espera-se observar a capacidade das células de produzir progênie, isto é, uma única célula formar uma colônia. Já a análise do ciclo celular por citometria de fluxo permite discriminar a fase do ciclo celular em que uma célula se encontra, medindo-se o conteúdo de DNA nuclear por meio da citometria de fluxo. Os testes de CI_{50} em linhagens de tumores animais serão realizados em colaboração com a Prof^a Dr^a Heveline Silva do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais. Já os testes de CI_{50} em linhagens de tumores humanos, o ensaio clonogênico, a análise do ciclo celular por citometria de fluxo e a análise da indução de morte celular por apoptose por citometria de fluxo serão realizados em colaboração com a pesquisadora Dr^a Luciana Maria Silva da Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte.

3 PLANO DE SÍNTESE

A obtenção dos derivados oxadiazólicos iniciará pela reação entre a hidroxilamina e as respectivas nitrilas, 2-tiofenocarbonitrila (**1**), 3-tiofenocarbonitrila (**2**) e 4-fluorbenzonitrila (**3**), para formação das respectivas amidoximas (**4, 5 e 6**) (Esquema 3) (FLIPO *et al.*, 2011).

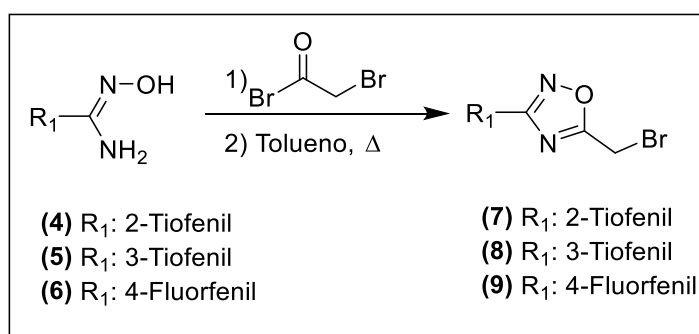
Esquema 3 - Plano de síntese das amidoximas.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

As amidoximas (**4, 5 e 6**) obtidas serão submetidas à reação com brometo de bromo acetila, em meio básico. Em seguida, a mistura reacional será tratada e levada à aquecimento com tolueno para a obtenção dos derivados 1,2,4-oxadiazólicos (**7, 8 e 9**) (Esquema 4) (COTTRELL, *et al.*, 2004).

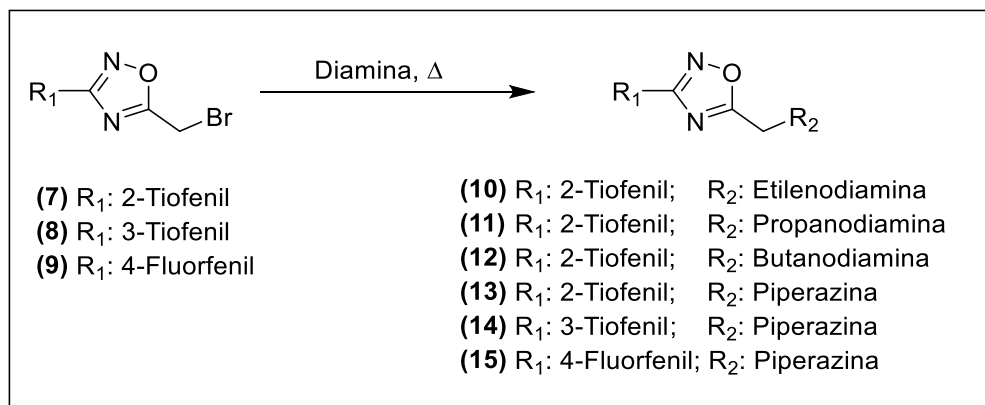
Esquema 4 - Plano de síntese dos derivados 1,2,4-oxadiazólicos.



Fonte: Elaborada pela própria autora.

Na sequência, os derivados 1,2,4-oxadiazólicos (**7, 8 e 9**) serão submetidos a reação com diaminas para formação dos compostos **10 a 15** (Esquema 5) (OZCAN, *et al.*, 2013).

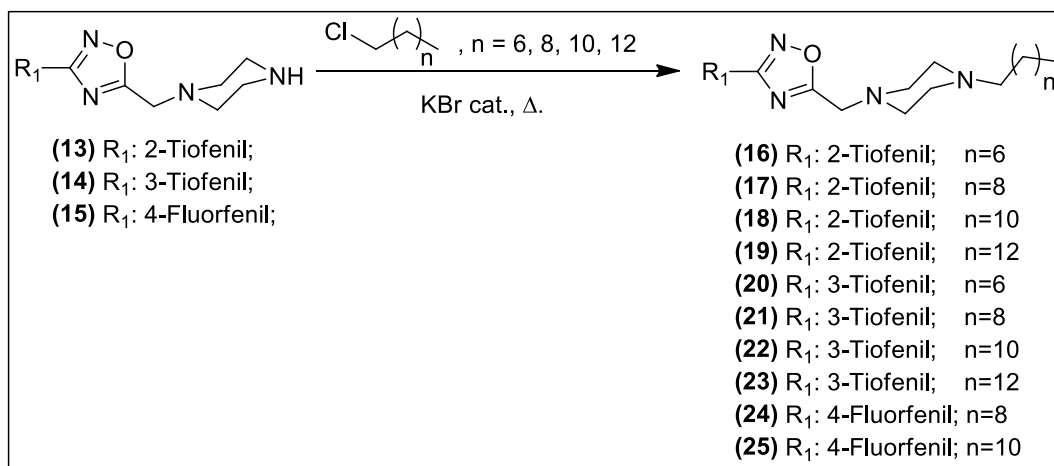
Esquema 5 - Plano de síntese dos derivados 1,2,4-oxadiazólicos acoplados a diaminas.



Fonte: Elaborada pela própria autora.

Para enfim obter os derivados 1,2,4-oxadiazólicos alquilados (**16-25**), os intermediários **13**, **14** e **15** serão submetidos à reação com diferentes cloretos de alquila na presença de quantidades catalíticas de brometo de potássio (Esquema 6) (ALABUGIN *et al.*, 2002).

Esquema 6 - Plano de síntese dos derivados 1,2,4-oxadiazólicos alquilados.



Fonte: Elaborada pela própria autora.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nessa seção serão apresentados os resultados obtidos e as discussões a partir deles.

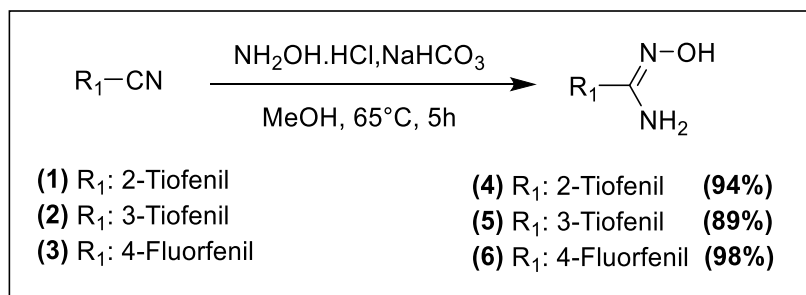
4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS OXADIAZÓLICOS PROPOSTOS

As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando luz UV e I₂ como reveladores. Após o término das reações, os produtos foram purificados por extração líquido-líquido e/ou cromatografia em coluna de sílica (CCS). Todos os compostos sintetizados foram caracterizados através de faixa de fusão (FF), quando sólidos, espectros na região do infravermelho (IV) e espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e de ¹³C.

Devido às semelhanças estruturais entre os compostos, serão discutidos apenas os espectros de um dos derivados sintetizados em cada etapa.

4.1.1 Síntese e caracterização das amidoximas 4, 5 e 6

Esquema 7 - Síntese das amidoximas 4-6.

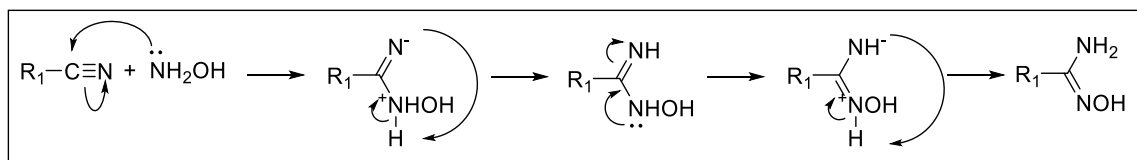


Fonte: Elaborada pela própria autora.

As amidoximas **4**, **5** e **6** foram obtidas como descrito por FLIPO e colaboradores em 2011. As tiofenocarbonitrilas e a 4-fluorfenilcarbonitrila, foram tratadas separadamente com cloridrato de hidroxilamina e bicarbonato de sódio em metanol, sob agitação magnética e refluxo (Esquema 7). O término das reações foi verificado após 5h com auxílio de CCD (eluente: 100% CH₂Cl₂; revelador: luz ultravioleta). A mistura reacional foi extraída com AcOEt e H₂O, a fase orgânica foi separada, tratada com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente removido por evaporação sob pressão reduzida. As amidoximas **4**, **5** e **6** foram obtidas puras na

forma de um óleo levemente amarelado com rendimentos de 94%, 89% e 98%, respectivamente. O esquema 8 propõe um mecanismo para essa reação.

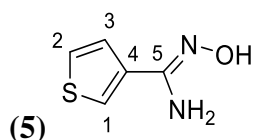
Esquema 8 - Mecanismo proposto para formação das amidoximas.



Fonte: Baseado em Voros, *et al.*, 2014.

A seguir serão discutidos os espectros de IV e RMN de ^1H e ^{13}C para a amidoxima **5**.

(Z)-N'-hidroxitiofen-3-carboximidamida



Fórmula molecular: $\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2\text{OS}$

Massa molar: 142 g mol^{-1}

Estado físico: Óleo amarelado

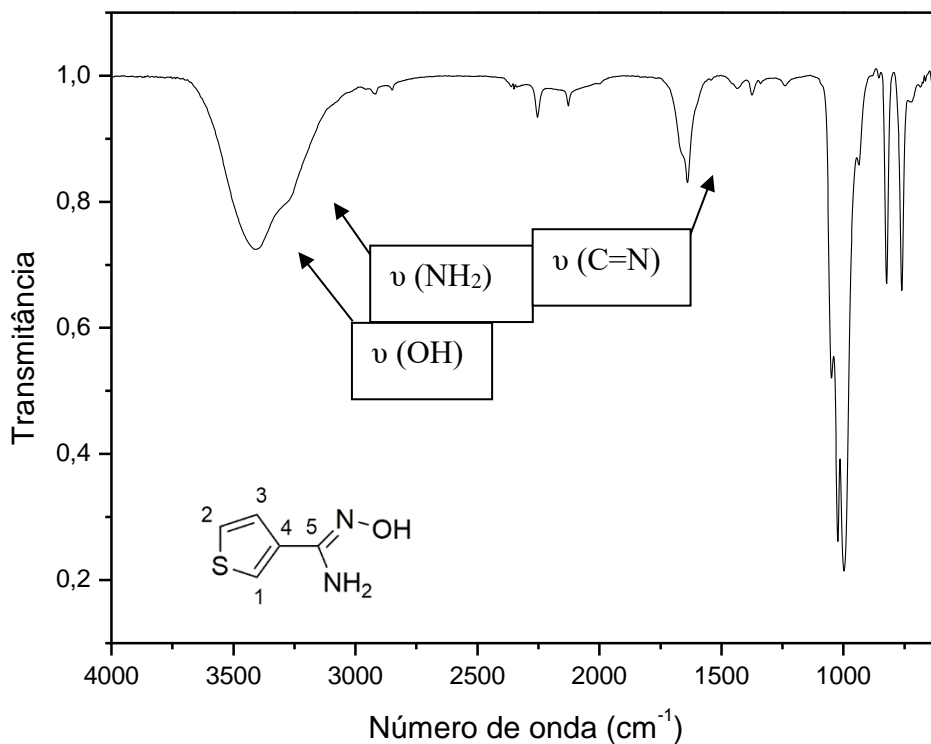
Rendimento: 89%

No espectro de IV (Figura 10) observa-se uma banda de absorção referente ao estiramento OH em 3411 cm^{-1} , outra banda em 3263 cm^{-1} referente ao estiramento NH_2 e também uma banda em 1635 cm^{-1} referente ao estiramento $\text{C}=\text{N}$.

Pelo espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$; 500 MHz) (Figura 11) pode-se observar um simpleto em δ 9,46 referente ao hidrogênio da hidroxila; três duplos dupletos centrados em δ 7,80 (1H; $^4J = 1,0 \text{ Hz}$; $^3J = 2,8 \text{ Hz}$), δ 7,49 (1H; $^4J = 2,9 \text{ Hz}$; $^3J = 5,0 \text{ Hz}$) e δ 7,32 (1H; $^4J = 1,0 \text{ Hz}$; $^3J = 5,0 \text{ Hz}$) referentes ao hidrogênios H1, H3 e H2, respectivamente, e um simpleto em δ 5,76 referente aos hidrogênios NH_2 .

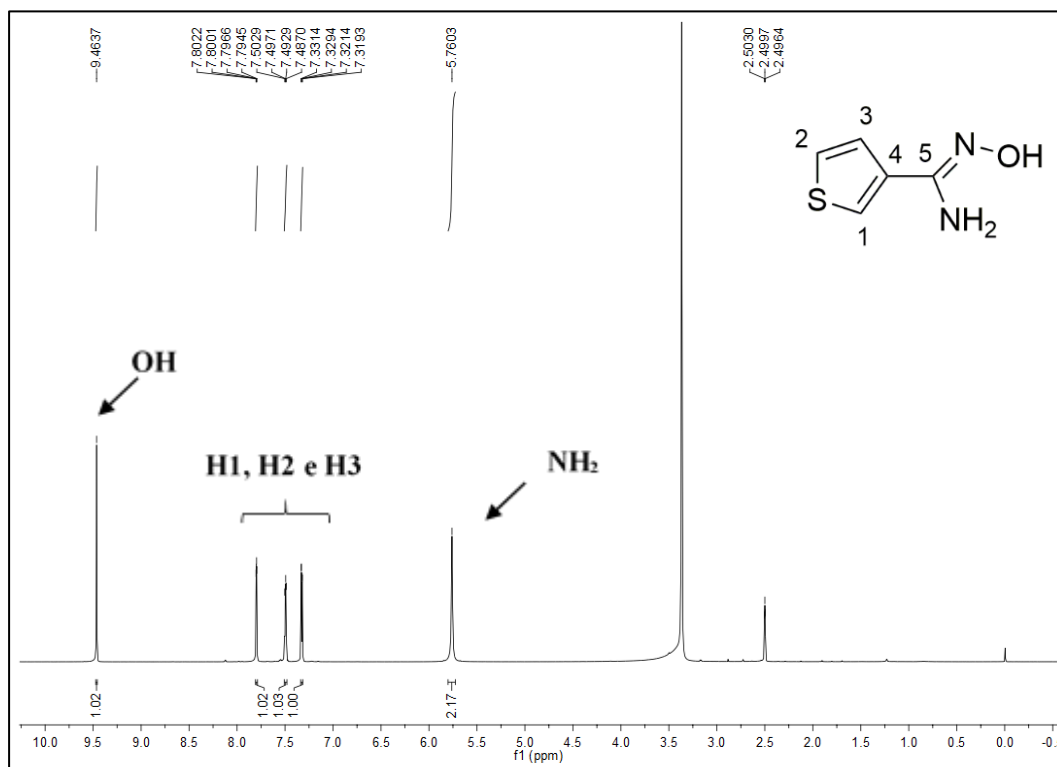
A partir da análise do espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$; 125 MHz) (Figura 12) pode-se observar os sinais dos carbonos C1, C2, C3 e C4 do anel heterocíclico entre δ 135,4 e δ 122,3; e o carbono C5 em δ 148,0.

Figura 10 - Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (5).



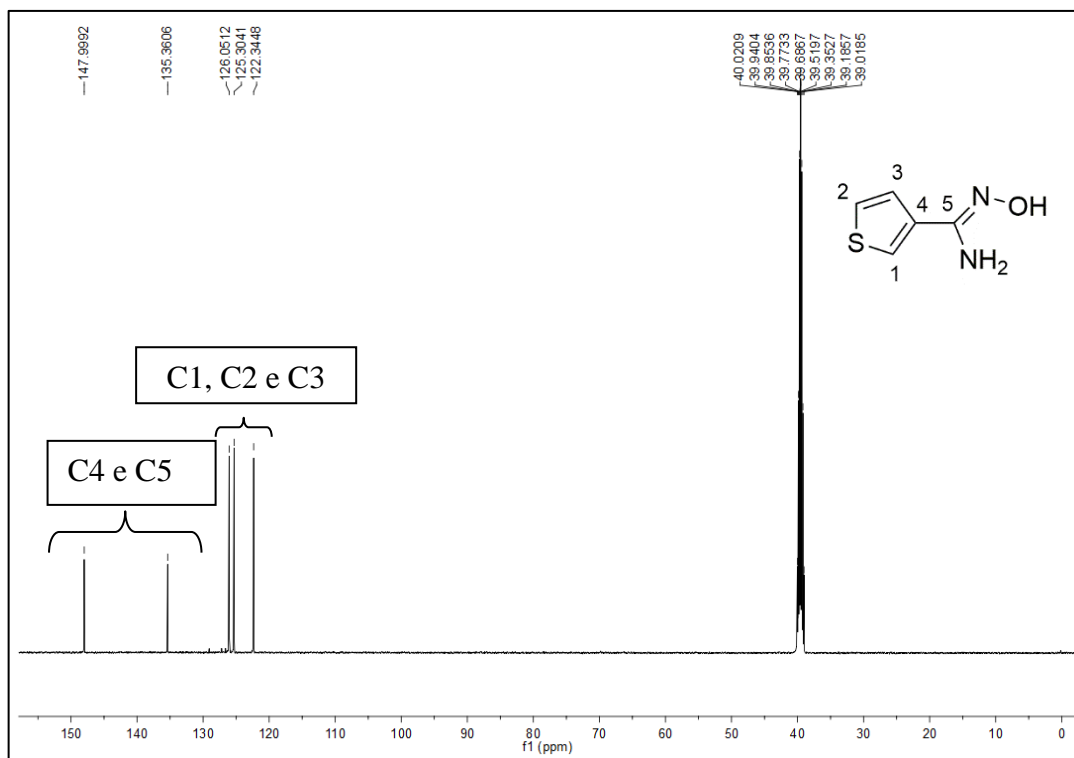
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Figura 11 - Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$; 500 MHz) do composto (5).



Fonte: Elaborada pela própria autora.

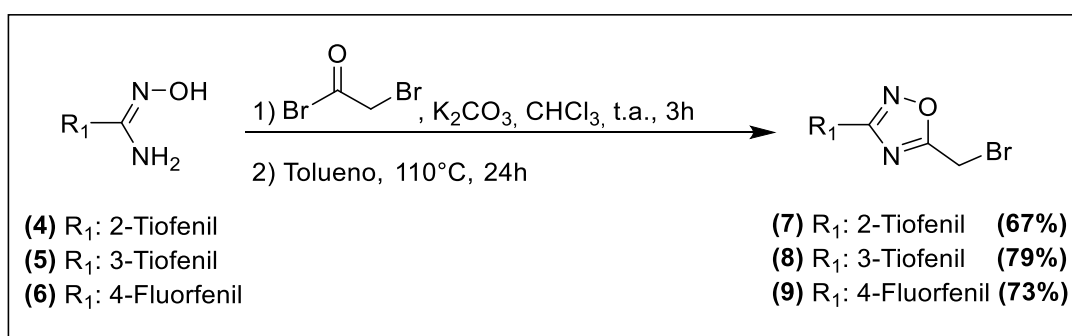
Figura 12: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 ; 125 MHz) do composto (5).



Fonte: Elaborada pela própria autora.

4.1.2 Síntese e caracterização dos derivados 1,2,4 oxadiazólicos 7, 8 e 9

Esquema 9 - Síntese dos derivados 1,2,4-oxadiazólicos 7-9.

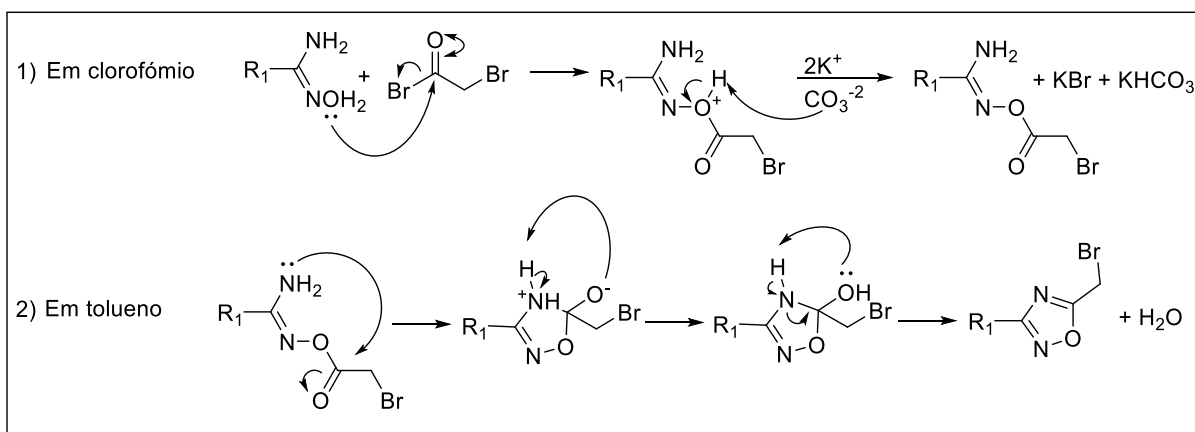


Fonte: Elaborada pela própria autora.

Os oxadiazóis **7**, **8** e **9** foram obtidos como descrito por COTTRELL e colaboradores em 2004, pela reação das amidoximas, previamente obtidas, com brometo de bromo acetila e carbonato de potássio em clorofórmio (Esquema 9). As misturas de reações foram mantidas sob agitação magnética e temperatura ambiente por 3h quando verificou-se o término das reações

com auxílio de CCD (eluente: 100% CH₂Cl₂; revelador: luz ultravioleta). As misturas reacionais foram extraídas com AcOEt e H₂O. As fases orgânicas foram separadas, tratadas com Na₂SO₄ anidro, filtradas e os solventes removidos por evaporação sob pressão reduzida. Os resíduos obtidos de cada uma das reações foram solubilizados em tolueno, e as reações foram mantidas sob agitação magnética e refluxo por 24h. O término das mesmas foi verificado por CCD (eluente: 100% CH₂Cl₂; revelador: luz ultravioleta). Em seguida, para cada reação, o solvente foi removido por evaporação sob pressão reduzida e os produtos foram obtidos na forma de sólidos após purificação por CCS (eluente: gradiente hexano/acetato de etila: 80%/20% v/v) com rendimentos de 67%, 79% e 73%, respectivamente. O esquema 10 propõe um mecanismo para essa reação.

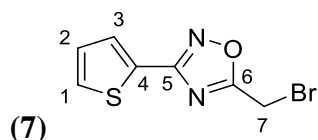
Esquema 10 - Mecanismo proposto para formação dos derivados 1,2,4-oxadiazólicos.



Fonte: Elaborada pela própria autora, baseada em Katritzky, *et al.*, 2008.

A seguir serão discutidos os espectros de IV e RMN de ¹H e ¹³C para o oxadiazol 7.

5-(bromometil)-3-(tiofen-2-il)-1,2,4-oxadiazol



Fórmula molecular: C₇H₅BrN₂OS

Massa molar: 245 g mol⁻¹

Estado físico: Sólido branco

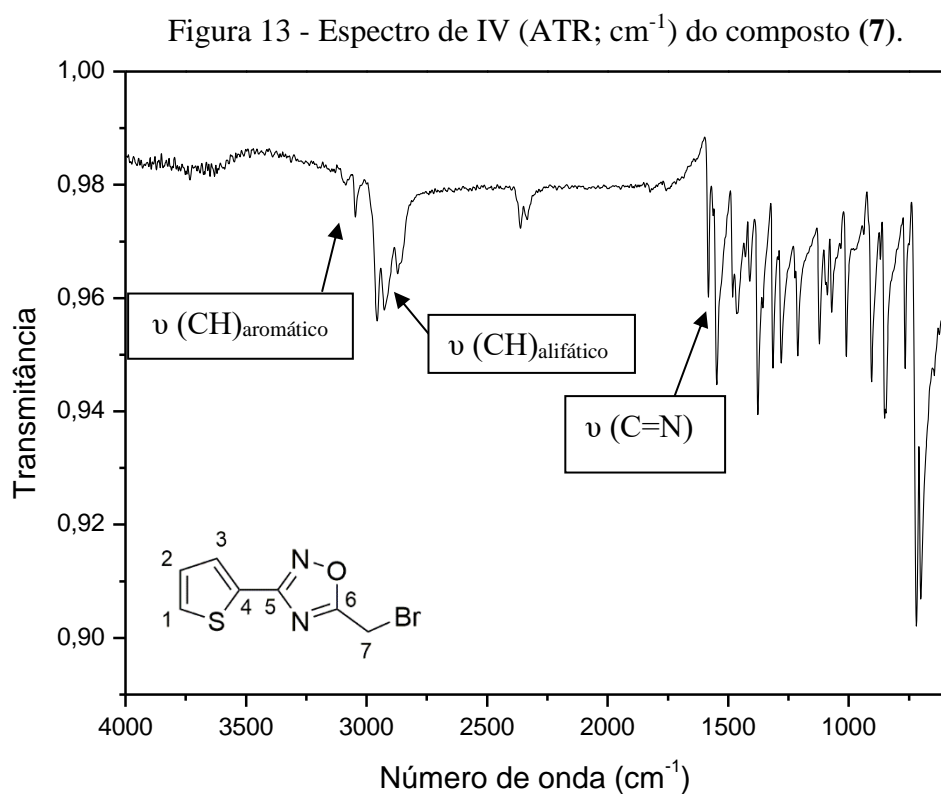
Faixa de Fusão: 47-48°C

Rendimento: 67%

No espectro de IV (Figura 13) observa-se uma banda de absorção referente ao estiramento CH de aromático em 3049 cm⁻¹, outra banda em 2955 cm⁻¹ referente ao estiramento CH de alifático e também uma banda em 1571 cm⁻¹ referente ao estiramento C=N.

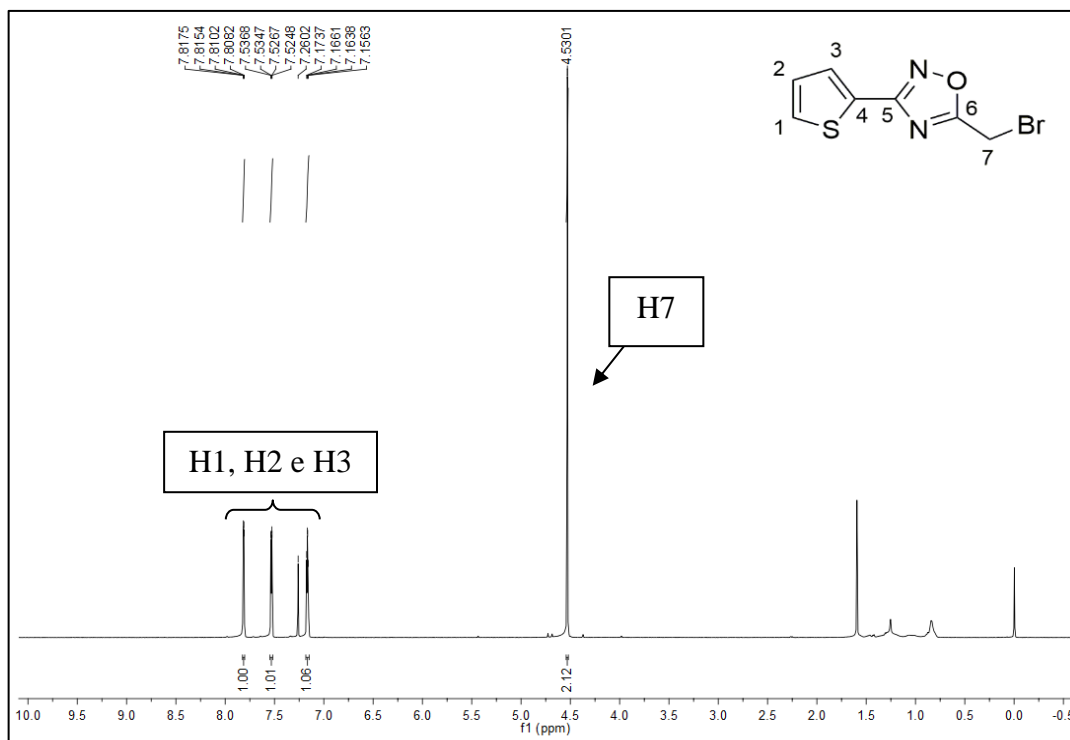
Pelo espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) (Figura 14) pode-se observar três duplos dupletos centrados em δ 7,81 (1H; $^4J = 1,0$ Hz; $^3J = 3,6$ Hz), δ 7,53 (1H; $^4J = 1,0$ Hz; $^3J = 5,0$ Hz) e δ 7,16 (1H; $^3J = 3,8$ Hz; $^3J = 5,0$ Hz) referentes aos hidrogênios H1, H3 e H2, respectivamente, e um simpleto em δ 4,53 referente aos hidrogênios metilênicos H7.

A partir da análise do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) (Figura 15) pode-se observar os sinais dos carbonos C6 e C5 em δ 174,7 e δ 165,1, respectivamente, evidenciando a formação do ciclo. Além disso, o espectro mostra os sinais em δ 130,1, δ 129,9 e δ 128,2 referentes aos carbonos C1, C2 e C3; em δ 127,7 referente ao carbono não hydrogenado C4 e em δ 16,3 referente ao carbono C7.



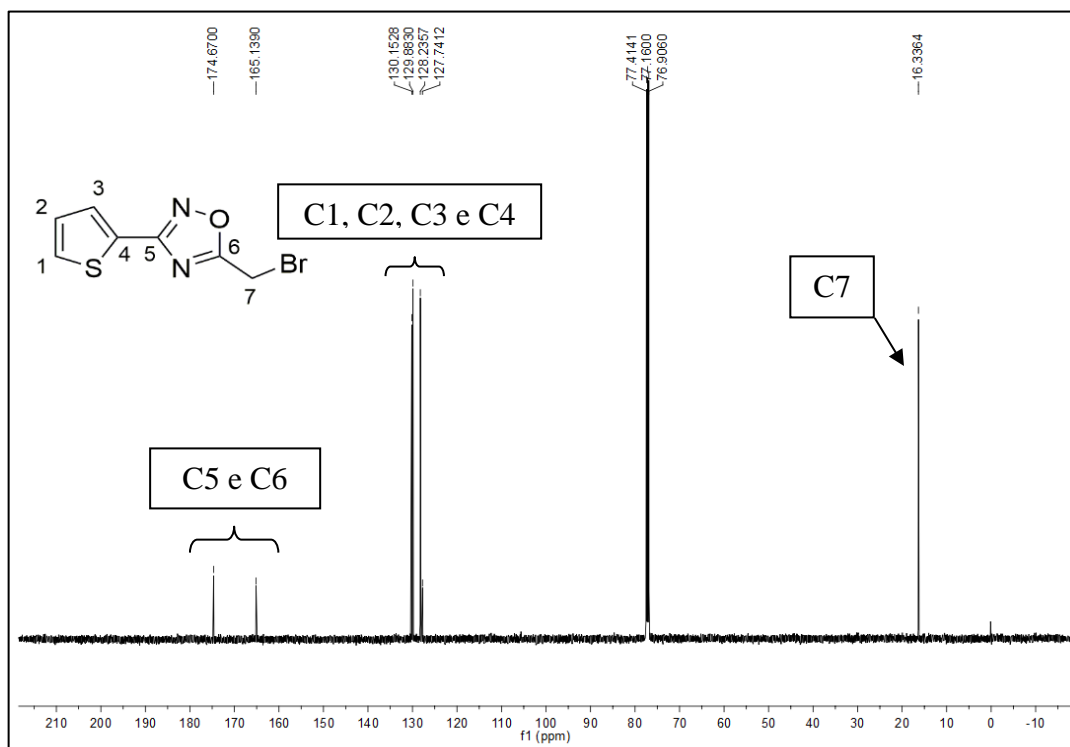
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do composto (7).



Fonte: Elaborada pela própria autora.

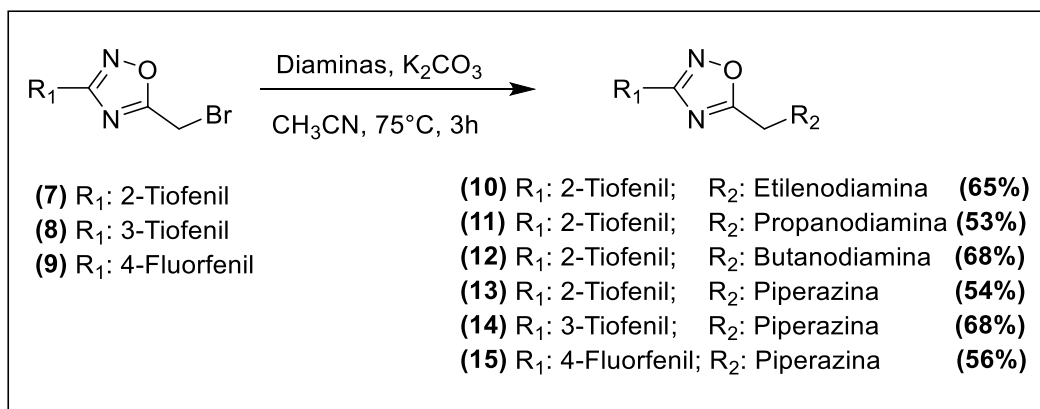
Figura 15 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) do composto (7).



Fonte: Elaborada pela própria autora.

4.1.3 Síntese e caracterização dos derivados 1,2,4 oxadiazólicos acoplados a diaminas 10 a 15

Esquema 11 - Síntese dos derivados 1,2,4-oxadiazólicos acoplados a diaminas 10-15.

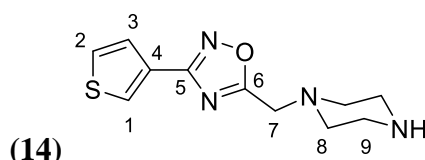


Fonte: Elaborada pela própria autora

Os oxadiazóis 10 a 15 foram obtidos como descrito por OZCAN e colaboradores (2013). Os oxadiazóis 7, 8 e 9, foram adicionados lentamente, com auxílio de um funil de adição, à diamina comercial (etilenodiamina, propanodiamina, butanodiamina e piperazina) e carbonato de potássio em acetonitrila, sob agitação magnética e refluxo (Esquema 11). O término das reações foi verificado após 3h com auxílio de CCD (eluente: 9:1 CH₂Cl₂/MeOH; revelador: luz ultravioleta). A mistura reacional foi extraída com CH₂Cl₂ e H₂O e a fase orgânica foi separada, tratada com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente removido por evaporação sob pressão reduzida. Os produtos foram obtidos na forma de óleos após purificação por CCS (eluente: gradiente de CH₂Cl₂:MeOH), com rendimentos que variaram de 53% a 68%.

A seguir serão discutidos os espectros de IV e RMN de ¹H e ¹³C do oxadiazol 14.

5-(piperazin-1-ilmetil)-3-(tiofen-3-il)-1,2,4-oxadiazol



Fórmula molecular: C₁₁H₁₄N₄OS

Massa molar: 250 gmol⁻¹

Estado físico: Óleo amarelo

Rendimento: 68%

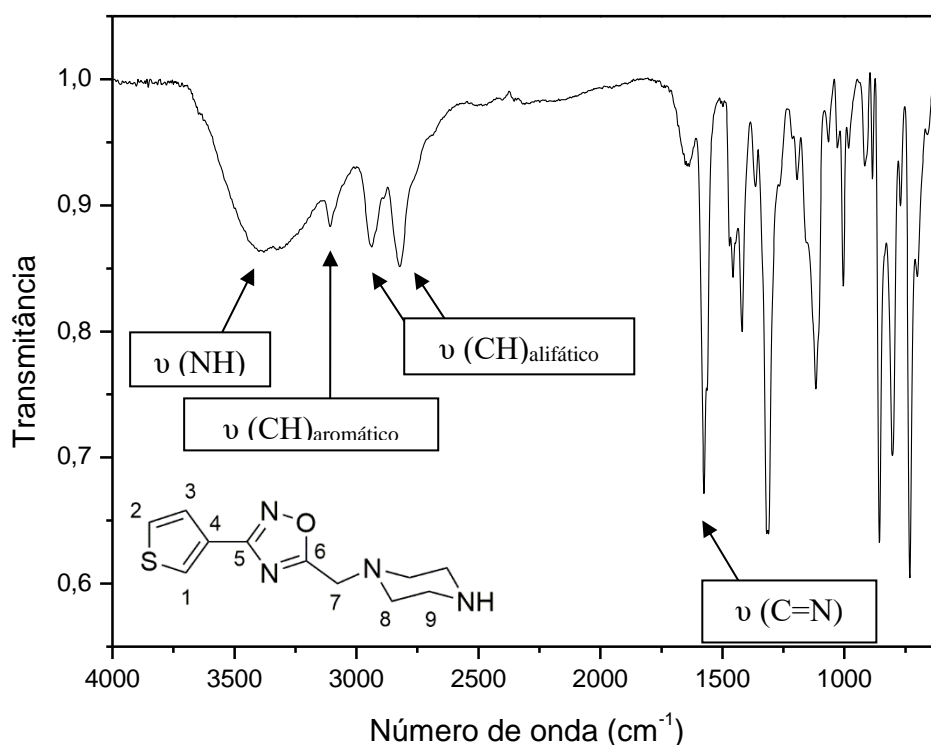
No espectro de IV (Figura 16) observa-se uma banda de absorção em 3346 cm⁻¹ referente ao estiramento NH; uma banda referente ao estiramento CH de aromático em 3103 cm⁻¹; outra

banda em 2940 cm^{-1} e 2820 cm^{-1} referente ao estiramento CH de alifático e também uma banda em 1574 cm^{-1} referente ao estiramento C=N.

Pelo espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) (Figura 17) pode-se observar três duplos dupletos centrados em δ 8,09 (1H; $^4J = 1,0\text{ Hz}$; $^3J = 3,0\text{ Hz}$), δ 7,64 (1H; $^4J = 1,1\text{ Hz}$; $^3J = 5,0\text{ Hz}$) e δ 7,42 (1H; $^4J = 3,0\text{ Hz}$; $^3J = 5,0\text{ Hz}$) referentes aos hidrogênios H1, H3 e H2, respectivamente, e um simpleto em δ 3,88 referente aos dois hidrogênios da porção alifática. Também é possível observar um tripleto em δ 2,94 (4H; $^3J = 4,8\text{ Hz}$) e um sinal largo em δ 2,61 (4H) referentes aos hidrogênios da piperazina, além de um simpleto em δ 1,72 referente ao hidrogênio de NH da piperazina.

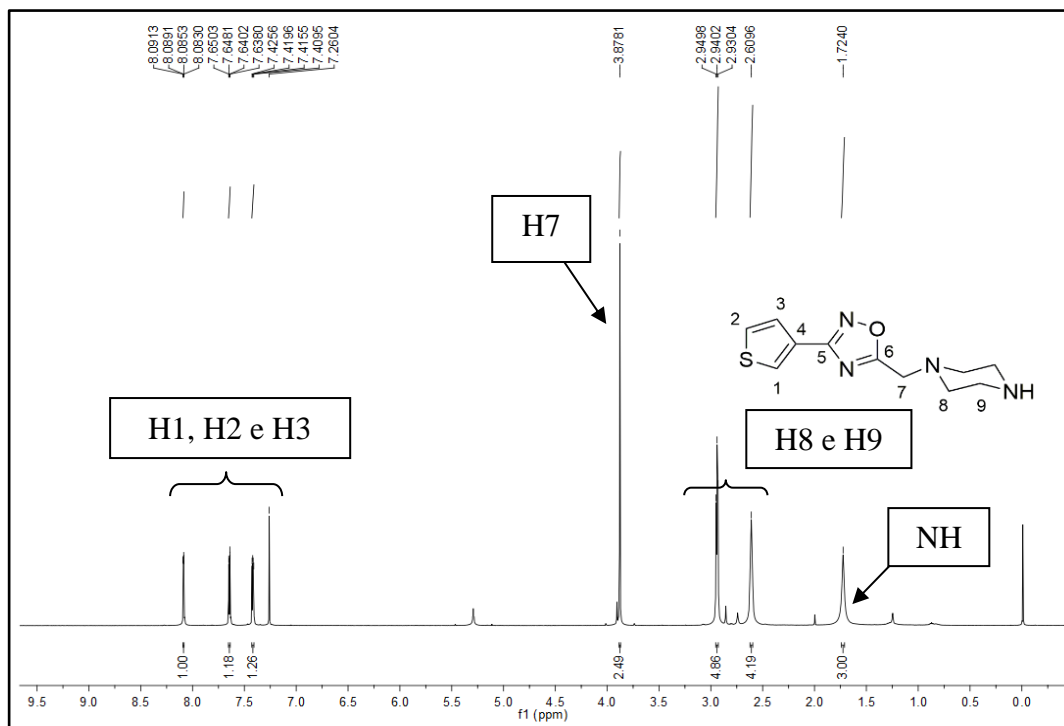
A partir da análise do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) (Figura 18) pode-se observar os sinais dos carbonos C6 e C5 em δ 176,1 e δ 164,9, respectivamente. O espectro mostra também sinais em: δ 128,2 referente ao carbono não hidrogenado C4 e em δ 128,0, δ 127,1 e δ 126,2 referentes aos carbonos C1, C2 e C3; em δ 54,2 e δ 53,6 referentes aos carbonos C8 e C9 da piperazina e em δ 45,9 referente ao carbono C7.

Figura 16 - Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (14).



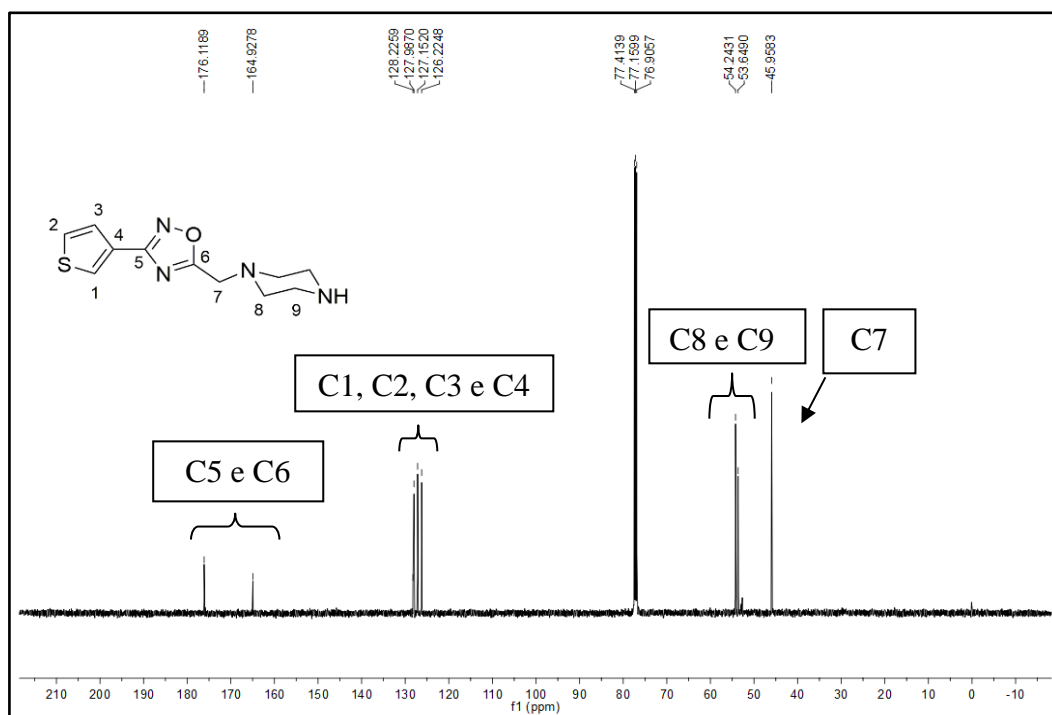
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Figura 17 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do composto (14).



Fonte: Elaborada pela própria autora.

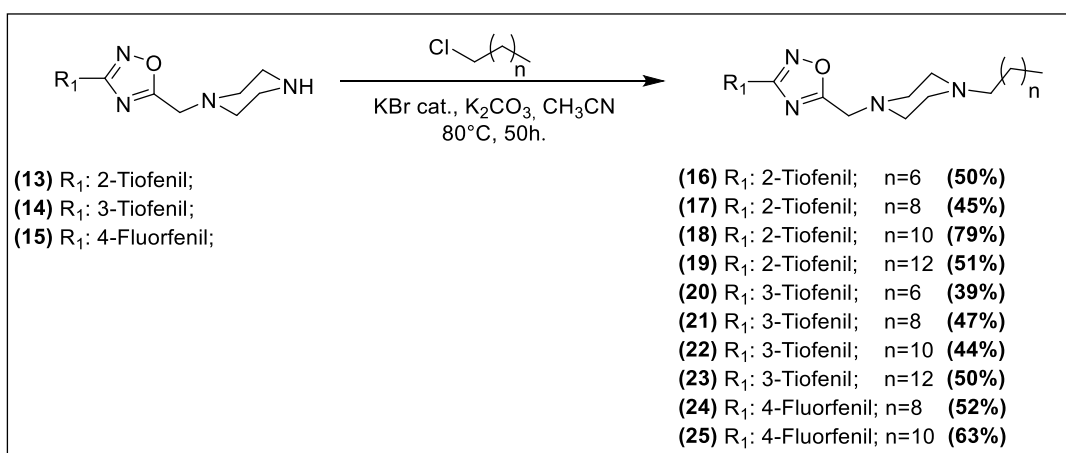
Figura 18 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) do composto (14).



Fonte: Elaborada pela própria autora.

4.1.4 Síntese e caracterização dos derivados 1,2,4 oxadiazólicos alquilados 16 a 25

Esquema 12 - Síntese dos derivados 1,2,4-oxadiazólicos alquilados.

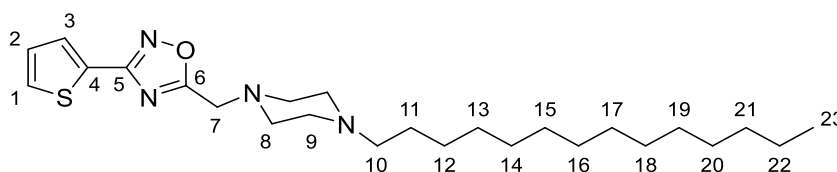


Fonte: Elaborada pela própria autora.

Os oxadiazóis **16** a **25** foram obtidos pela reação dos oxadiazóis **13**, **14** e **15** com os respectivos haletos de alquila, quantidades catalíticas de KBr e carbonato de potássio em acetonitrila, sob agitação magnética e refluxo (Esquema 12). O término das reações foi verificado após 50h com auxílio de CCD (eluente: 9:1 CH₂Cl₂/MeOH; revelador: luz ultravioleta). A mistura reacional foi extraída com CH₂Cl₂ e H₂O. A fase orgânica foi separada, tratada com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente removido por evaporação sob pressão reduzida. Os produtos foram obtidos na forma de sólidos após purificação por CCS (eluente: gradiente CH₂Cl₂:MeOH: 95%/5% v/v) com rendimentos que variaram de 39% a 79%.

A seguir serão discutidos os espectros de IV, RMN de ¹H e ¹³C para o oxadiazol **19**.

5-((4-tetradecilpiperazin-1-il)metil)-3-(tiofen-2-il)-1,2,4-oxadiazol



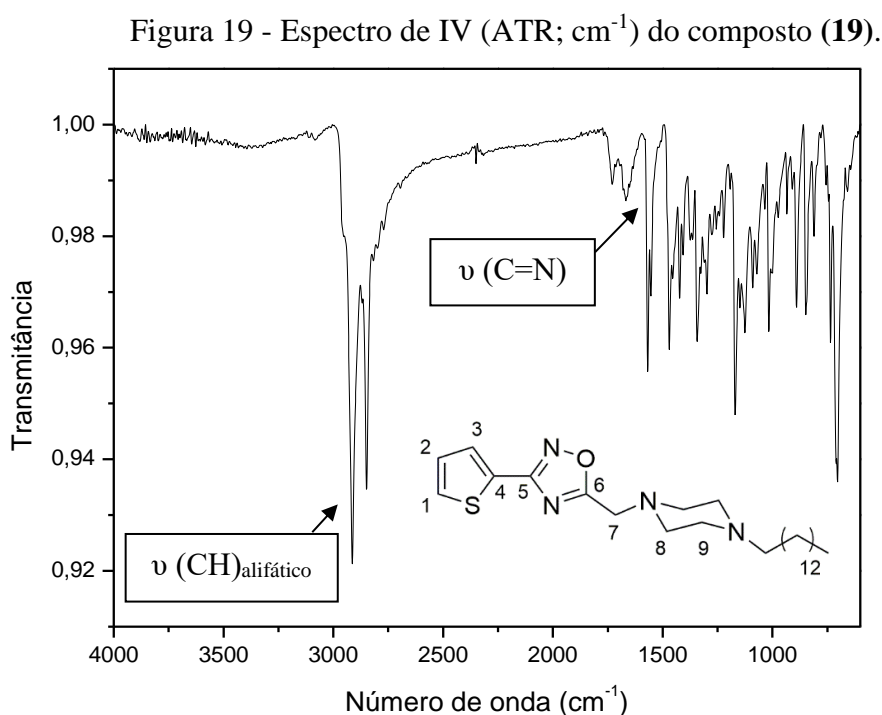
(19)

Fórmula molecular:
C₂₅H₄₂N₄OS
Massa molar: 447 gmol⁻¹
Estado físico: Sólido amarelado
Faixa de Fusão: 72-73°C
Rendimento: 51%

No espectro de IV (Figura 19) observa-se bandas de absorção entre 2910 cm^{-1} e 2768 cm^{-1} referentes ao estiramento CH de alifático e também uma banda em 1562 cm^{-1} referente ao estiramento C=N.

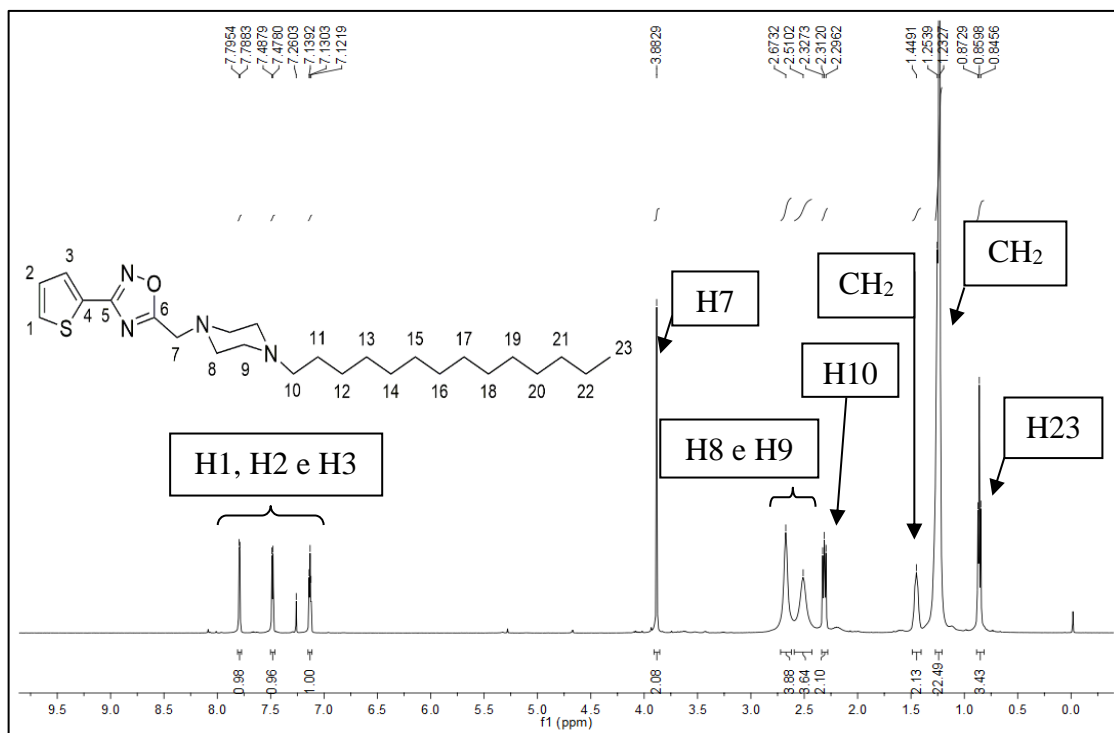
Pelo espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) (Figura 20) pode-se observar dois dupletos centrados em $\delta 7,79$ (1H; $^3J = 3,5$ Hz) e $\delta 7,48$ (1H; $^3J = 4,9$ Hz) referentes aos hidrogênios H1 e H3, respectivamente, e um tripleto em $\delta 7,13$ (1H; $^3J = 4,4$ Hz) referente ao hidrogênio H2; um simpleto em $\delta 3,88$ referente aos hidrogênios metilênicos H7; dois simpletos largos em $\delta 2,67$ (4H) e em $\delta 2,51$ (4H) referentes aos hidrogênios metilênicos da piperazina. Os sinais referentes aos hidrogênios da cadeia alquil podem ser observados como um tripleto em $\delta 2,31$ (2H; $^3J = 7,6$ Hz) referente ao hidrogênio H10; um simpleto largo em $\delta 1,45$ (2H) e um multipletto entre $\delta 1,25$ - $1,23$ (22H) referentes aos hidrogênios H11-H22, e um tripleto em $\delta 0,86$ (3H; $J = 6,5$ Hz) referente aos hidrogênios H23.

A partir da análise do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) (Figura 21) pode-se observar os sinais dos carbonos C6 e C5 em $\delta 176,2$ e $\delta 164,5$, respectivamente. O espectro mostra sinais em $\delta 129,8$, $\delta 129,4$ e $\delta 128,0$ referentes aos carbonos C1, C2 e C3 e em $\delta 128,3$ referente ao carbono não hidrogenado C4; em $\delta 58,8$ referente ao carbono C7 e em $\delta 53,0$ referentes aos carbonos C8 e C9 da piperazina. Os carbonos da cadeia alquil se encontram na faixa entre $\delta 32,0$ - $22,8$ do espectro, e em $\delta 14,2$ é possível observar o carbono C23.



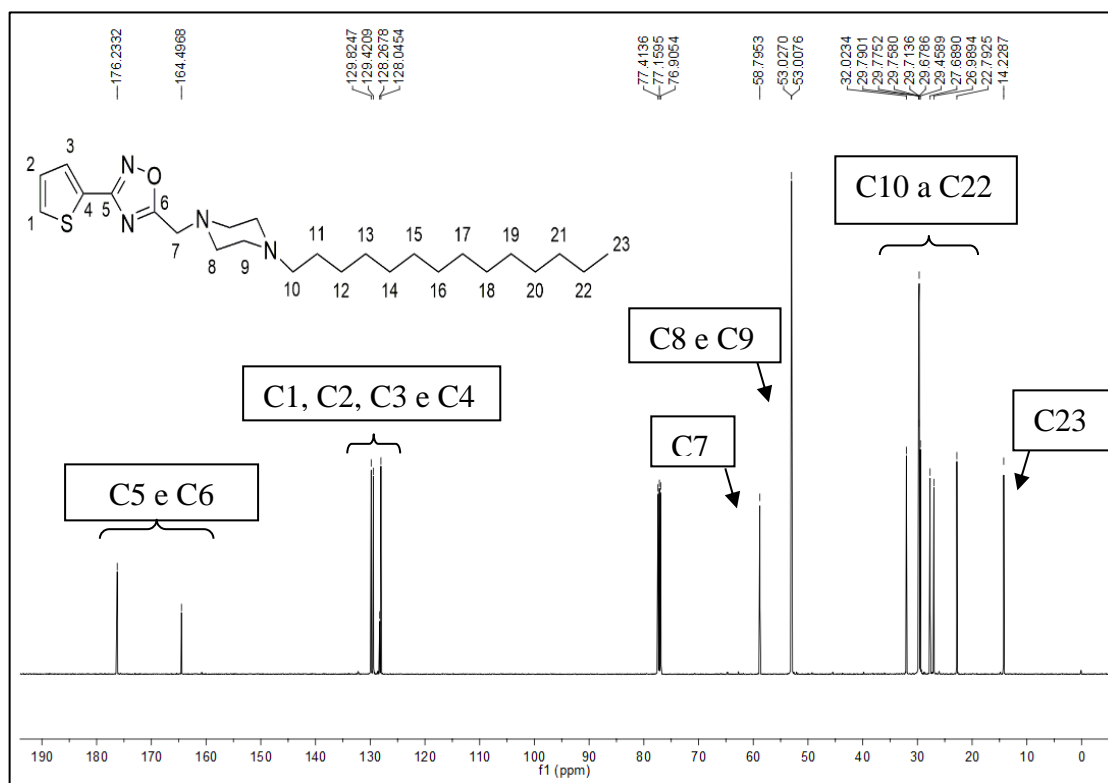
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Figura 20 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do composto (**19**).



Fonte: Elaborada pela própria autora.

Figura 21: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) do composto (**19**).



Fonte: Elaborada pela própria autora.

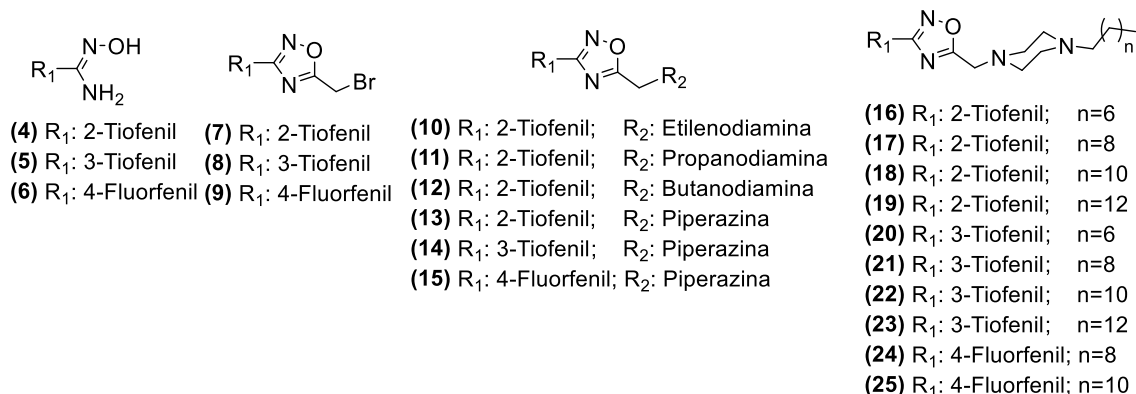
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS DERIVADOS OXADIAZÓLICOS

Essa seção apresenta os resultados dos testes utilizados para avaliação do potencial antitumoral dos compostos.

4.2.1 Ensaio de toxicidade e determinação do CI_{50} em linhagens de células animais

A atividade citotóxica dos compostos foi avaliada através da concentração inibitória de 50% da viabilidade celular – CI_{50} como descrita na literatura (CHAVES, 2017). Para determinação da viabilidade celular foi feita a distribuição das células em meio de cultura RPMI 1640, adicionado de soro fetal bovino (FBS) 10% v/v, em densidades de $0,5 \times 10^3$ (BHK-21), $1,5 \times 10^3$ (B16-F10) e $2,0 \times 10^3$ (CT26.WT) células/poço/100 μ L em placas de 96 poços e foram devidamente incubadas a 37 °C em atmosfera úmida a 5% de CO_2 por 24 horas para total aderência. Nos poços das placas contendo as células aderidas, foram distribuídos 100 μ L de concentrações decrescentes (100 a 0,1 μ M) do composto a ser testado (DMSO/RPMI <1% v/v), em quadruplicata. Para controle negativo foi utilizado 100 μ L de meio de cultura suplementado com 10% de FBS. Após exposição por 72h aos compostos em questão, as células foram incubadas com MTT (5 μ g/10 μ L/poço) por 4 horas. Em seguida, o sobrenadante foi removido por aspiração e 100 μ L de DMSO/poço foram adicionados. A viabilidade celular é determinada pela medida da absorbância a 570 nm em espectrofotômetro de microplacas, sendo proporcional à concentração de sais de formazan – produto da redução mitocondrial do MTT nas células viáveis (MOSMANN, 1983).

Dessa forma, os derivados 1,2,4-oxadiazólicos **4-25** foram analisados *in vitro* pelo método colorimétrico MTT quanto a sua atividade anticancerígena contra duas linhagens de células tumorais B16F10 (melanoma murinho metastático) e CT26.WT (carcinoma de cólon murino) e uma linhagem celular não tumoral BHK-21 (células de rim de hamster). Os resultados estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração inibitória de 50% da viabilidade celular CI_{50} ($\mu\text{M} \pm \text{SD}$).

Compostos	Células tumorais CI_{50} ($\mu\text{M} \pm \text{SD}$) *				Célula normal
	B16F10	IS	CT26.WT	IS	BHK-21 CI_{50} ($\mu\text{M} \pm \text{SD}$) *
4	>100	-	>100	-	>100
5	>100	-	>100	-	>100
6	>100	-	>100	-	>100
7	7,5 \pm 0,5	1,1	4,1 \pm 1,2	1,9	8,0 \pm 0,4
8	7,8 \pm 0,8	0,5	7,9 \pm 1,5	0,5	3,6 \pm 1,3
9	6,0 \pm 2,2	2,0	2,5 \pm 0,7	4,9	12,1 \pm 2,8
10	>100	-	>100	-	>100
11	>100	-	>100	-	>100
12	>100	-	>100	-	57,9 \pm 6,0
13	>100	-	>100	-	>100
14	>100	-	>100	-	>100
15	>100	-	>100	-	>100
16	17,1 \pm 5,0	1,8	17,9 \pm 1,7	1,8	31,7 \pm 0,3
17	20,0 \pm 4,0	1,6	14,8 \pm 0,2	2,1	31,9 \pm 0,1
18	12,1 \pm 0,3	1,8	8,1 \pm 3,5	2,6	21,2 \pm 0,7
19	15,4 \pm 1,3	1,6	>100	-	24,8 \pm 0,6
20	25,0 \pm 6,1	1,6	36,1 \pm 2,4	1,1	40,7 \pm 3,2
21	14,5 \pm 3,2	2,5	23,9 \pm 3,9	1,5	36,3 \pm 1,7
22	10,0 \pm 0,1	2,5	16,8 \pm 1,3	1,5	25,5 \pm 2,5
23	10,0 \pm 0,5	1,7	16,9 \pm 4,6	1,0	16,6 \pm 3,2
24	14,3 \pm 1,4	2,0	6,7 \pm 0,1	4,2	28,5 \pm 6,3
25	27,6 \pm 5,1	1,9	11,9 \pm 3,1	4,5	53,8 \pm 1,2
Daunorrubicina	2,5 \pm 0,1	0,4	0,42 \pm 0,04	0,2	0,09 \pm 0,01

*Desvio padrão da triplicata de dois experimentos independentes.

Fonte: Elaborada pela própria autora.

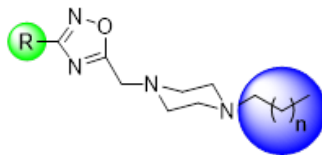
É possível notar que os intermediários oxadiazólicos **7**, **8** e **9** estão entre os compostos mais citotóxicos, com valores de CI_{50} entre 6,0 e 7,8 μM para a linhagem celular B16F10 e valores de CI_{50} entre 2,5 e 7,9 μM para a linhagem celular CT26.WT, com destaque para o

composto **9** que além de ser mais ativo que o controle positivo, a Daunorrubicina, foi cerca de dez vezes mais seletivo para a linhagem CT26.WT em relação à linhagem celular não tumoral BHK-21 (Tabela 1).

Pela análise dos resultados dispostos na Tabela 1 foi possível observar que a substituição do brometo por diaminas (**10 a 15**) não favoreceu a atividade citotóxica para nenhuma linhagem celular. Porém os derivados de piperazina quando *N*-alquilados com cadeias de 8, 10, 12 e 14 átomos de carbono recuperaram parte da atividade com destaque para os compostos **18, 24 e 25**. É possível observar que os compostos sintetizados nesse trabalho, em geral, apresentaram melhor atividade para a linhagem CT26.WT, e que, com exceção dos compostos **10 a 15**, foram mais seletivos para a linhagem tumoral em relação a linhagem celular não tumoral (BHK-21) quando comparados com a Daunorrubicina. Os compostos contendo o substituinte 4-fluorfenil (**9, 24 e 25**) foram mais seletivos para ação antitumoral na linhagem CT26.WT. O composto **9**, por exemplo, foi tão ativo quanto o composto de referência, porém dez vezes mais seletivo. Entre os compostos contendo um grupo tiofeno como substituinte, o derivado alquilado mais ativo de cada série é o oxadiazol com cadeia alquila de 12 átomos de carbono (**18 e 22**), constatação essa que corrobora com resultados já obtidos em outro trabalho desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (CANESCHI, *et al.* 2019).

A linhagem CT26.WT já foi utilizada em trabalhos do nosso grupo de pesquisa para avaliação do potencial antitumoral de outros derivados 1,2,4-oxadiazólicos (CANESCHI, *et al.* 2019). Observa-se que, os oxadiazóis, planejados e sintetizados nesse trabalho, com os substituintes tiofenil e 4-fluorfenil, apresentaram uma melhora na atividade citotóxica quando comparado com o derivado contendo o substituinte fenil descrito no trabalho de CANESCHI e colaboradores (2019). Isso pode ser visto com os dados resumidos na Tabela 2 que mostram uma diminuição dos valores de CI_{50} , e um aumento do índice de seletividade para os oxadiazóis contendo tiofeno ou fluorfenil em sua estrutura (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação da atividade citotóxica, para a linhagem celular CT26.WT, entre derivados 1,2,4-oxadiazólicos alquilados.



Grupo R	Tamanho da cadeia <i>N</i> -alquil							
	0 carbonos		10 carbonos		12 carbonos		14 carbonos	
	CI ₅₀ (μM±SD) *		CI ₅₀ (μM±SD) *		CI ₅₀ (μM±SD) *		CI ₅₀ (μM±SD) *	
	CT26.WT	IS _{BHK-21}	CT26.WT	IS _{BHK-21}	CT26.WT	IS _{BHK-21}	CT26.WT	IS _{BHK-21}
	>100	-	14,8 ± 0,2	2,1	8,1 ± 3,5	2,6	>100	-
	>100	-	23,9 ± 3,9	1,5	16,8 ± 1,3	1,5	16,9 ± 4,6	1,0
	>100	-	6,7 ± 0,1	4,2	11,9 ± 3,1	4,5	**	**
	>100	-	59,5 ± 1,1	1,1	77,7 ± 4,2	0,9	>100	-

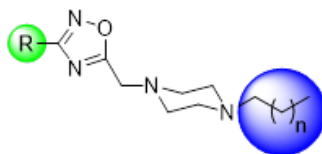
*Desvio padrão da triplicata de dois experimentos independentes.

**Derivado não sintetizado

Fonte: Elaborada pela própria autora.

A linhagem B16F10 também já foi utilizada pelo nosso grupo para avaliação do potencial antitumoral de outros derivados 1,2,4-oxadiazólicos (ENES, 2017). Observa-se que, assim como na linhagem CT26.WT, a presença os substituintes planejados nesse trabalho na porção R do oxadiazol melhorou a atividade citotóxica com uma diminuição dos valores de IC₅₀, quando comparado, por exemplo, com o derivado trifluorometilbenzil com um aumento do índice de seletividade (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação da atividade citotóxica para a linhagem celular B16F10, entre derivados 1,2,4-oxadiazólicos alquilados.



Grupo R	Tamanho da cadeia <i>N</i> -alquil							
	0 carbonos		10 carbonos		12 carbonos		14 carbonos	
	CI ₅₀ (μM±SD) *		CI ₅₀ (μM±SD) *		CI ₅₀ (μM±SD) *		CI ₅₀ (μM±SD) *	
	B16F10	IS _{BHK-21}	B16F10	IS _{BHK-21}	B16F10	IS _{BHK-21}	B16F10	IS _{BHK-21}
	>100	-	20,0 ± 4,0	1,6	12,1 ± 0,3	1,8	15,4 ± 1,3	1,6
	>100	-	14,5 ± 3,2	2,5	10,0 ± 0,1	2,5	10,0 ± 0,5	1,7
	>100	-	14,3 ± 1,4	2,0	27,6 ± 5,1	1,9	**	**
	>100	-	29,9 ± 3,5	0,5	63,8 ± 1,0	0,3	61,3 ± 3,2	0,4

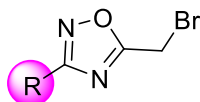
*Desvio padrão da triplicata de dois experimentos independentes.

**Derivado não sintetizado

Fonte: Elaborada pela própria autora.

A partir dos resultados de citotoxicidade obtidos para as linhagens B16F10 e CT26.WT também foi possível notar que dentre os intermediários 1,2,4-oxadiazólicos contendo brometo, sintetizados nesse trabalho, houve uma melhora na atividade citotóxica com uma diminuição dos valores de CI₅₀, quando comparado com os intermediários contendo fenil e trifluorometilfenil como substituintes descritos nos trabalhos de CANESCHI e colaboradores (2019) e ENES (2017), respectivamente (Tabela 4). Além disso, é possível notar também um aumento no índice de seletividade para o intermediário contendo o substituinte 4-fluorfenil.

Tabela 4 - Comparação da atividade citotóxica entre derivados 1,2,4-oxadiazólicos com brometo.



Grupo R	CI ₅₀ (μM±SD) *		CI ₅₀ (μM±SD) *	
	B16F10	IS _{BHK-21}	CT26.WT	IS _{BHK-21}
	7,5 ± 0,5	1,1	4,1 ± 1,2	1,9
	7,8 ± 0,8	0,5	7,9 ± 1,5	0,5
	6,0 ± 2,2	2,0	2,5 ± 0,7	4,9
	14,6 ± 5,6	1,6	9,8 ± 1,0	2,4
	>100	-	>100	-

*Desvio padrão da triplicata de dois experimentos independentes.

Fonte: Elaborada pela própria autora.

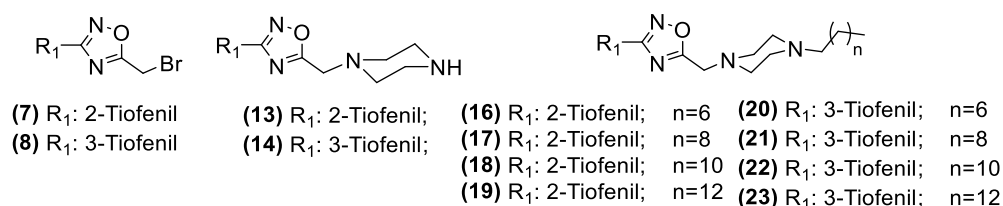
4.2.2 Ensaio de toxicidade e determinação do CI₅₀ em linhagens de células humanas

Para determinação do CI₅₀ foi feita a distribuição das células em meio de cultura DMEM, com 10% de soro fetal bovino (FBS), em densidades de $1,25 \times 10^3$ para WI-26 VA4 (fibroblasto de pulmão humano) e $2,5 \times 10^3$ para RKO-AS45-1 (carcinoma de cólon humano) células/poço/100 μL em placas de 96 poços e foram devidamente incubadas a 37 °C em atmosfera úmida a 5% de CO₂ por 24 horas para total aderência. Para aplicação dos compostos sintetizados, primeiramente foi preparado uma solução de meio suplementado com 1% FBS e 1% antibiótico (Pen Strep – Gibco®). Em seguida esse meio suplementado foi utilizado para preparar as soluções com os compostos em concentrações decrescentes (1000 a 1 μg/mL) do composto a ser testado (DMSO/DMEM <1% v/v) e essas soluções foram expostas a luz UV por 30 minutos. Ao final desse tempo de exposição as

soluções foram distribuídas nas placas (100 µL/poço), em triplicata. Para controle negativo foi utilizado 100 µL de meio de cultura suplementado com 1% de FBS e 1% antibiótico (Pen Strep – Gibco®). Após exposição por 24h aos compostos em questão, as células foram incubadas com MTT (5 µg/10 µL/poço) por 3 horas. Então, o sobrenadante foi removido por aspiração, 100 µL PBS 1x foi adicionado e as placas foram centrifugadas. O sobrenadante foi aspirado e 100 µL de DMSO/poço foram adicionados. A viabilidade celular é determinada pela medida da absorbância a 550 nm em espectrofotômetro de microplacas, sendo proporcional à concentração de sais de formazan – produto da redução mitocondrial do MTT nas células viáveis (MOSMANN, 1983).

Em posse dos valores de CI_{50} dos compostos **7, 8, 13, 14 16-23** determinados pelo *software Dr. Fit*, foi possível calcular o índice de seletividade dos compostos, dados esses apresentados na tabela 5.

Tabela 5 - Concentração inibitória de 50% da viabilidade celular IC_{50} (µg/mL).



Compostos	Células tumorais CI_{50} (µg/mL)		Célula normal CI_{50} (µg/mL)
	RKO-AS45-1	IS	WI-26-VA4
7	587	0,7	443
8	523	0,9	491
13	672	0,9	619
14	471	0,8	360
16	160	0,7	112
17	80,7	0,5	36,9
18	>1000	-	772
19	>1000	-	>1000
20	29,2	3,8	111
21	45,1	0,5	24,4
22	237	2,0	478
23	>1000	-	>1000

Fonte: Elaborada pela própria autora.

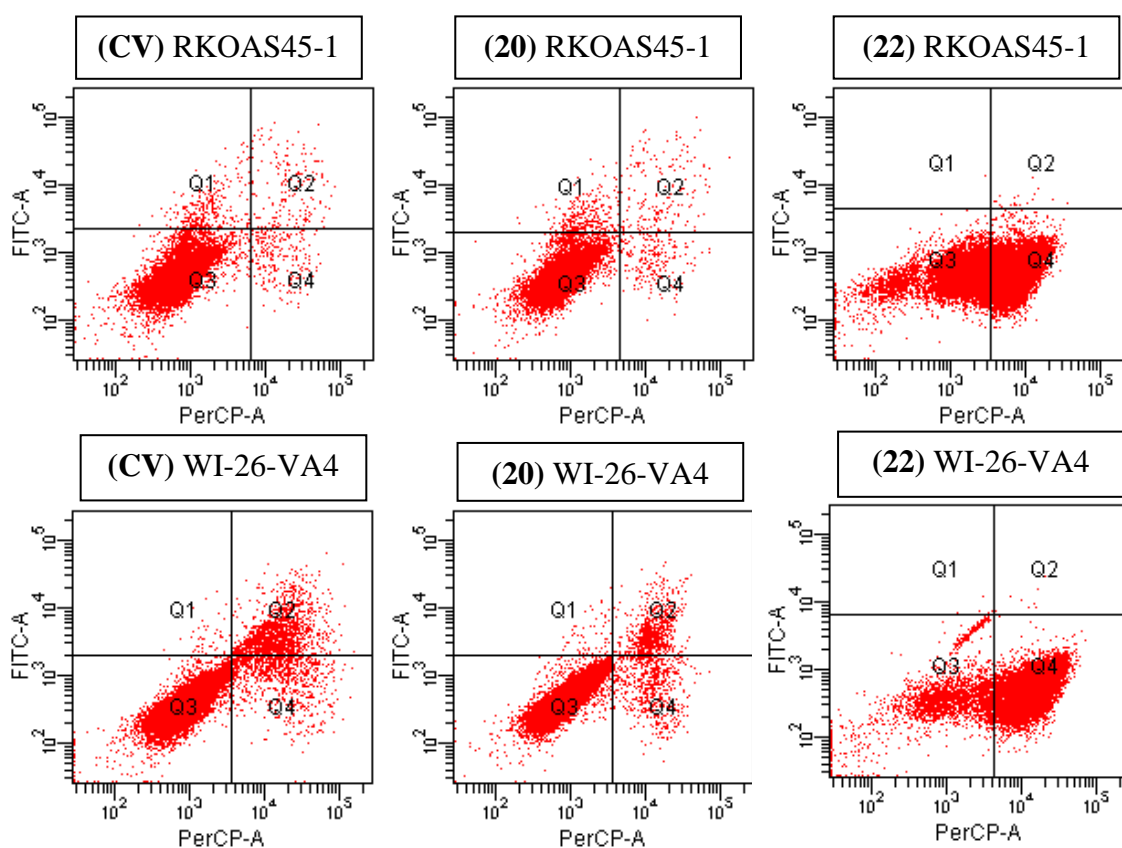
Pelos dados dispostos na Tabela 5 é possível notar que, para a linhagem tumoral humana RKO-AS45-1, os derivados 1,2,4-oxadiazólicos contendo piperazinas *N*-alquiladas **17, 20 e 21** são os mais ativos, porém com relação a seletividade, os compostos **20 e 22** se destacam. Sendo assim, após a triagem dos resultados, os compostos mais seletivos **20 e 22** foram selecionados

para realização dos ensaios de apoptose, ciclo celular e clonogenicidade a fim de obter indícios sobre o mecanismo de ação dos derivados oxadiazólicos.

4.2.3 Avaliação de morte celular por apoptose em linhagens de células humanas

Foi realizada a avaliação de morte celular por apoptose nas linhagens RKO-AS45-1 (carcinoma de cólon humano), e WI-26 VA4 (fibroblasto de pulmão humano) pós-tratamento por 24h com os compostos **20** e **22** nos seus respectivos valores de CI_{50} previamente determinados. Também foi realizada a análise sobre um controle de vida (CV), que consistia em meio DMEM suplementado com 10% FBS (Figura 22). As células utilizadas nesse ensaio foram cultivadas em placas de 24 poços nas mesmas condições utilizadas para o teste citotóxico.

Figura 22 - Dotplots obtidos a partir da análise de morte celular por citometria de fluxo.



Legenda:

Q1: Apoptose (+) Anexina V (-) Iodeto de propídeo.	Q2: Apoptose Tardia (+) Anexina V (+) Iodeto de propídeo
Q3: Células viáveis (-) Anexina V (-) Iodeto de propídeo	Q4: Necrose (-) Anexina V (+) Iodeto de propídeo

Fonte: Elaborada pela própria autora.

Tabela 6 - Percentual das quatro populações de células observadas após cada tratamento.

Linhagem	Tratamento	Células viáveis (%)	Apoptose (%)	Apoptose tardia (%)	Necrose (%)
	CV	96,5	1,5	0,9	1,2
RKO-AS45-1	Composto 20	96,6	1,4	0,9	1,1
	Composto 22	31,9	0,0	0,1	68,0
	CV	86,2	0,2	8,4	5,2
WI-26-VA4	Composto 20	92,8	0,3	3,7	3,2
	Composto 22	12,7	0,0	0,0	82,7

Fonte: Elaborada pela própria autora.

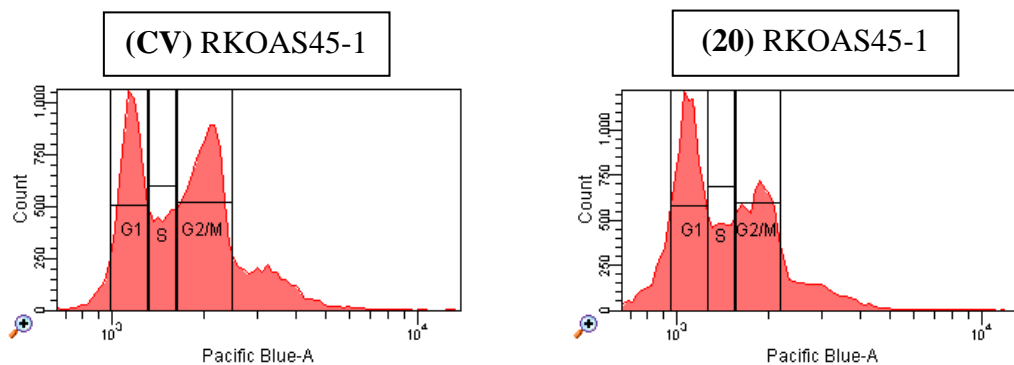
Com esses dados foi possível observar que o composto **22** induziu morte por necrose em 68% das células RKO-AS45-1, mecanismo de morte celular indesejável, uma vez que pode gerar processos inflamatórios e outros efeitos colaterais. Para o composto **20**, pode-se observar que o tratamento com esse composto induz pouca morte celular com 96,6% das células viáveis (Tabela 6). Dessa forma, espera-se que a citotoxicidade apresentada para o composto **20** ($CI_{50(RKO-AS45-1)} = 29,9 \mu\text{g/mL}$) inviabilize o funcionamento celular por outro mecanismo.

Esse ensaio ainda não foi replicado para obtenção de dados estatísticos e/ou confirmação da análise.

4.2.4 Avaliação de ciclo celular por citometria de fluxo em linhagens de células humanas

Uma vez realizado o ensaio de análise de morte celular por apoptose, foi determinado que o composto **22** induz alta taxa de necrose nas células tratadas, o que não é desejável para um protótipo quimioterápico devido á respostas inflamatórias diversas. Sendo assim, as análises para elucidação do mecanismo de ação, seguiram apenas para o composto **20**. A cinética do ciclo celular da linhagem RKO-AS45-1 (carcinoma de cólon humano) foi avaliada após 24h de tratamento com o composto **20** no valor do CI_{50} previamente determinado para a linhagem tumoral, e um controle de vida (CV) que consistia em meio DMEM suplementado com 10%FBS. As células utilizadas nesse ensaio foram cultivadas em placas de 24 poços nas mesmas condições utilizadas para o teste citotóxico.

Figura 23 - Histogramas obtidos a partir da análise do ciclo celular por citometria de fluxo.



Fonte: Elaborada pela própria autora.

Comparando os histogramas, pode-se observar que as células de RKO-AS45-1 após serem tratadas com o composto **20** por 24h, tendem a permanecer em G1 (Figura 23). Ou seja, o tratamento das células com o composto **20** pode resultar em perturbações dos mecanismos celulares que estão relacionados a multiplicação celular. Este fato pode corroborar com a baixa taxa de morte celular via apoptose (1,4%) (Tabela 6), visto que o composto **20** apresenta baixo valor de CI_{50} (29,9 $\mu\text{g/mL}$) para a RKO-AS45-1. Ou seja, esse resultado preliminar dá indícios que o tratamento com o composto **20** deve inibir a multiplicação celular, o que pode estar relacionado a baixa taxa metabólica mitocondrial avaliada pela determinação do valor de CI_{50} .

Esse ensaio ainda não foi replicado para obtenção de dados estatísticos e/ou confirmação da análise.

5 PARTE EXPERIMENTAL

Nessa seção serão descritos os procedimentos seguidos nesse trabalho.

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Nessa seção serão apresentados os materiais e os protocolos utilizado para obtenções dos resultados apresentados anteriormente.

5.1.1 Síntese e caracterização dos derivados oxadiazólicos alquilados e seus precursores.

Os reagentes e solventes utilizados para a síntese e purificação dos compostos são das marcas Merck, Vetec e Sigma Aldrich, sem pré-purificação.

Para o andamento das reações e verificação da pureza dos compostos foi utilizada a técnica de cromatografia em camada delgada, usando para tal sílica gel 60G (254 nm) em lâminas de vidro, e para a revelação foi utilizada luz ultravioleta e vapores de iodo.

Os espectros no infravermelho de todos os compostos foram obtidos em um espectrômetro Bruker ALPHAFT-IR MB102, utilizando a técnica de ATR (Attenuated Total Reflectance).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C foram obtidos em um equipamento BRUKER AVANCE III 500 MHz com frequência de 500MHz para ^1H e 125MHz para ^{13}C . Como referência interna foi utilizado o TMS (tetrametilsilano).

Todos os compostos sintetizados e todas as análises foram realizadas no Departamento de Química da UFJF.

5.1.2 Avaliação da atividade antitumoral dos compostos sintetizados em linhagens de células animais

Neste trabalho foram utilizadas linhagens de células tumorais B16-F10 - célula de melanoma murino metastático, CT26.WT- célula de carcinoma colón murino e BHK-21- célula não tumoral de rim de hamster. As diferentes linhagens celulares utilizadas foram devidamente propagadas em meio de cultura RPMI 1640, pH 7,4, suplementado com soro fetal bovino (FBS- Fetal Bovine Serum) 10% v/v, Hepes (4,0 mmol/L), NaHCO_3 (14,0 mmol/L), ampicilina (0,27 mmol/L) e estreptomicina (0,06 mmol/L) em atmosfera úmida e 5% (v/v) de CO_2 .

A viabilidade celular foi determinada pela medida da absorbância a 570 nm em espectrofotômetro de microplacas, e os dados foram tratados utilizando o software GraphPad Prism 6[®].

Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Substâncias Antitumorais (LSAT), ICB-UFMG, sob supervisão da Profa Heveline do Departamento de Química da UFMG.

5.1.3 Avaliação da atividade antitumoral dos compostos sintetizados em linhagens de células humanas.

As linhagens celulares utilizadas para o estudo, RKO-AS45-1 (carcinoma de cólon humano), e WI-26 VA4 (fibroblasto de pulmão humano), foram adquiridas do *American Type Culture Collection* (ATCC) e pertencem ao banco de células do Serviço de Biologia Celular (SBC) da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Para realização dos experimentos, as linhagens mencionadas foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (SIGMA[®], cat.) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS). As células foram incubadas em estufa umidificada à 37°C e 5% CO₂. Estas células foram utilizadas para a realização dos ensaios de citotoxicidade, clonogênico e citometria de fluxo.

Para os ensaios de citotoxicidade as leituras das absorbâncias foram realizadas no leitor de microplacas SpectraMax M5E (Molecular Devices) a 550nm, e por fim, os valores de IC₅₀, foram obtidos utilizando o *software* Dr Fit, desenvolvido pela Universidade de Cambridge.

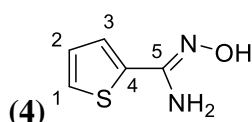
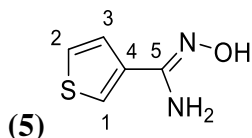
Para as análises de indução apoptótica dos compostos foram realizados os procedimentos conforme o protocolo do *ApoTarget™ Annexin-V FITC Apoptosis Kit* e as células foram adquiridas no equipamento BD FACScanto™ II. A análise dos resultados foi realizada utilizando o *software* FACSDiva™ 6.1.3.

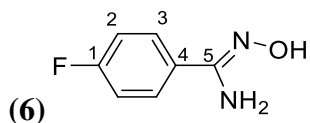
Para as análises de ciclo celular foi realizado o procedimento de acordo com o *Current Protocols in Cytometry*, 1997 e as células foram adquiridas no equipamento BD FACScanto™ II (BD BIOSCIENCES[®]). A análise dos resultados foi realizada utilizando o *software* FACSDiva™ 6.1.3 (BD BIOSCIENCES[®]).

Todos Fundação Ezequiel Dias - Belo Horizonte, sob a supervisão da Dra. Luciana Maria da Silva.

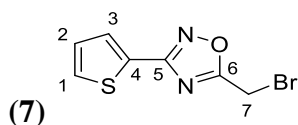
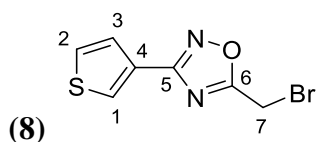
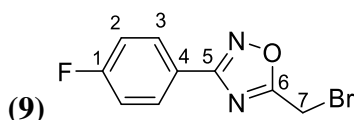
5.2 PROCEDIMENTO GERAL PARA PREPARAÇÃO DAS AMIDOXIMAS 4, 5 E 6

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 4,37 g da respectiva carbonitrila (40 mmol; 1,0 eq.), 1,15 g de hidroxilamina (60 mmol; 1,5 eq.) e 5,31 g de bicarbonato de sódio (64 mmol; 1,6 eq.) em 80 mL de metanol. A mistura reacional foi deixada sob agitação magnética e refluxo por cinco horas. A reação foi acompanhada por CCD (eluente: 100% CH₂Cl₂; revelador: luz ultravioleta). Após o término da reação, fez-se sucessivas extrações líquido-líquido utilizando acetato de etila e água destilada. A fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido por evaporação sob pressão reduzida. Os produtos (**4**, **5** e **6**) foram obtidos na forma de óleos amarelados (**4** e **5**) ou sólido branco (**6**) com rendimentos que variaram de 89 a 98%. Os dados físico-químicos e espectroscópicos das amidoximas estão descritos a seguir.

(Z)-N'-hidroxitiofen-2-carboximidamida**Fórmula molecular:** C₅H₆N₂OS**Massa molar:** 142 g mol⁻¹**Estado físico:** Óleo amarelado**Rendimento:** 94%**IV (ATR) v (cm⁻¹):** 3470 cm⁻¹ (-OH); 3109 cm⁻¹ (-NH₂); 1635 cm⁻¹ (C=N).**RMN de ¹H (DMSO-*d*₆; 500 MHz) δ (ppm):** 9,58 (1H; s; OH); 7,45 (1H; d; *J* = 3,6 Hz; H1); 7,42 (1H; d; *J* = 4,9 Hz; H3); 7,03 (1H; t; *J* = 3,7 Hz; H2); 5,90 (2H; s; NH₂).**RMN de ¹³C (DMSO-*d*₆; 125 MHz) δ (ppm):** 147,5 (C5); 136,6 (C4); 126,9, 126,2, 125,0 (C1, C2 e C3).**(Z)-N'-hidroxitiofen-3-carboximidamida****Fórmula molecular:** C₅H₆N₂OS**Massa molar:** 142 g mol⁻¹**Estado físico:** Óleo amarelado**Rendimento:** 89%**IV (ATR) v (cm⁻¹):** 3411 cm⁻¹ (-OH); 3263 cm⁻¹ (-NH₂); 1635 cm⁻¹ (C=N).**RMN de ¹H (DMSO-*d*₆; 500 MHz) δ (ppm):** 9,46 (1H; s; OH); 7,80 (1H; dd; *J* = 1,0 Hz; *J* = 2,8 Hz; H1); 7,49 (1H; dd; *J* = 2,9 Hz; *J* = 5,0 Hz; H2); 7,32 (1H; dd; *J* = 1,0 Hz; *J* = 5,0 Hz; H3); 5,76 (2H; s; NH₂).**RMN de ¹³C (DMSO-*d*₆; 125 MHz) δ (ppm):** 148,0 (C5); 135,4 (C4); 126,0, 125,3, 122,3 (C1, C2 e C3).

(Z)-4-fluor-N'-hidroxibenzimidamida**Fórmula molecular:** C₇H₇N₂OF**Massa molar:** 154 g mol⁻¹**Estado físico:** Sólido branco**Faixa de Fusão:** 85-86 °C**Rendimento:** 98%**IV (ATR) v (cm⁻¹):** 3441 cm⁻¹ (-OH); 3358 cm⁻¹ (-NH₂); 1651 cm⁻¹ (C=N).**RMN de ¹H (DMSO-*d*₆; 500 MHz) δ (ppm):** 9,63 (1H; s; OH); 7,72-7,69 (2H; m; H2); 7,21-7,18 (2H; m H2); 5,83 (2H; s; NH₂).**RMN de ¹³C (DMSO-*d*₆; 125 MHz) δ (ppm):** 162,5 (d; *J* = 243,9 Hz; C1); 150,1 (C5); 129,8 (d; *J* = 3,0 Hz; C4); 127,5 (d; *J* = 12,0 Hz; C3); 115,0 (d; *J* = 21,3 Hz; C2).**5.3 PROCEDIMENTO GERAL PARA PREPARAÇÃO DOS DERIVADOS****OXADIAZÓLICOS 7, 8 E 9**

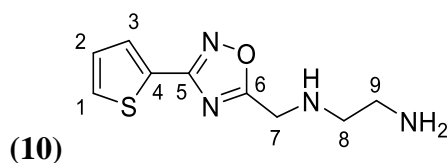
Em um balão de fundo redondo foram adicionados 3,82 g da respectiva amidoxima (35 mmol; 1,0 eq.) e 4,83 g de carbonato de potássio (35 mmol; 1,0 eq.) em 30 mL de clorofórmio. Em seguida adicionou-se lentamente 8,62 g de brometo de bromo acetila (47,2 mmol; 1,35 eq.) solubilizado em 30 mL de clorofórmio. A mistura reacional foi deixada sob agitação magnética à temperatura ambiente por três horas. A reação foi acompanhada por CCD (eluente: 100% CH₂Cl₂; revelador: luz ultravioleta). Após o término da reação, fez-se sucessivas extrações líquido-líquido utilizando acetato de etila e água destilada. A fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido por evaporação sob pressão reduzida. A mistura resultante foi solubilizada em 50 mL de tolueno e deixada sob agitação magnética e aquecimento (110°C) por 24h. A reação foi acompanhada por CCD (eluente: 100% CH₂Cl₂; revelador: luz ultravioleta) e após o término da mesma, o solvente da reação foi removido por evaporação em evaporador rotatório e o resíduo obtido foi purificado por CCS (eluente: gradiente hexano/acetato de etila: 80%/20% v/v). Os produtos (**7**, **8** e **9**) foram obtidos na forma de sólidos com rendimentos que variaram de 67 a 79%. Os dados físico-químicos e espectroscópicos dos oxadiazóis estão descritos seguir.

5-(bromometil)-3-(tiofen-2-il)-1,2,4-oxadiazol**Fórmula molecular:** C₇H₅BrN₂OS**Massa molar:** 245 g mol⁻¹**Estado físico:** Sólido branco**Faixa de Fusão:** 47-48°C**Rendimento:** 67%IV (ATR) ν (cm⁻¹): 3049 cm⁻¹ (CH aromático); 2955 cm⁻¹ (CH alifático); 1571 cm⁻¹ (C=N).RMN de ¹H (CDCl₃; 500 MHz) δ (ppm): 7,81 (1H; dd; *J* = 1,0 Hz; *J* = 3,6 Hz; H1); 7,53 (1H; dd; *J* = 1,0 Hz; *J* = 5,0 Hz; H3); 7,16 (1H; dd; *J* = 3,8 Hz; *J* = 5,0 Hz; H2); 4,53 (2H; s; H7).RMN de ¹³C (CDCl₃; 125 MHz) δ (ppm): 174,7 (C6); 165,1 (C5); 130,1, 129,9, 128,2 (C1, C2 e C3); 127,7 (C4); 16,3 (C7).**5-(bromometil)-3-(tiofen-3-il)-1,2,4-oxadiazol****Fórmula molecular:**C₇H₅BrN₂OS**Massa molar:** 245 g mol⁻¹**Estado físico:** Sólido amarelo**Faixa de Fusão:** 70 - 71 °C**Rendimento:** 79%IV (ATR) ν (cm⁻¹): 3107 cm⁻¹ (CH aromático); 2922 cm⁻¹ (CH alifático); 1528 cm⁻¹ (C=N).RMN de ¹H (CDCl₃; 500 MHz) δ (ppm): 8,08 (1H; dd; *J* = 1,2 Hz; *J* = 3,0 Hz; H1); 7,64 (1H; dd; *J* = 1,0 Hz; *J* = 5,0 Hz; H3); 7,16 (1H; dd; *J* = 3,8 Hz; *J* = 5,0 Hz; H2); 4,53 (2H; s; H7).RMN de ¹³C (CDCl₃; 125 MHz) δ (ppm): 174,5 (C6); 165,5 (C5); 128,3, 127,4, 126,1 (C1, C2 e C3); 127,8 (C4); 16,5 (C7).**5-(bromometil)-3-(4-fluorfenil)-1,2,4-oxadiazol****Fórmula molecular:** C₉H₆BrN₂OF**Massa molar:** 257 g mol⁻¹**Estado físico:** Sólido amarelo**Faixa de Fusão:** 35 -36 °C**Rendimento:** 73%IV (ATR) ν (cm⁻¹): 3045 cm⁻¹ (CH aromático); 2915 cm⁻¹ (CH alifático); 1570 cm⁻¹ (C=N).RMN de ¹H (CDCl₃; 500 MHz) δ (ppm): 8,09-8,07 (2H; m; H2); 7,26-7,16 (2H; m; H3); 4,55 (2H; s; H7).RMN de ¹³C (DMSO-*d*₆; 125 MHz) δ (ppm): 174,8 (C5); 168,3 (C6); 164,9 (d; *J* = 250,6 Hz; C1); 129,8 (d; *J* = 8,8 Hz; C3); 122,6 (d; *J* = 3,2 Hz; C4); 116,3 (d; *J* = 22,0 Hz; C2).

5.4 PROCEDIMENTO GERAL PARA PREPARAÇÃO DOS DERIVADOS 1,2,4 OXADIAZÓLICOS ACOPLADOS A DIAMINAS **10** A **15**

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 0,86 g da diamina comercial (10 mmol; 2,0 eq.), 1,73 g de carbonato de potássio (12,5 mmol; 2,5 eq.) em 25 mL de acetonitrila. Em seguida adicionou-se lentamente 1,23 g do respectivo oxadiazol (5 mmol; 1,0 eq.) solubilizado em 25 mL de acetonitrila. A mistura reacional foi deixada sob agitação magnética e aquecimento (75°C) por uma hora. A reação foi acompanhada por CCD (eluente: 9:1/CH₂Cl₂:MeOH); revelador: luz ultravioleta). Após o término da reação, fez-se sucessivas extrações líquido-líquido utilizando diclorometano e água destilada. A fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido por evaporação sob pressão reduzida. O resíduo obtido da fase orgânica foi então purificado por CCS (eluente: gradiente de CH₂Cl₂:MeOH). Os produtos (**10** e **15**) foram obtidos na forma de óleos amarelos com rendimentos que variaram de 53 a 68%. Os dados físico-químicos e espectroscópicos dos oxadiazóis acoplados a diaminas estão descritos a seguir.

N-((3-(**thi**fen-2-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)metil)etano-1,2-diamina



Fórmula molecular: C₉H₁₂N₄OS

Massa molar: 224 gmol⁻¹

Estado físico: Óleo amarelo

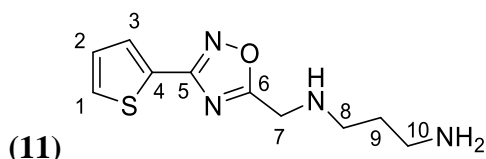
Rendimento: 65%

IV (ATR) v (cm⁻¹): 3310 (NH/NH₂); 1546 (C=N).

RMN de ¹H (CDCl₃; 500 MHz) δ (ppm): 7,79 (1H; d; *J* = 3,1 Hz; H1); 7,49 (1H; d; *J* = 4,9 Hz; H3); 7,14 (1H; d; *J* = 4,0 Hz; H2); 4,10 (2H; s; H7); 2,83 e 2,26 7,79 (2H; t; *J* = 5,0 Hz e 2H; t; *J* = 5,5 Hz; H8 e H9); 1,71 (3H; sl; -NH e -NH₂).

RMN de ¹³C (CDCl₃; 125 MHz) δ (ppm): 178,6 (C6); 164,5 (C5); 129,8, 129,5, 128,1 (C1, C2 e C3); 128,3 (C4); 51,9, 44,8, 41,5 (C7, C8 e C9).

N-((3-(tiofen-2-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)metil)propano-1,3-diamina



Fórmula molecular: C₁₀H₁₄N₄OS

Massa molar: 238 gmol⁻¹

Estado físico: Óleo amarelo

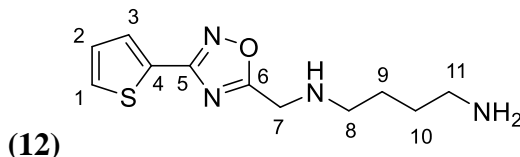
Rendimento: 53%

IV (ATR) v (cm⁻¹): 3371 (NH/NH₂); 1544 (C=N)

RMN de ¹H (CDCl₃; 500 MHz) δ (ppm): 7,79 (1H; d; *J* = 2,6 Hz; H1); 7,49 (1H; d; *J* = 5,0 Hz; H3); 7,14 (1H; t; *J* = 3,8 Hz; H2); 4,09 (2H; s; H7); 2,80-2,76 (4H; m; H8 e H10) e 1,70-1,64 (5H; m; H9 -NH e -NH₂).

RMN de ¹³C (CDCl₃; 125 MHz) δ (ppm): 178,5 (C6); 164,5 (C5); 129,7, 129,5, 128,1 (C1, C2 e C3); 128,3 (C4); 47,4, 45,0, 40,3, 33,4 (C7, C8, C9 e C10).

N-((3-(tiofen-2-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)metil)butano-1,4-diamina



Fórmula molecular: C₁₁H₁₆N₄OS

Massa molar: 252 gmol⁻¹

Estado físico: Óleo amarelo

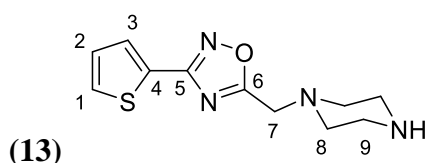
Rendimento: 68%

IV (ATR) v (cm⁻¹): 3323 (NH/NH₂); 3100 (CH aromático); 2940, 2852 (CH alifático);

RMN de ¹H (CDCl₃; 500 MHz) δ (ppm): 7,79 (1H; dd; *J* = 0,95 Hz; *J* = 3,6 Hz; H1); 7,50 (1H; dd; *J* = 0,89 Hz; *J* = 4,9 Hz; H3); 7,14 (1H; dd; *J* = 3,6 Hz; *J* = 4,8 Hz; H2); 4,09 (2H; s; H7); 2,72-2,68 (3H; m; -NH e -NH₂) e 1,59-1,46 (5H; m; H8, H9, H10, H11).

RMN de ¹³C (CDCl₃; 125 MHz) δ (ppm): 178,5 (C6); 164,5 (C5); 129,7, 129,5, 128,1 (C1, C2 e C3); 128,3 (C4); 49,3, 44,9, 42,1, 31,4, 27,4 (C7, C8, C9, C10 e C11).

5-(piperazin-1-ilmetil)-3-(tiofen-2-il)-1,2,4-oxadiazol



Fórmula molecular: C₁₁H₁₄N₄OS

Massa molar: 250 gmol⁻¹

Estado físico: Óleo amarelo

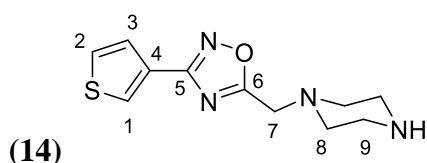
Rendimento: 54%

IV (ATR) ν (cm^{-1}): 3354 (NH); 3094 (CH aromático); 2935, 2808 (CH alifático); 1574 (C=N).

RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) δ (ppm): 7,80 (1H; dd; $J=1,2$ Hz; $J=3,6$ Hz; H1); 7,49 (1H; dd; $J=1,0$ Hz; $J=5,0$ Hz; H3); 7,14 (1H; dd; $J=3,8$ Hz; $J=5,0$ Hz; H2); 3,87 (2H; s; H7); 2,93 (4H; t; $J=4,8$ Hz; H8); 2,60 (4H; s; H9); 1,87 (3H; s; NH).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) δ (ppm): 176,2 (C5); 164,5 (C6); 129,9, 129,5, 128,1 (C1, C2, C3); 128,2 (C4); 54,1, 53,5 (C8, C9); 45,8 (C7).

5-(piperazin-1-ilmetil)-3-(tiofen-3-il)-1,2,4-oxadiazol



Fórmula molecular: $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{OS}$

Massa molar: 250 gmol^{-1}

Estado físico: Óleo amarelo

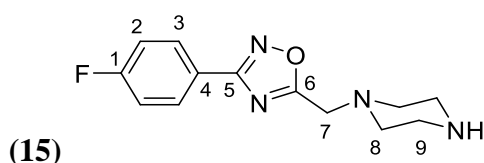
Rendimento: 68%

IV (ATR) ν (cm^{-1}): 3346 (NH); 3103 (CH aromático); 2940, 2820 (CH alifático); 1574 (C=N).

RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) δ (ppm): 8,09 (1H; dd; $J=1,0$ Hz; $J=3,0$ Hz; H1); 7,64 (1H; dd; $J=1,1$ Hz; $J=5,0$ Hz; H3); 7,42 (1H; dd; $J=3,0$ Hz; $J=5,0$ Hz; H2); 3,88 (2H; s; H7); 2,94 (4H; t; $J=4,8$ Hz; H8); 2,61 (4H; s; H9); 1,72 (3H; s; NH).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) δ (ppm): 176,1 (C5); 164,9 (C6); 128,2 (C4); 128,0, 127,1, 126,2 (C1, C2, C3); 54,2, 53,6 (C8, C9); 45,9 (C7).

3-(4-fluorfenil)-5-(piperazin-1-il)-1,2,4-oxadiazol



Fórmula molecular: $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{OF}$

Massa molar: 248 gmol^{-1}

Estado físico: Óleo amarelo

Rendimento: 56%

IV (ATR) ν (cm^{-1}): 3374 (NH); 2946 (CH aromático); 2831 (CH alifático); 1570 (C=N).

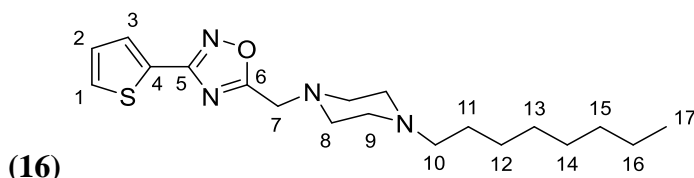
RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) δ (ppm): 8,09-8,07 (2H; m; H2); 7,17-7,14 (2H; m; H2); 3,89 (2H; s; H7); 2,95 (4H; t; $J=4,9$ Hz; H8); 2,64-2,62 (4H; m; H9); 2,03 (2H; s; NH).

RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$; 125 MHz) δ (ppm): 176,4 (C5); 167,7 (C6); 164,7 (d; $J = 250,1$ Hz; C1); 129,8 (d; $J = 8,7$ Hz; C3); 123,0 (d; $J = 3,3$ Hz; C4); 116,2 (d; $J = 21,9$ Hz; C2).

5.5 PROCEDIMENTO GERAL PARA PREPARAÇÃO DOS DERIVADOS 1,2,4- OXADIAZÓLICOS ALQUILADOS **16 A 25**

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 0,50 g do respectivo oxadiazol acoplado a piperazina (2 mmol; 1,0 eq.), 1,40 g do haleto de alquila (6 mmol; 3,0 eq.) e 0,83 g de bicarbonato de sódio (6 mmol; 3,0 eq.) em 20 mL de acetonitrila. A mistura reacional foi deixada sob agitação magnética e aquecimento por cinquenta horas. A reação foi acompanhada por CCD (eluente: 9:1/ CH₂Cl₂:MeOH; revelador: luz ultravioleta). Após o término da reação, o solvente foi rotaevaporado e em seguida fez-se sucessivas extrações líquido-líquido utilizando diclorometano e água destilada. A fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido por evaporação sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi então purificado por CCS (eluente: gradiente CH₂Cl₂:MeOH: 95%/5% v/v). Os produtos (**16 a 25**) foram obtidos na forma de sólido com rendimentos que variaram de 39 a 79%. Os dados físico-químicos e espectroscópicos dos oxadiazóis acoplados a piperazina *N*-alquilada estão descritos a seguir.

5-((4-octilpiperazin-1-il)metil)-3-(tiofen-2-il)-1,2,4-oxadiazol



Fórmula molecular:

C₁₉H₃₀N₄OS

Massa molar: 362 gmol⁻¹

Estado físico: Sólido amarelo

Faixa de Fusão: 49-50 °C

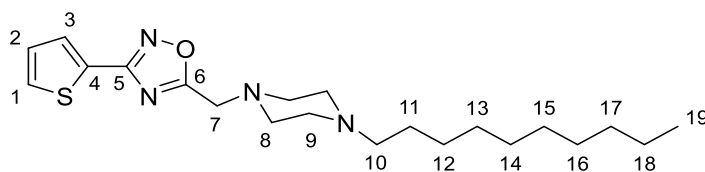
Rendimento: 50%

IV (ATR) ν (cm⁻¹): 2922-2761 (CH alifático); 1571 (C=N).

RMN de ¹H (CDCl₃; 500 MHz) δ (ppm): 7,81 (1H; d; *J*=3,5 Hz; H1); 7,50 (1H; d; *J*=5,0 Hz; H2); 7,15 (1H; t; *J*=3,7 Hz; H3); 3,90 (2H; s; H7); 2,69 e 2,53 (4H e 4H; sl e sl; H8 e H9); 2,33 (2H; t; *J*=7,5 Hz; H10); 1,46 (2H; sl; CH₂); 1,27 (10H; sl; CH₂); 0,87 (3H; t; *J*=6,8 Hz; H17).

RMN de ¹³C (CDCl₃; 125 MHz) δ (ppm): 176,3 (C5); 164,5 (C6); 129,9, 129,5, 128,1 (C1, C2, C3); 128,3 (C4); 58,8 (C7) 53,1 e 53,0 (C8 e C9); 32,0 – 22,8 (CH₂); 14,2 (C17).

5-((4-decilpiperazin-1-il)metil)-3-(tiofen-2-il)-1,2,4-oxadiazol



(17)

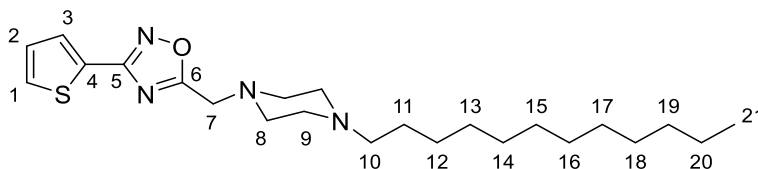
Fórmula molecular:C₂₁H₃₄N₄OS**Massa molar:** 391 gmol⁻¹**Estado físico:** Sólido laranja**Faixa de Fusão:** 52-53°C**Rendimento:** 45%

IV (ATR) v (cm⁻¹): 2913-2756 (CH alifático); 1563 (C=N).

RMN de ¹H (CDCl₃; 500 MHz) δ (ppm): 7,80 (1H; d; *J*=3,6 Hz; H1); 7,49 (1H; d; *J*=5,0 Hz; H2); 7,14 (1H; dd; *J*=3,8 Hz; *J*=4,7 Hz; H3); 3,89 (2H; s; H7); 2,66 e 2,52 (4H e 4H; sl sl; H8 e H9); 2,32 (3H; t; *J*=7,6 Hz; H10); 1,46 (2H; sl; CH₂); 1,26 – 1,24 (14H; m; CH₂); 0,87 (3H; t; *J*=6,5Hz; H19).

RMN de ¹³C (CDCl₃;125 MHz) δ (ppm): 176,2 (C5); 164,5 (C6); 129,9, 129,5, 128,1 (C1, C2, C3); 128,3 (C4); 58,8 (C7); 53,1-53,0 (C8 e C9); 53,0 – 22,8 (CH₂); 14,2 (C19).

5-((4-dodecilpiperazin-1-il)metil)-3-(tiofen-2-il)-1,2,4-oxadiazol



(18)

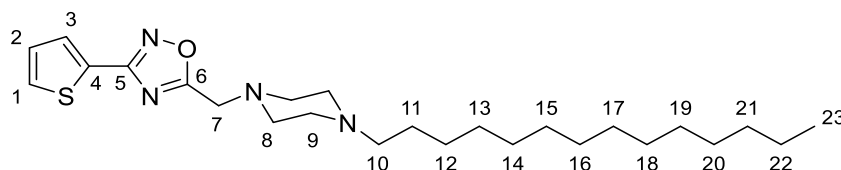
Fórmula molecular:C₂₃H₄₂N₄OS**Massa molar:** 419 gmol⁻¹**Estado físico:** Sólido amarelo**Faixa de Fusão:** 68-69°C**Rendimento:** 79%

IV (ATR) v (cm⁻¹): 2904-2691(CH alifático); 1572 (C=N).

RMN de ¹H (CDCl₃; 500 MHz) δ (ppm): 7,80 (1H; d; *J*=3,6 Hz; H1); 7,49 (1H; d; *J*=5,0 Hz; H3); 7,14 (1H; t; *J*=4,9 Hz; H2); 3,89 (2H; s; H7); 2,68 e 2,51 (4H e 4H; sl e sl; H8 e H9); 2,32 (3H; t; *J*=7,6 Hz; H10); 1,48 – 1,43 (2H; m; CH₂); 1,26 – 1,24 (18H; m; CH₂); 0,86 (3H; t; *J*=6,5 Hz; H21).

RMN de ¹³C (CDCl₃; 125 MHz) δ (ppm): 176,3 (C5); 164,4 (C6); 129,8, 129,4, 128,1 (C1, C2, C3); 128,3 (C4); 58,8 (C7); 53,0 (C8 e C9); 32,0 – 22,8 (CH₂) 14,2 (C21).

5-((4-tetradecilpiperazin-1-il)metil)-3-(tiofen-2-il)-1,2,4-oxadiazol



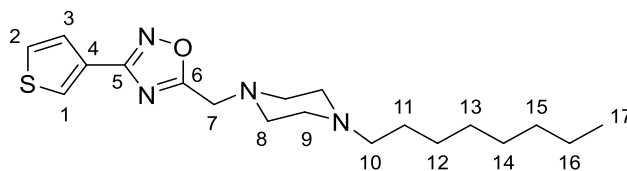
(19)

Fórmula molecular:C₂₅H₄₂N₄OS**Massa molar:** 447
g mol⁻¹**Estado físico:** Sólido
amarelo**Faixa de Fusão:** 72-
73 °C**Rendimento:** 51%**IV (ATR) v (cm⁻¹):** 2910-2768 (CH alifático); 1562 (C=N).

RMN de ¹H (CDCl₃; 500 MHz) δ (ppm): 7,79 (1H; d; *J*=3,5 Hz; H1); 7,48 (1H; d; *J*=4,9 Hz; H3); 7,13 (1H; t; *J*=4,4 Hz; H2); 3,88 (2H; s; H7); 2,67 e 2,51 (4H e 4H; sl e sl; H8 e H9); 2,31 (2H; t; *J*=7,6 Hz; H10); 1,45 (2H; sl; CH₂); 1,25 – 1,23 (22H; m; CH₂); 0,86 (3H; t; *J*=6,5 Hz; H23).

RMN de ¹³C (CDCl₃; 125 MHz) δ (ppm): 176,2 (C5); 164,5 (C6); 129,8, 129,4, 128,0 (C1, C2, C3); 128,3 (C4); 58,8 (C7); 53,0 (C8 e C9); 32,0 – 22,8 (CH₂); 14,2 (C23).

5-((4-octilpiperazin-1-il)metil)-3-(tiofen-3-il)-1,2,4-oxadiazol



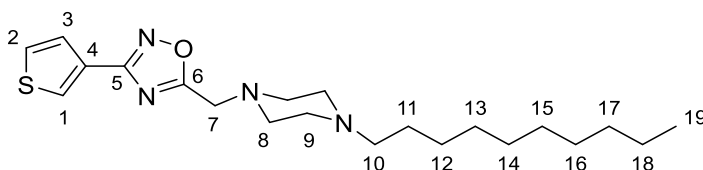
(20)

Fórmula molecular:C₁₉H₃₀N₄OS**Massa molar:** 362 g mol⁻¹**Estado físico:** Sólido amarelo**Faixa de Fusão:** 30-31 °C**Rendimento:** 39%**IV (ATR) v (cm⁻¹):** 2923-2761 (CH alifático); 1574 (C=N).

RMN de ¹H (CDCl₃; 500 MHz) δ (ppm): 8,04 - 8,03 (1H; m; H1); 7,59 (1H; dd; *J*=1,2 Hz; *J*=5,0 Hz; H3); 7,37 – 7,35 (1H; m; H2); 3,84 (2H; s; H7); 2,64 e 2,48 (4H e 4H; sl e sl; H8 e H9); 2,30 – 2,26 (2H; m; H10); 1,42 (2H; sl; CH₂); 1,23 – 1,23 (10H; s; CH₂); 0,82 (3H; t; *J*=6,6 Hz; H17).

RMN de ¹³C (CDCl₃; 125 MHz) δ (ppm): 176,0 (C5); 164,8 (C6); 128,2 (C4); 127,8, 127,0, 126,1 (C1, C2, C3); 58,7 (C7); 52,9 (C8 e C9); 31,8 – 22,7 (CH₂); 14,1 (C23).

5-((4-decilpiperazin-1-il)metil)-3-(tiofen-3-il)-1,2,4-oxadiazol



(21)

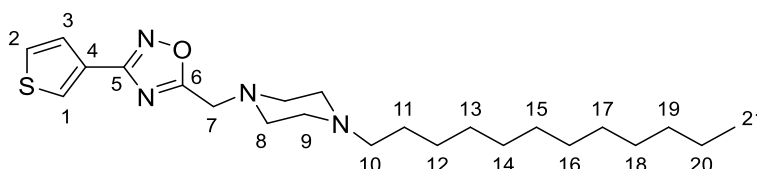
Fórmula molecular:C₂₁H₃₄N₄OS**Massa molar:** 391 gmol⁻¹**Estado físico:** Sólido laranja**Faixa de Fusão:** 45-46 °C**Rendimento:** 44%

IV (ATR) v (cm⁻¹): 2922-2750 (CH alifático); 1568 (C=N).

RMN de ¹H (CDCl₃; 500 MHz) δ (ppm): 8,07 (1H; dd; *J*=1,1 Hz; *J*=3,0 Hz; H1); 7,63 (1H; dd; *J*=1,0 Hz; *J*=5,0 Hz; H3); 7,40 (1H; dd; *J*=3,0 Hz; *J*=5,0 Hz; H2); 3,88 (2H; s; H7); 2,68 e 2,53 (4H e 4H; sl e sl; H8 e H9); 2,33 (2H; t; *J*=7,8 Hz; H10); 1,46 (2H; t; *J*=7,2 Hz; CH₂); 1,26 – 1,24 (14H; m; CH₂); 0,86 (3H; t; *J*=6,8 Hz; H19).

RMN de ¹³C (CDCl₃; 125 MHz) δ (ppm): 176,0 (C5); 164,9 (C6); 128,2 (C4); 127,9, 127,0, 126,2 (C1, C2, C3); 58,8 (C7); 53,0 – 52,9 (C8 e C9); 32,0 – 22,8 (CH₂); 14,2 (C19).

5-((4-dodecylpiperazin-1-il)metil)-3-(tiofen-3-il)-1,2,4-oxadiazol



(22)

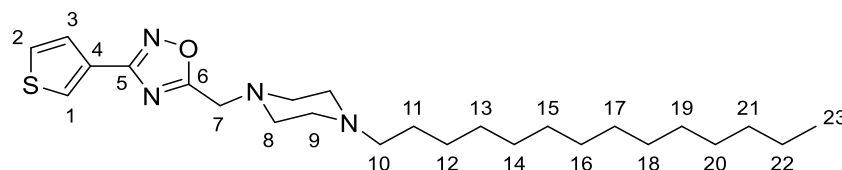
Fórmula molecular:C₂₃H₄₂N₄OS**Massa molar:** 419 gmol⁻¹**Estado físico:** Sólido amarelo**Faixa de Fusão:** 55-58 °C**Rendimento:** 44%

IV (ATR) v (cm⁻¹): 2922-2787 (CH alifático); 1562 (C=N).

RMN de ¹H (CDCl₃; 500 MHz) δ (ppm): 8,08 (1H; dd; *J*=1,2 Hz; *J*=3,0 Hz; H1); 7,64 (1H; dd; *J*=1,2 Hz; *J*=5,0 Hz; H3); 7,41 (1H; dd; *J*=3,0 Hz; *J*=6,6 Hz; H2); 3,89 (2H; s; H7); 2,68 e 2,53 (4H e 4H; sl e sl; H8 e H9); 2,33 (2H; t; *J*=7,7 Hz; H10); 1,47 (2H; t; *J*=7,4 Hz; CH₂); 1,27 – 1,24 (18H; m; CH₂); 0,87 (3H; t; *J*=6,8 Hz; H21).

RMN de ¹³C (CDCl₃; 125 MHz) δ (ppm): 176,1 (C5); 164,9 (C6); 128,2 (C4); 128,0, 127,1, 126,2 (C1, C2, C3); 58,8 (C7); 53,1 – 53,0 (C8 e C9); 32,0 – 22,8 (CH₂); 14,3 (C21).

5-((4-tetradecilpiperazin-1-il)metil)-3-(tiofen-3-il)-1,2,4-oxadiazol



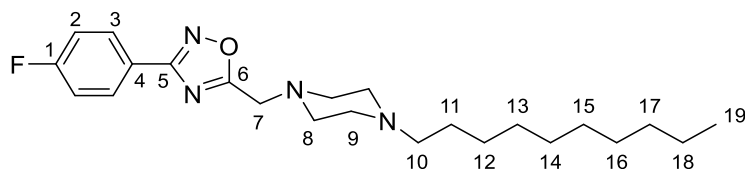
(23)

Fórmula molecular:C₂₅H₄₂N₄OS**Massa molar:** 447
g mol⁻¹**Estado físico:** Sólido
amarelo**Faixa de Fusão:** 65-66
°C**Rendimento:** 50%**IV (ATR) v (cm⁻¹):** 2922-2781 (CH alifático); 1574 (C=N).

RMN de ¹H (CDCl₃; 500 MHz) δ (ppm): 8,08 (1H; dd; ⁴J=1,1 Hz; ³J=3,0 Hz; H1); 7,64 (1H; dd; ⁴J=1,0 Hz; ³J=5,0 Hz; H3); 7,41 (1H; dd; ³J=3,0 Hz; ³J=5,1 Hz; H2); 3,89 (2H; s; H7); 2,69 e 2,53 (4H e 4H; sl e sl; H8 e H9); 2,34-2,31 (2H; m; H10); 1,47 (2H; m; CH₂); 1,26 – 1,24 (22H; m; CH₂); 0,88-0,86 (3H; m; H23).

RMN de ¹³C (CDCl₃; 125 MHz) δ (ppm): 176,1 e 164,9 (C5 e C6); 128,2 (C4); 128,0, 127,1, 126,2 (C1, C2, C3); 58,8 (C7); 53,1 – 53,0 (C8 e C9); 32,0 – 22,8 (CH₂); 14,2 (C23).

5-((4-decilpiperazin-1-il)metil)-3-(4-fluorfenil)-1,2,4-oxadiazol



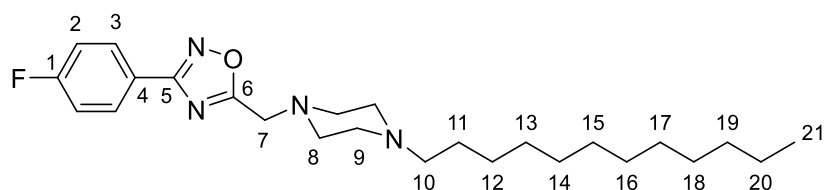
(24)

Fórmula molecular:C₂₃H₃₅N₄OF**Massa molar:** 402 g mol⁻¹**Estado físico:** Sólido branco**Rendimento:** 52%**IV (ATR) v (cm⁻¹):** 2955-2855 (CH alifático); 15784 (C=N).

RMN de ¹H (CDCl₃; 500 MHz) δ (ppm): 8,10-8,07 (2H; m; H2); 7,16-7,14 (2H; m; H3); 3,91 (2H; s; H7); 2,70 e 2,53 (4H e 4H; sl e sl; H8 e H9); 2,35-2,32 (2H; m; H10); 1,46-1,45 (2H; m; CH₂); 1,26 – 1,24 (22H; m; CH₂); 0,88-0,85 (3H; m; H23).

RMN de ¹³C (CDCl₃; 125 MHz) δ (ppm): 176,4 e 167,7 (C5 e C6); 164,7 (d; J = 250,1 Hz; C1); 129,8 (d; J = 8,7 Hz; C3); 123,0 (d; J = 3,2 Hz; C4); 116,2 (d; J = 21,9 Hz; C2) 58,8 (C7); 53,1 – 53,0 (C8 e C9); 32,0 – 22,8 (CH₂); 14,2 (C19).

5-((4-dodecylpiperazin-1-il)metil)-3-(4-fluorfenil)-1,2,4-oxadiazol



(25)

Fórmula molecular:
 $C_{25}H_{46}N_4OF$
Massa molar: 430 $g\text{mol}^{-1}$
Estado físico:
 Sólido branco
Faixa de Fusão:
 53-54 °C
Rendimento: 63%

IV (ATR) ν (cm^{-1}): 2915-2854 (CH alifático); 1566 (C=N).

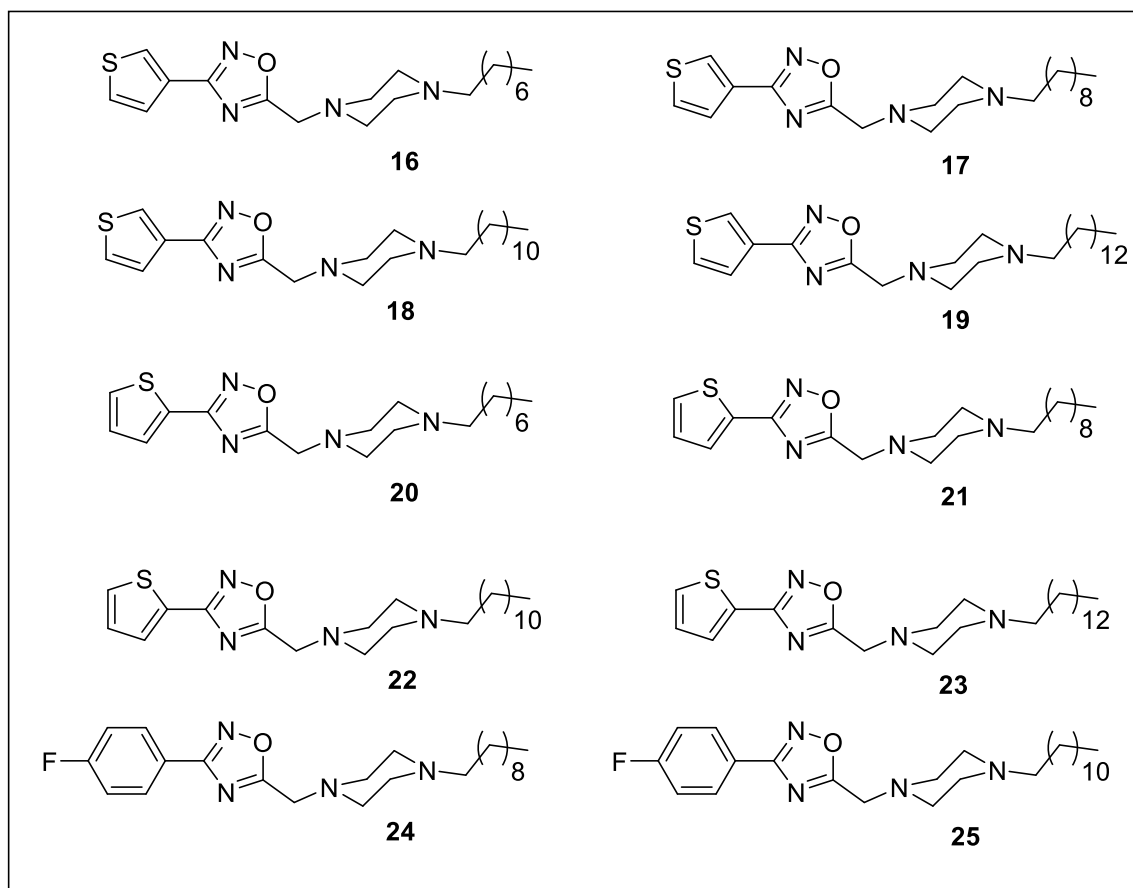
RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) δ (ppm): 8,10-8,08 (2H; m; H2); 7,18-7,14 (2H; m; H3); 3,91 (2H; s; H7); 2,70 e 2,53 (4H e 4H; sl e sl; H8 e H9); 2,34-2,31 (2H; m; H10); 1,48-1,45 (2H; m; CH_2); 1,27 – 1,24 (22H; m; CH_2); 0,88-0,86 (3H; m; H23).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) δ (ppm): 176,4 e 167,7 (C5 e C6); 164,7 (d; $J = 250,1$ Hz; C1); 129,8 (d; $J = 8,6$ Hz; C3); 123,0 (d; $J = 3,2$ Hz; C4); 116,2 (d; $J = 21,9$ Hz; C2) 58,8 (C7); 53,1 – 53,0 (C8 e C9); 32,0 – 22,8 (CH_2); 14,2 (C21).

6 CONCLUSÃO

Nesse trabalho foram sintetizados vinte e dois compostos, dentre esses dez são inéditos (Figura 24).

Figura 24 - Derivados 1,2,4-oxadiazólicos inéditos sintetizados nesse trabalho.



Fonte: Elaborada pela própria autora.

Todos os compostos foram avaliados com relação a atividade antitumoral através do ensaio de citotoxicidade e determinação do CI₅₀ em linhagens de células animais em colaboração com a Prof^a Dr^a Heveline Silva do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais. Além disso, os compostos **7**, **8**, **13**, **14**, **16-23** foram avaliados com relação a atividade antitumoral através do ensaio de citotoxicidade e determinação do CI₅₀ em linhagens de células humanas em colaboração com o grupo de pesquisa da Dr^a Luciana Maria Silva da Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte.

Os compostos sintetizados nesse trabalho apresentaram melhora na atividade e seletividade frente as linhagens de células animais, se comparado com resultados obtidos anteriormente no nosso grupo de pesquisa. Destacando-se os resultados obtidos para os precursores **7**, **8** e **9**, além dos resultados obtidos para os derivados oxadiazólicos contendo em sua estrutura unidades de piperazina *N*-alquiladas com 12 átomos de carbono e substituinte tiofenil (**18** e **21**). Para os derivados contendo o substituinte 4-fluorfenil, é possível observar atividade antitumoral promissora e boa seletividade frente a linhagem CT26.WT.

Apesar dos compostos apresentarem atividade antitumoral frente a linhagem humana testada, apenas os compostos **20** e **22** se mostraram seletivos. Pela análise do ensaio de indução de morte por apoptose pode-se afirmar que o composto **22** induz alta taxa de necrose. Com os resultados obtidos até o momento não é possível afirmar que o composto **20** induz morte celular, porém pelo ensaio de ciclo celular é possível perceber que as células após serem tratadas com o composto **20**, tendem a parar seu ciclo celular em G1, inibindo a multiplicação celular. Tal fato pode estar relacionado à baixa taxa metabólica mitocondrial avaliada pela determinação do valor de CI₅₀.

Os resultados dos testes de apoptose e de ciclo celular são preliminares e, portanto, precisam ser replicados para obtenção de dados estatísticos e/ou confirmação da análise.

Está sendo realizado o ensaio de clonogenicidade, com o intuito de investigar a capacidade de uma única célula crescer e se tornar uma colônia, quando tratada com o composto **20**. Esse composto foi selecionado para o ensaio clonogênico visto que o mesmo possui baixa taxa de morte celular por necrose e possui o maior índice de seletividade.

REFERÊNCIAS

- ALABUGIN, I. V.; ZEIDAN, T. A. Stereoelectronic effects and general trends in hyperconjugative acceptor ability of sigma bonds. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 12, p. 3175-3185, 2002.
- BENLTIFA, M. *et al.* 1,3-Dipolar cycloaddition reactions on carbohydrate-based templates: synthesis of spiro-isoxazolines and 1,2,4-oxadiazoles as glycogen phosphorylase inhibitors. **Tetrahedron Letters**, v. 47, n. 34, p. 6143-6147, 2006.
- BOSTROM, J. *et al.* Oxadiazoles in Medicinal Chemistry. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 5, p. 1817-1830, 2012.
- BRETANHA, L. C. *et al.* Ultrasound-promoted synthesis of 3-trichloromethyl-5-alkyl(aryl)-1,2,4-oxadiazoles. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 3, p. 704-707, 2011.
- CANESCHI, W. *et al.* Synthesis and anticancer evaluation of new lipophilic 1,2,4 and 1,3,4-oxadiazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 165, p. 18-30, 2019.
- CANESCHI, W. **Síntese e avaliação biológica de 1,2,4- e 1,3,4-oxadiazóis**. 2016. 348 f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2016.
- CANESCHI, W. **Síntese e avaliação biológica de 1,3,4-oxadiazóis derivados da isoniazida**. 2013. 220 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.
- CANESCHI, W.; CENZI, G.; VAROTTI, F.P.; COURI, M. R. C. **Compostos sintéticos derivados de 2,3-diidro-1,3,4-oxadiazóis com atividade antitumoral**. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020130106100, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 30/03/2013. Publicação: 23/06/2015.
- CHAVES, J. D. S., *et al.*, Novel gold(I) complexes with 5-phenyl-1,3,4-oxadiazole-2-thione and phosphine as potential anticancer and antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 127:727-739, 2017;
- COTTRELL, D. M. *et al.* Antikinetoplastid activity of 3-aryl-5-thiocyanatomethyl-1,2,4-oxadiazoles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 11, p. 2815-2824, 2004.
- DE FREITAS, J. J. R. *et al.* Microwave-induced one-pot synthesis of 4- 3-(aryl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl -butan-2-ones under solvent free conditions. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 35, p. 6195-6198, 2007.
- DELOST, M. D. *et al.* From Oxiranes to Oligomers: Architectures of US FDA Approved Pharmaceuticals Containing Oxygen Heterocycles. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 24, p. 10996-11020, 2018.

DU, W. *et al.* A one-pot synthesis of 3-substituted-5-carbonylmethyl-1,2,4-oxadiazoles from beta-keto esters and amidoximes under solvent-free conditions. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 13, p. 2231-2235, 2007.

ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v.35, n. 4, p. 495-516, 2007.

ENES, K. B. **Síntese e avaliação biológica de 1,2,4-oxadiazóis acoplados a diaminas**. 2017. 153 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.

FERNANDES, F. S., *et al.* Anthelmintic effects of alkylated diamines and amino alcohols against *Schistosoma mansoni*. **BioMed Research International**, v. 2013, 1-9, 2013.

FLIPO, M. *et al.* Ethionamide Boosters: Synthesis, Biological Activity, and Structure-Activity Relationships of a Series of 1,2,4-Oxadiazole EthR Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2994-3010, 2011.

GLOBAL CANCER OBERVATORY. Disponível em: <http://gco.iarc.fr/>. Acesso em 19 de outubro de 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2018 – Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>. Acesso em: 19 de outubro de 2018.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **World Cancer Report 2014**. Disponível em: <http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>. Acesso em: 19 de outubro de 2018.

KABOUDIN, B.; MALEKZADEH, L. Organic reactions in water: an efficient method for the synthesis of 1,2,4-oxadiazoles in water. **Tetrahedron Letters**, v. 52, n. 48, p. 6424-6426, 2011.

KATRITZKY, A. R., *et al.*; **Comprehensive Heterocyclic Chemistry III**. Holanda: Elsevier Science, 2008. 12500 p.

KEMNITZER, W., *et al.* Discovery of 3-aryl-5-aryl-1,2,4-oxadiazoles as a new series of apoptosis inducers. 2. Identification of more aqueous soluble analogs as potential anticancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 15, 4410–4415, 2009.

KHATIK, G.L., *et al.* 1,2,4-Oxadiazoles: A new class of anti-prostate cancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 5, 1912–1916, 2012.

LI, E. T. *et al.* NBS-mediated practical cyclization of N-acyl amidines to 1,2,4-oxadiazoles via oxidative N-O bond formation. **Tetrahedron**, v. 74, n. 35, p. 4613-4618, 2018.

MAFTEI, C. V. *et al.* Novel 1,2,4-oxadiazoles and trifluoromethylpyridines related to natural products: synthesis, structural analysis and investigation of their antitumor activity. **Tetrahedron**, v. 72, n. 9, p. 1185-1199, 2016.

MIRALINAGHI, P. *et al.* Synthesis, molecular docking study, and anticancer activity of triaryl-1,2,4-oxadiazole. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, p. 4253-4262, 2013.

MOSMANN, T.; Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods.**, 65, 55-63, 1983.

O'LOUGHLIN, R. S. *et al.* **The Delineator**, v. 99, Nova Iorque: The Butterick Publishing Co., 1922.

OZCAN, S. *et al.* Oxadiazole-isopropylamides as Potent and Noncovalent Proteasome Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 10, p. 3783-3805, 2013.

PACE, A. *et al.* Recent Advances in the Chemistry of 1,2,4-Oxadiazoles. **Advances in Heterocyclic Chemistry**, v. 116, p. 85-136, 2015.

PECORINO, L.; **Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics**. 3.ed. Estados Unidos: Oxford, 2012. 342 p.

SHARONOVA, T. *et al.* Facile room-temperature assembly of the 1,2,4-oxadiazole core from readily available amidoximes and carboxylic acids. **Tetrahedron Letters**, v. 59, n. 29, p. 2824-2827, 2018.

SRIVASTAVA, R. M. *et al.* Antiinflammatory property of 3-aryl-5-(n-propyl)1,2,4-oxadiazoles and antimicrobial property of 3-aryl-5-(n-propyl)-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazoles: Their syntheses and spectroscopic studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 8, p. 1821-1827, 2003.

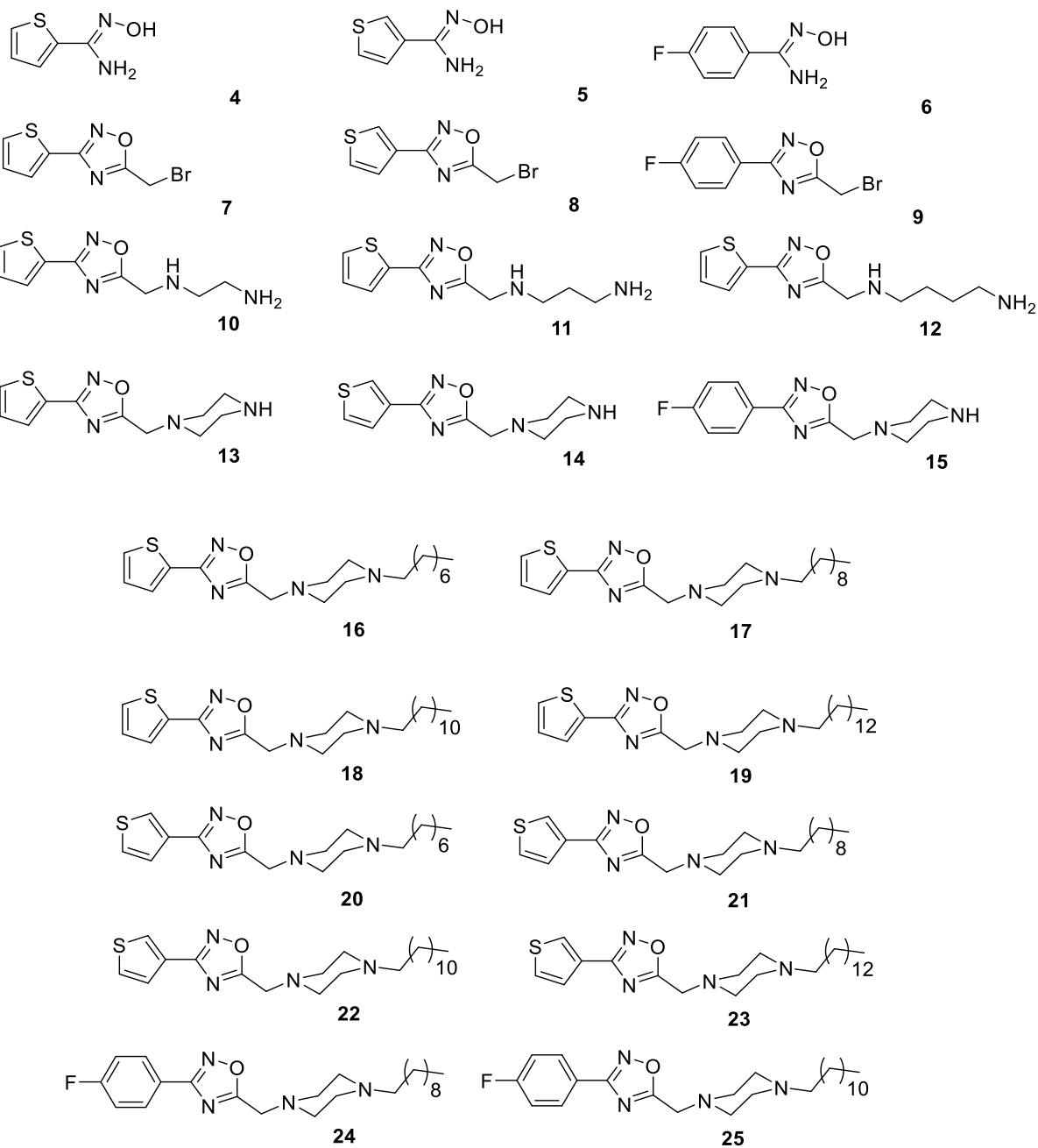
TAVEIRA, A. F. Preparation and antitubercular activities of alkylated amino alcohols and their glycosylated derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, V. 15, n. 24, 7789-7794, 2007.

VITAKU, E.; SMITH, D. T.; NJARDARSON, J. T. Analysis of the Structural Diversity, Substitution Patterns, and Frequency of Nitrogen Heterocycles among US FDA Approved Pharmaceuticals. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 24, p. 10257-10274, 2014.

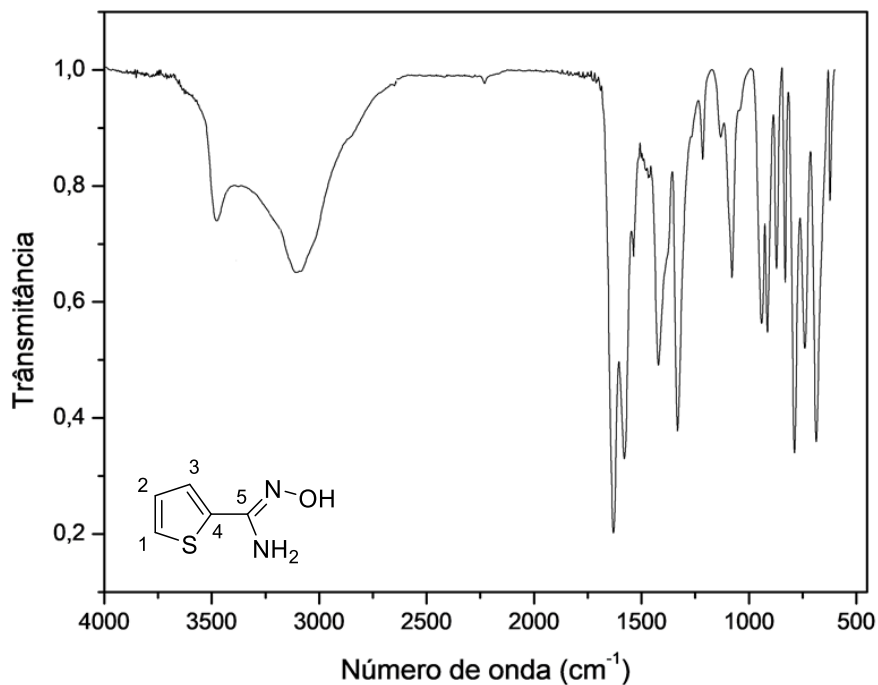
VOROS, A., *et al.* An experimental and theoretical study of reaction mechanisms between nitriles and hydroxylamine. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.12, p. 803-8047, 2014.

ZHANG, H.Z., *et al.* Discovery and structure-activity relationship of 3-aryl-5-aryl-1,2,4-oxadiazoles as a new series of apoptosis inducers and potential anticancer agents. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 48, n. 16, 5215-5223, 2005.

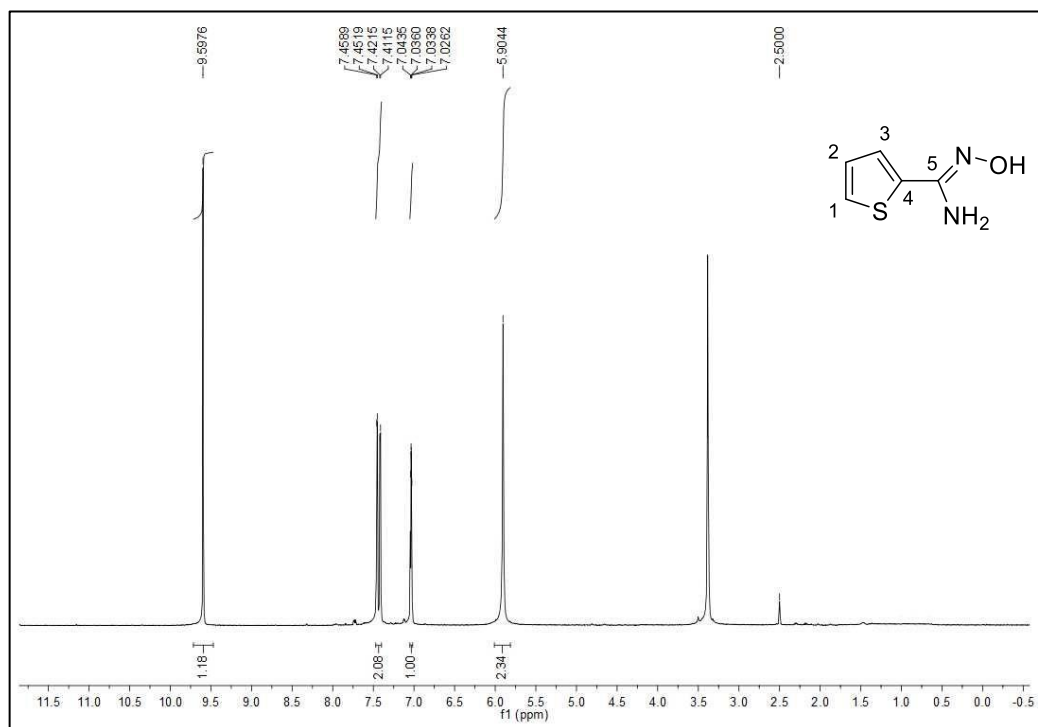
APÊNDICE A - Lista de estruturas dos compostos sintetizados neste trabalho



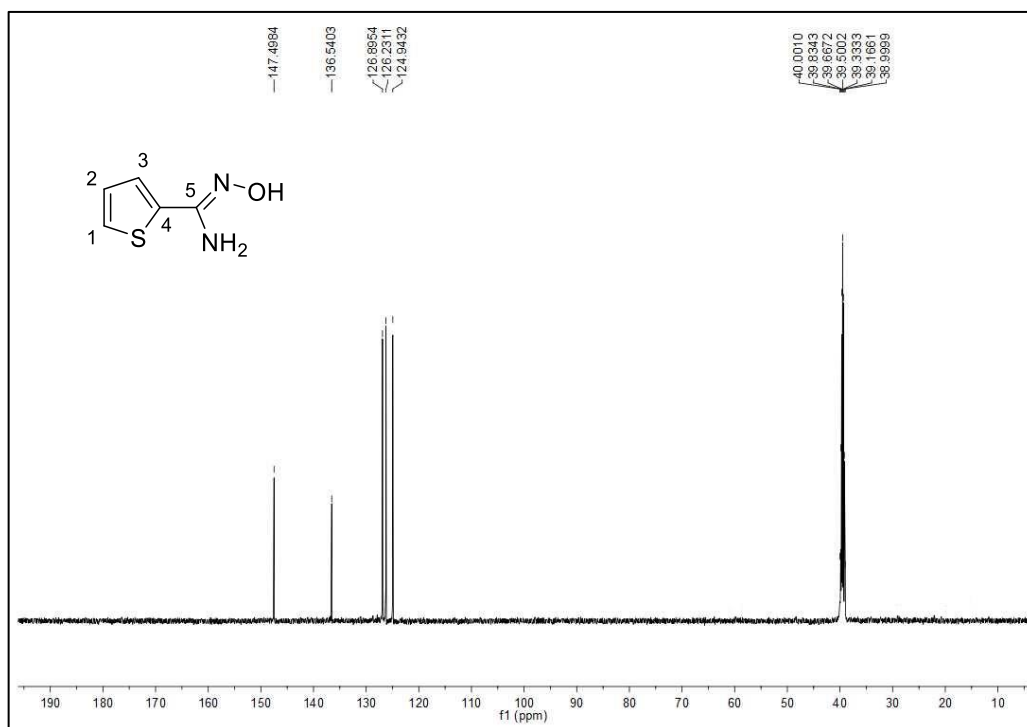
APÊNDICE B – Espectros

Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (4).

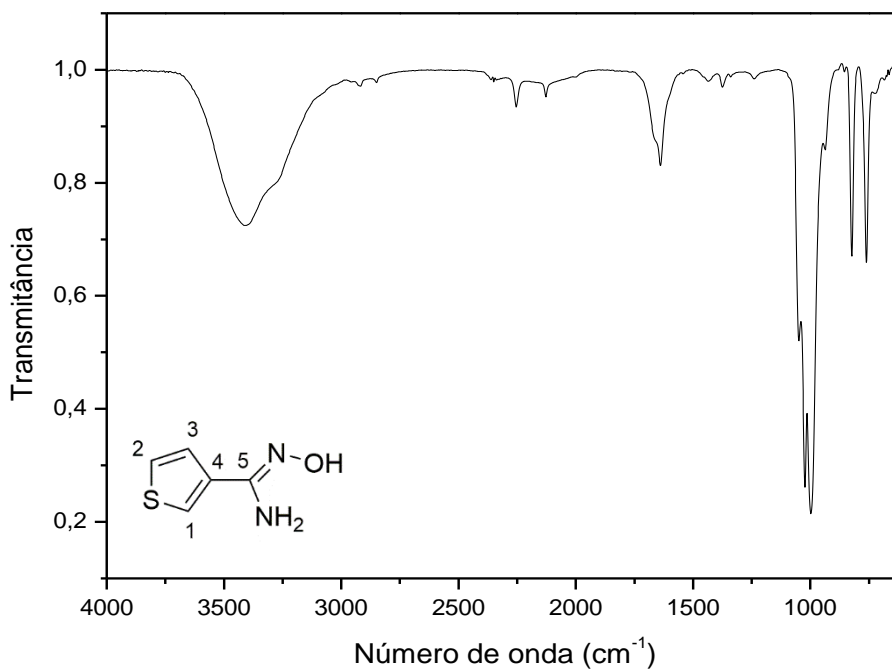
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$; 500 MHz) do composto (4)

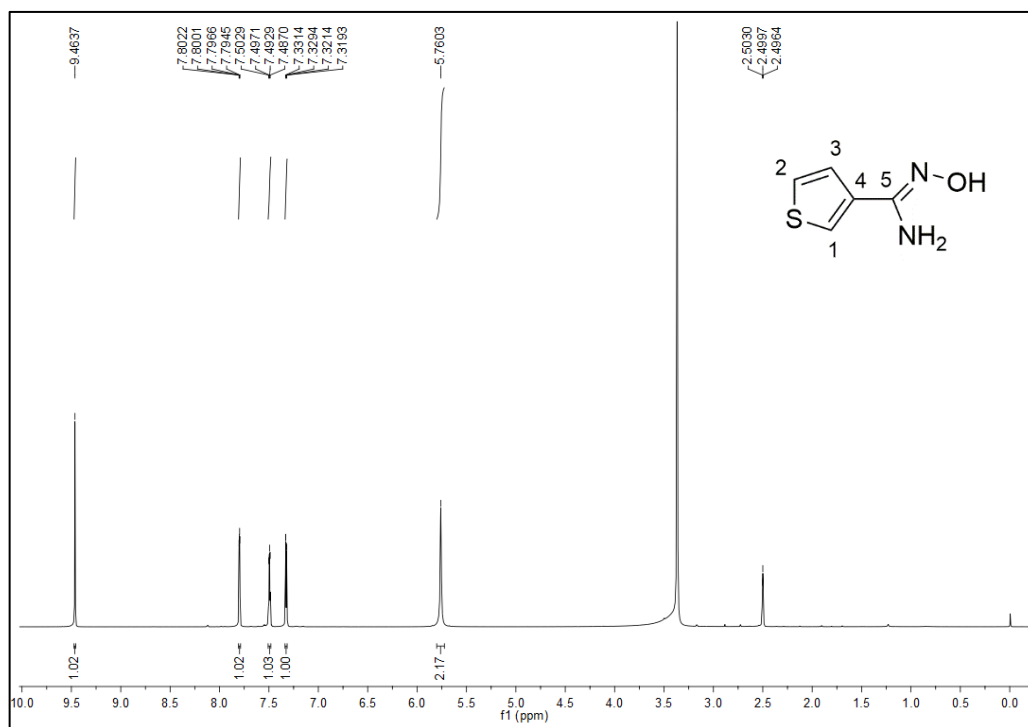
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 ; 125 MHz) do composto (4)

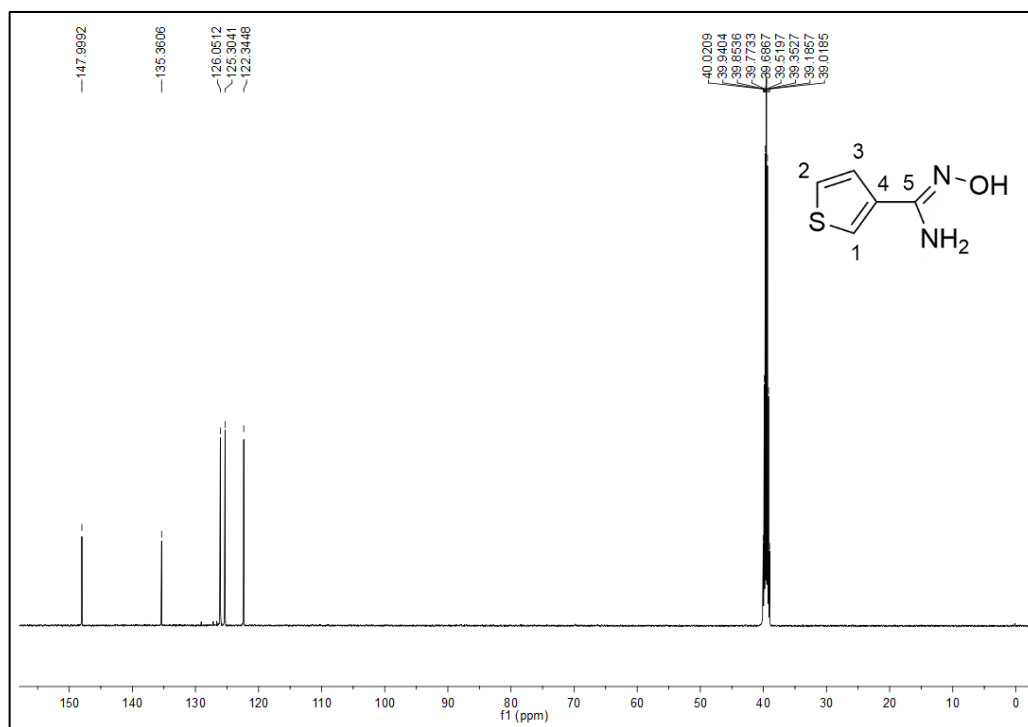
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (5).

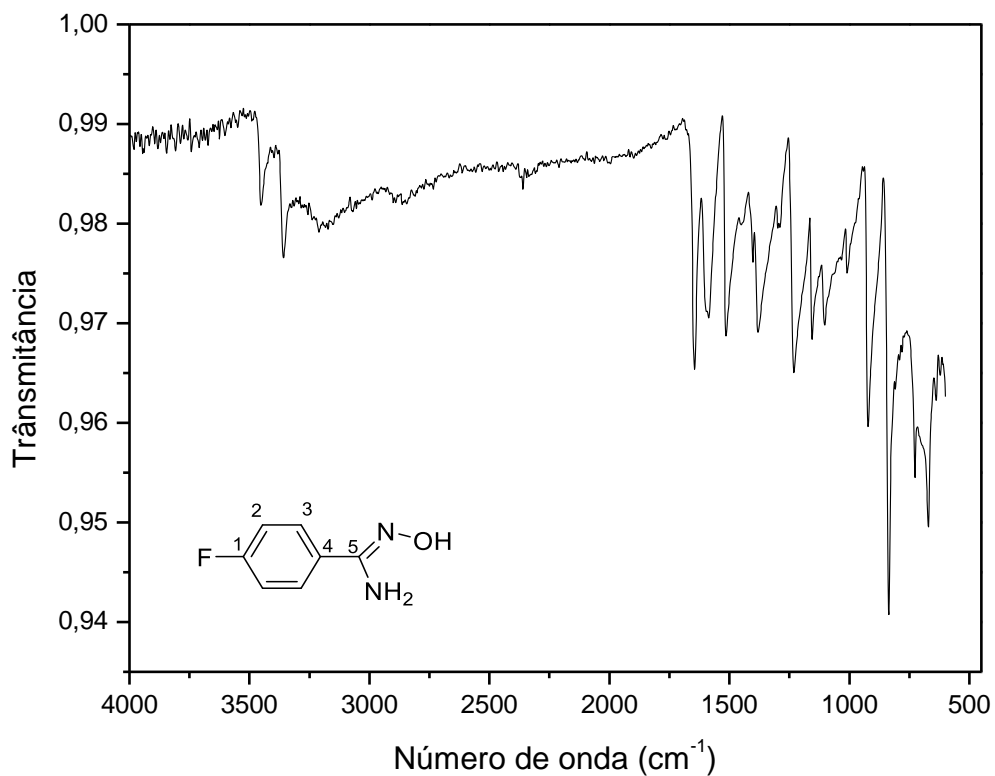
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 ; 500 MHz) do composto (5)

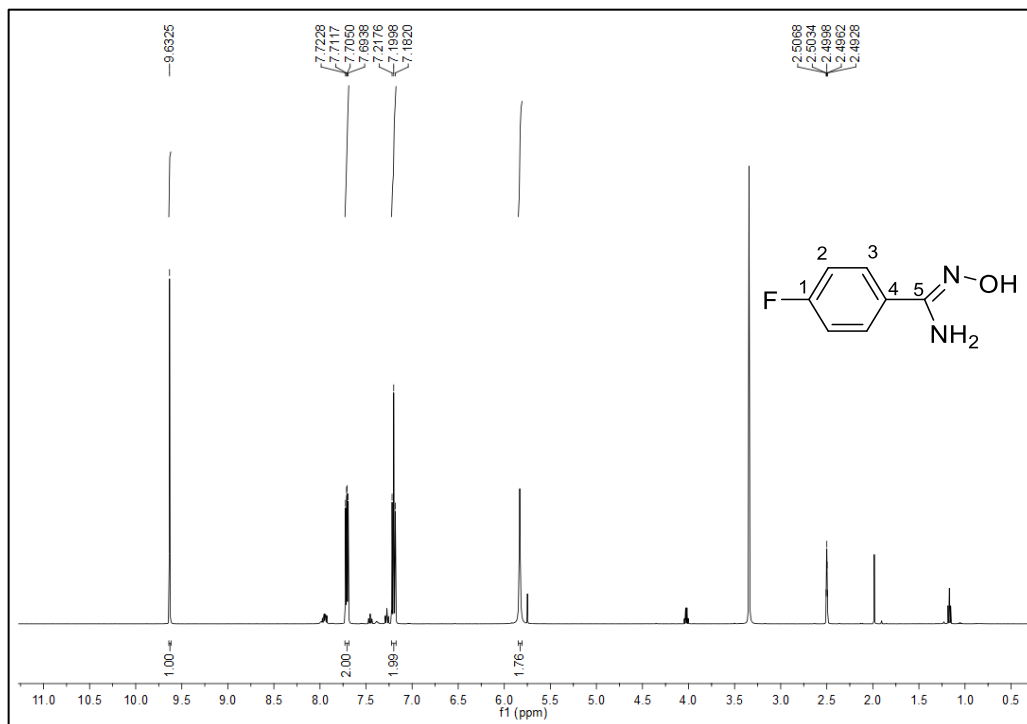
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 ; 125 MHz) do composto (5)

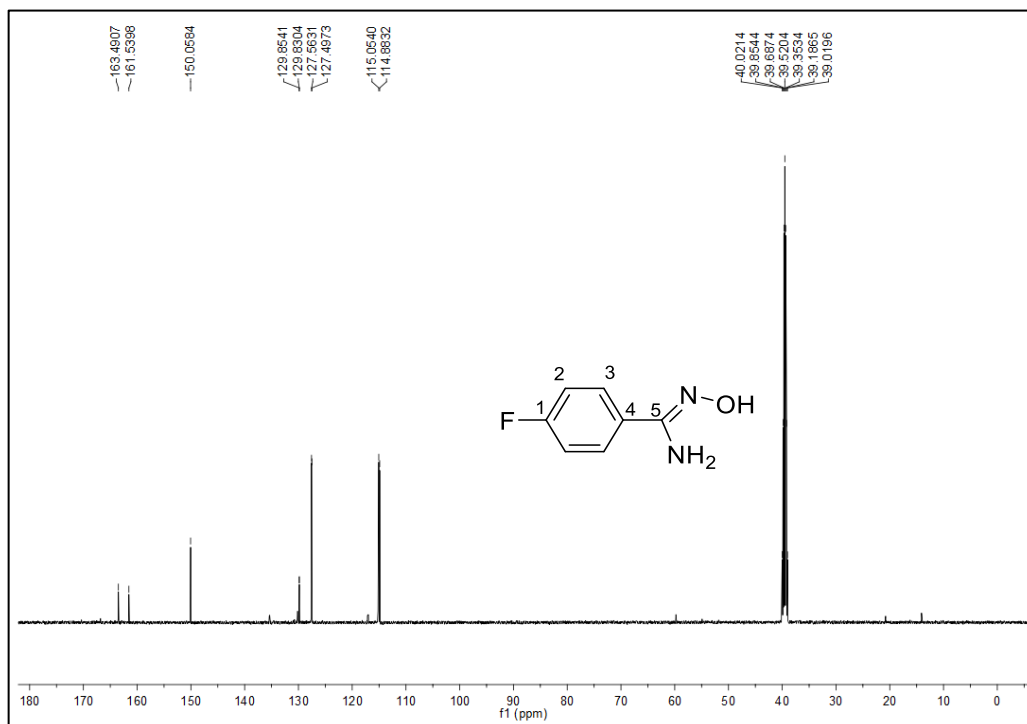
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (6).

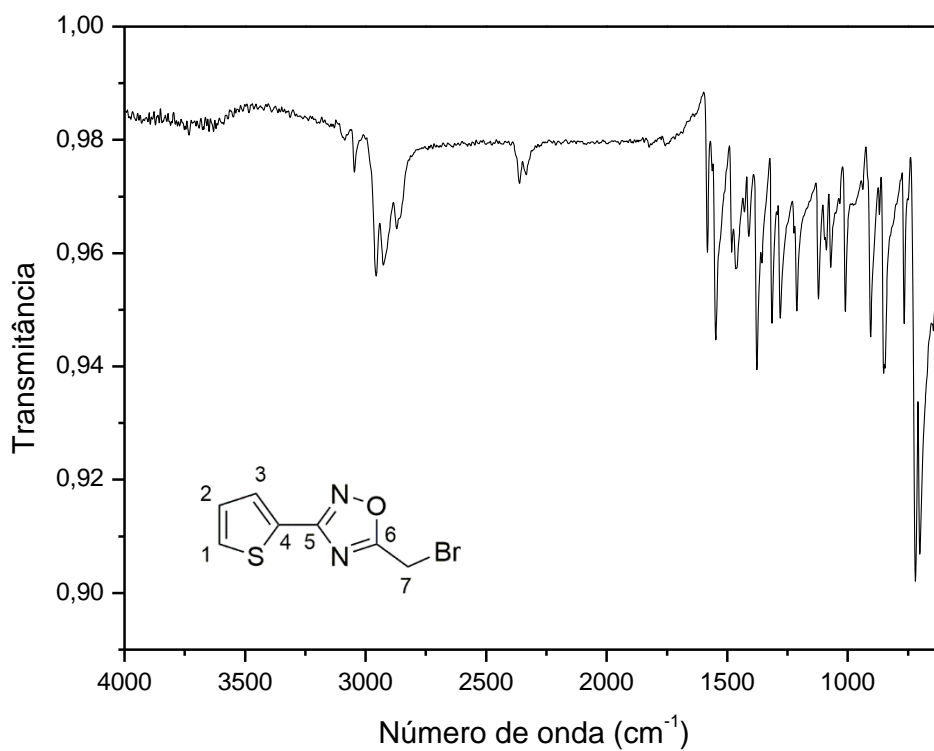
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$; 500 MHz) do composto (6)

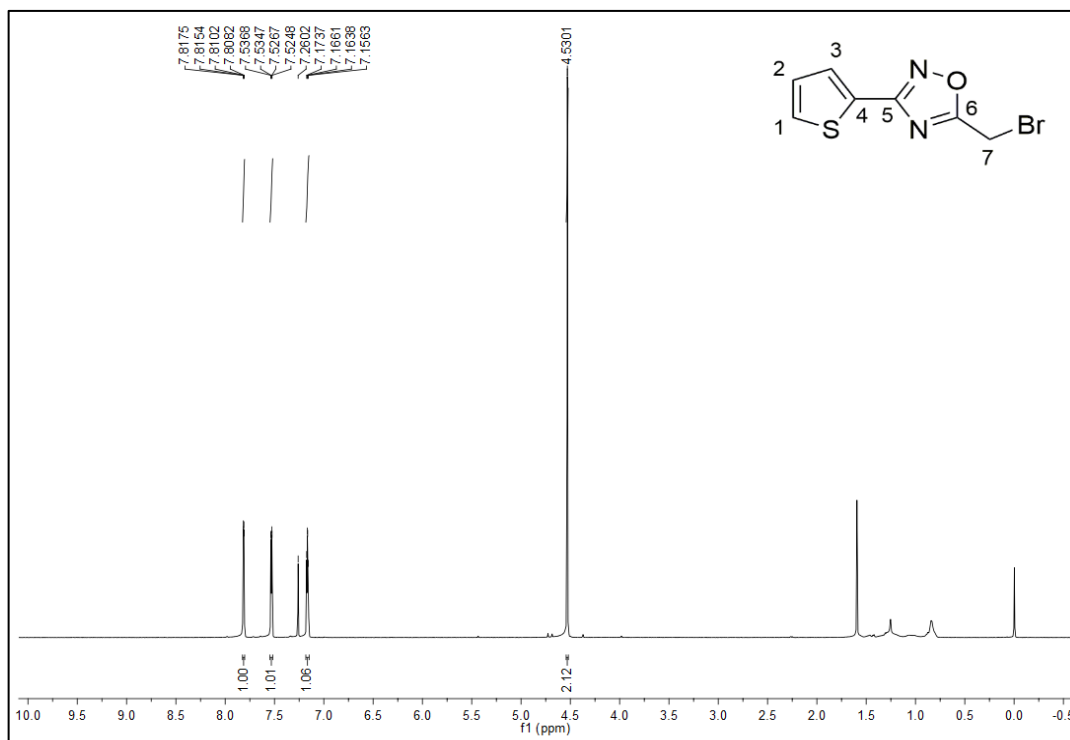
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 ; 125 MHz) do composto (6)

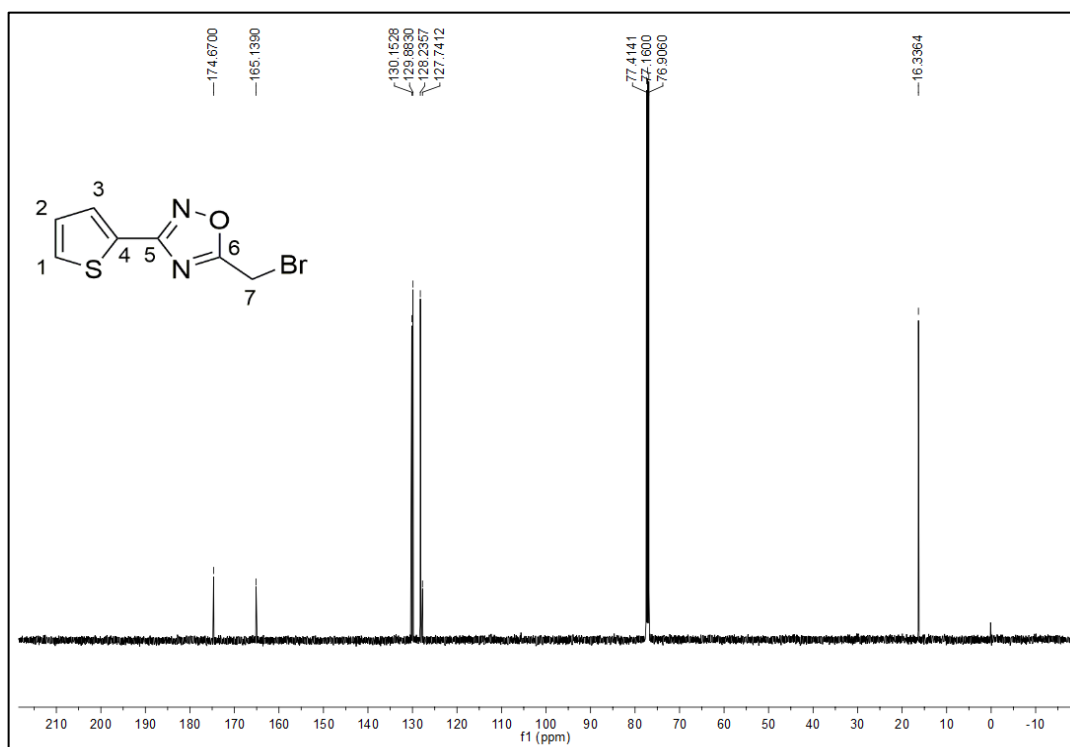
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (7).

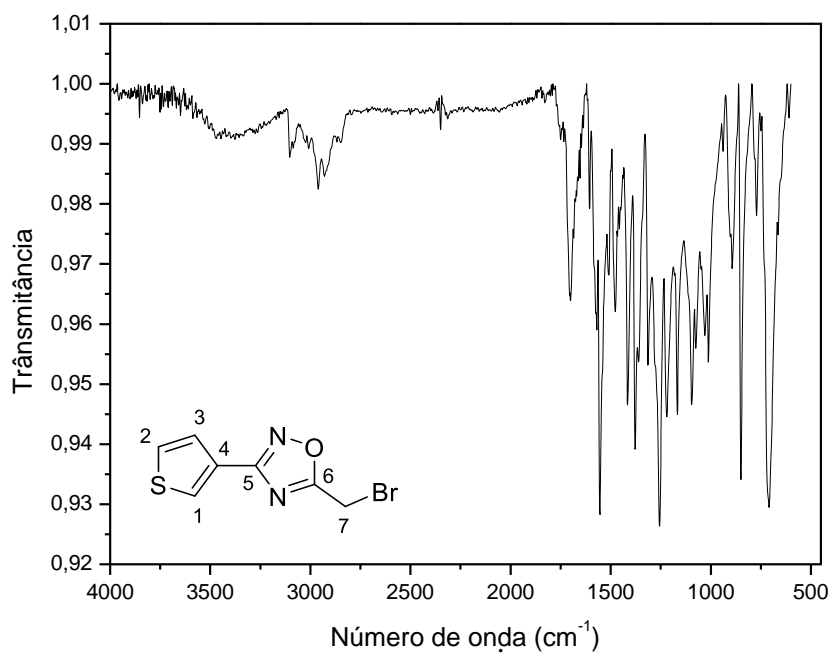
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do composto (7)

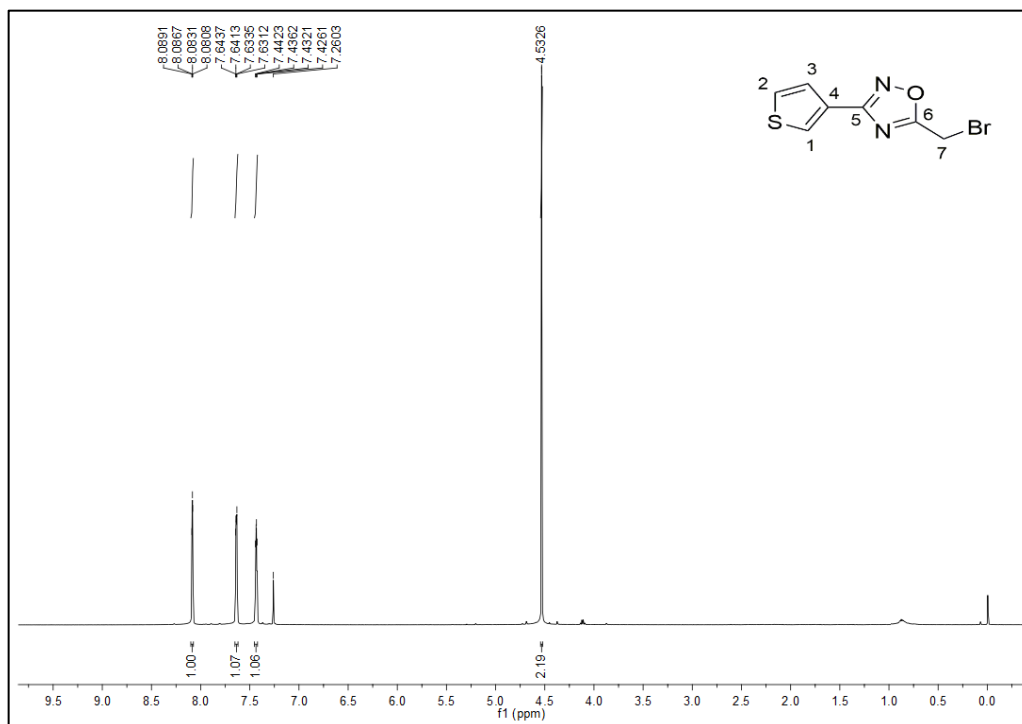
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) do composto (7)

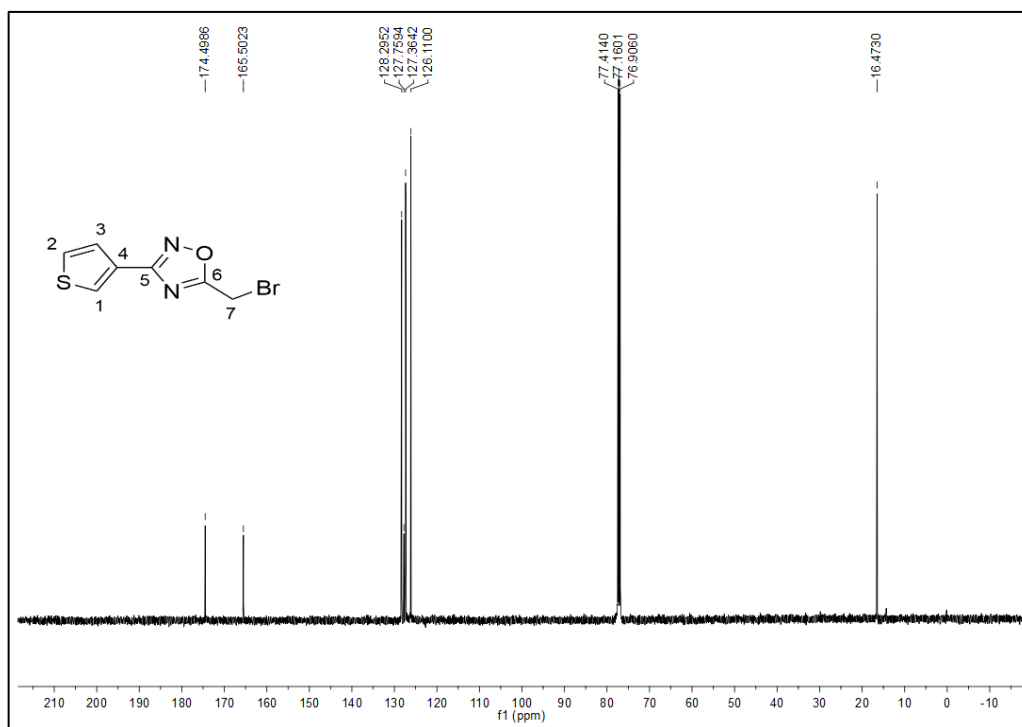
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (8)

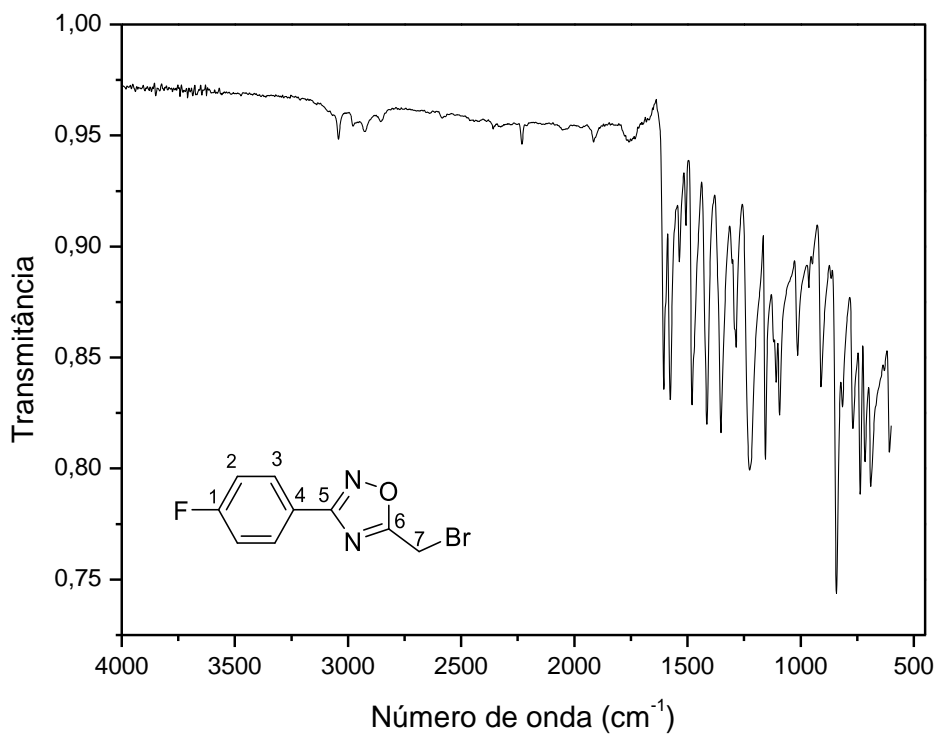
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do composto (8)

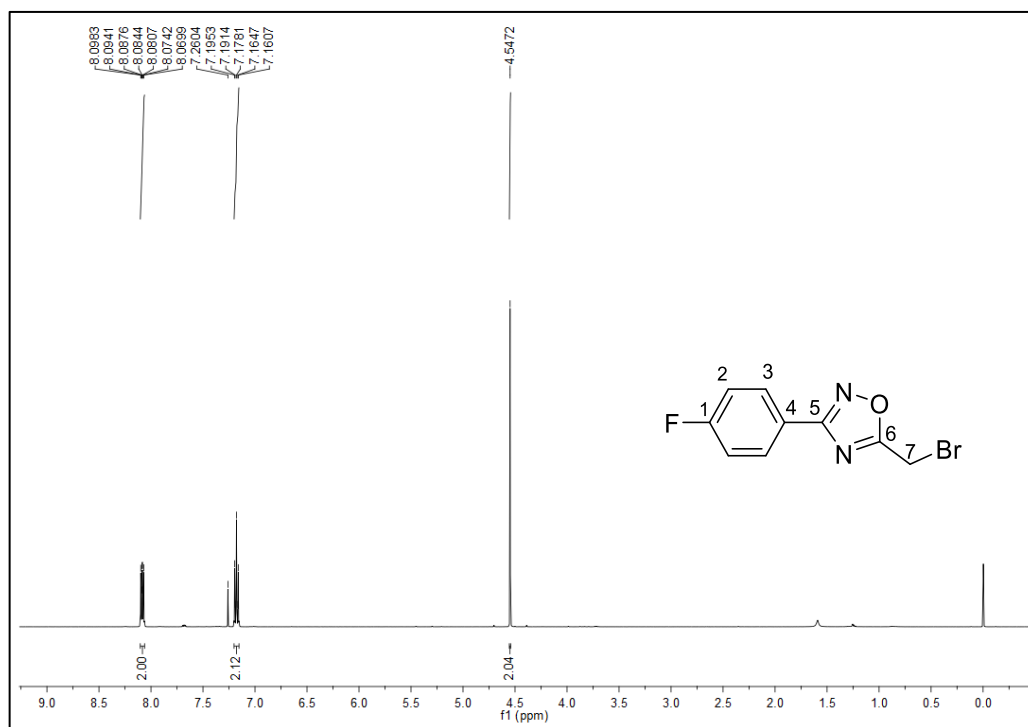
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) do composto (8)

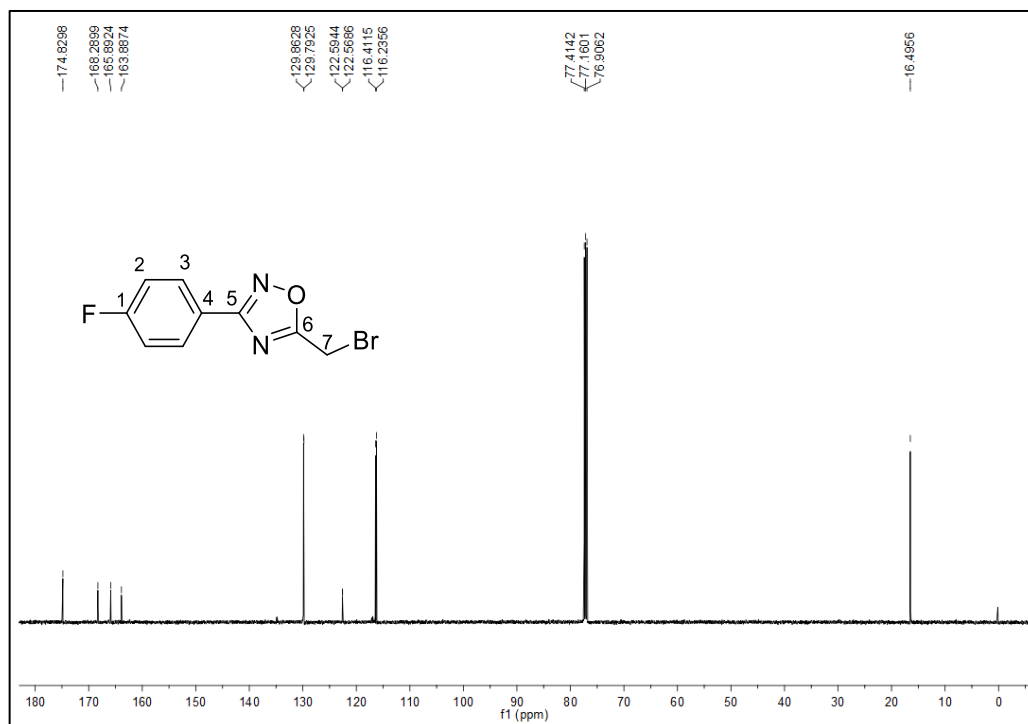
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (9).

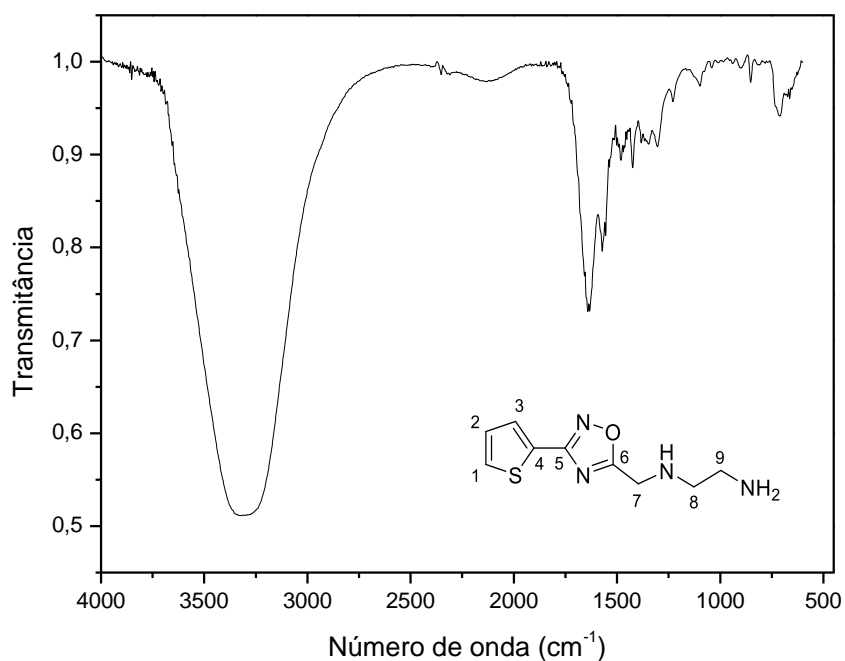
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do composto (9)

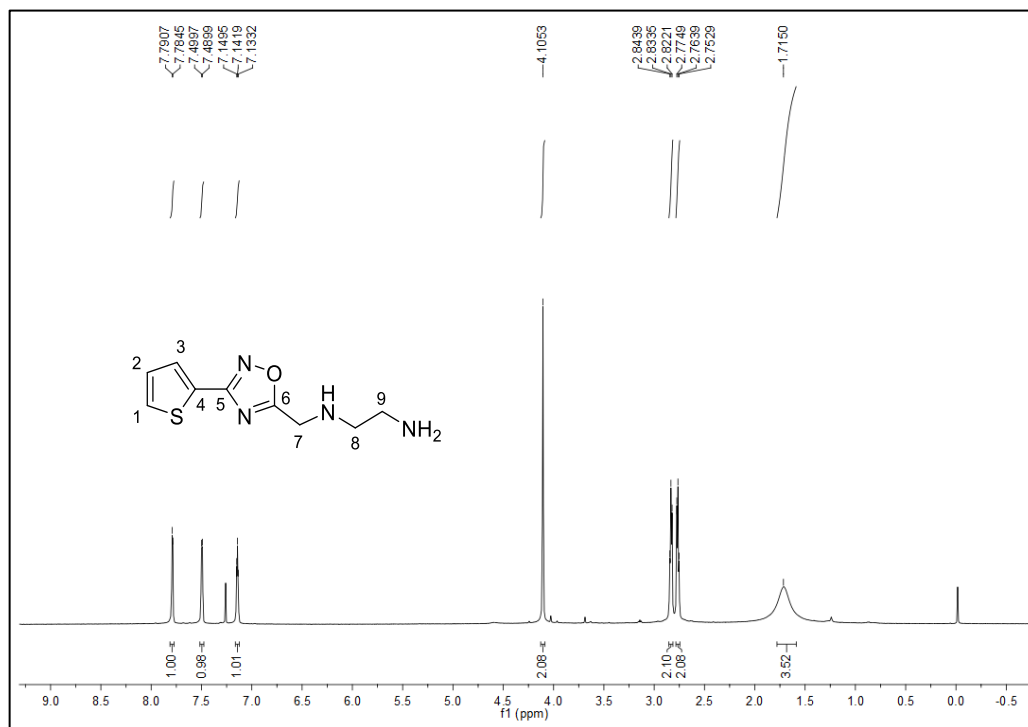
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) do composto (9)

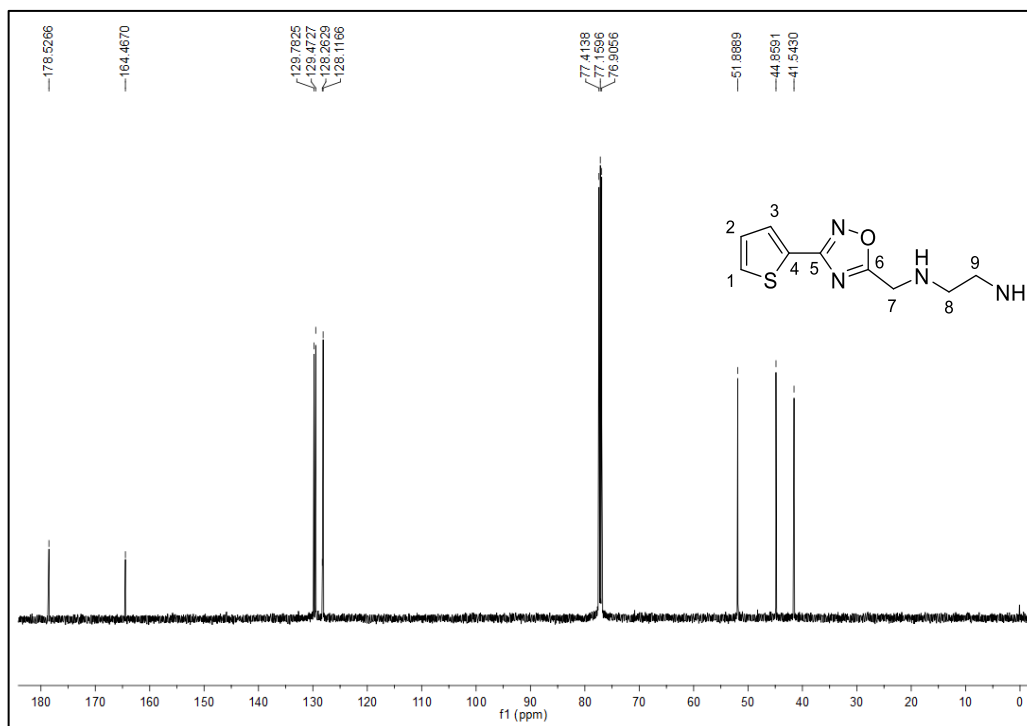
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (10).

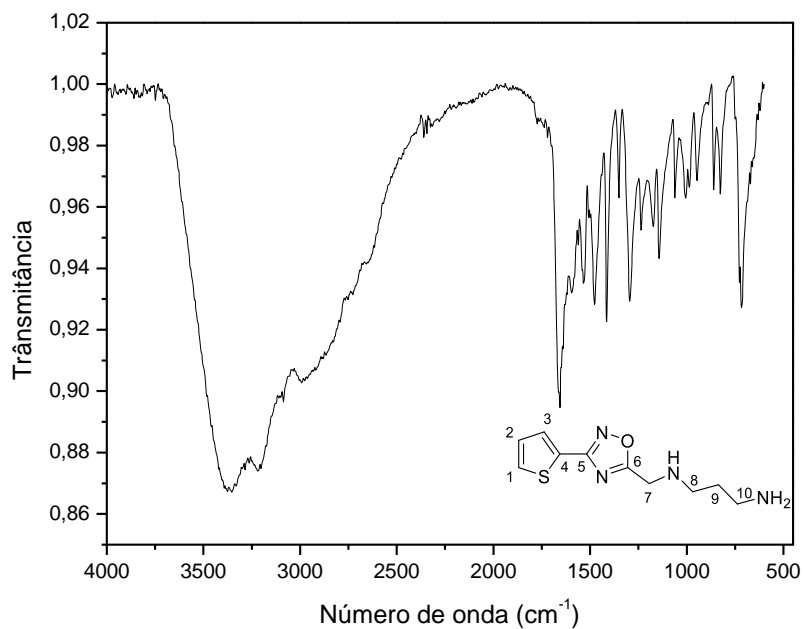
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do composto (10)

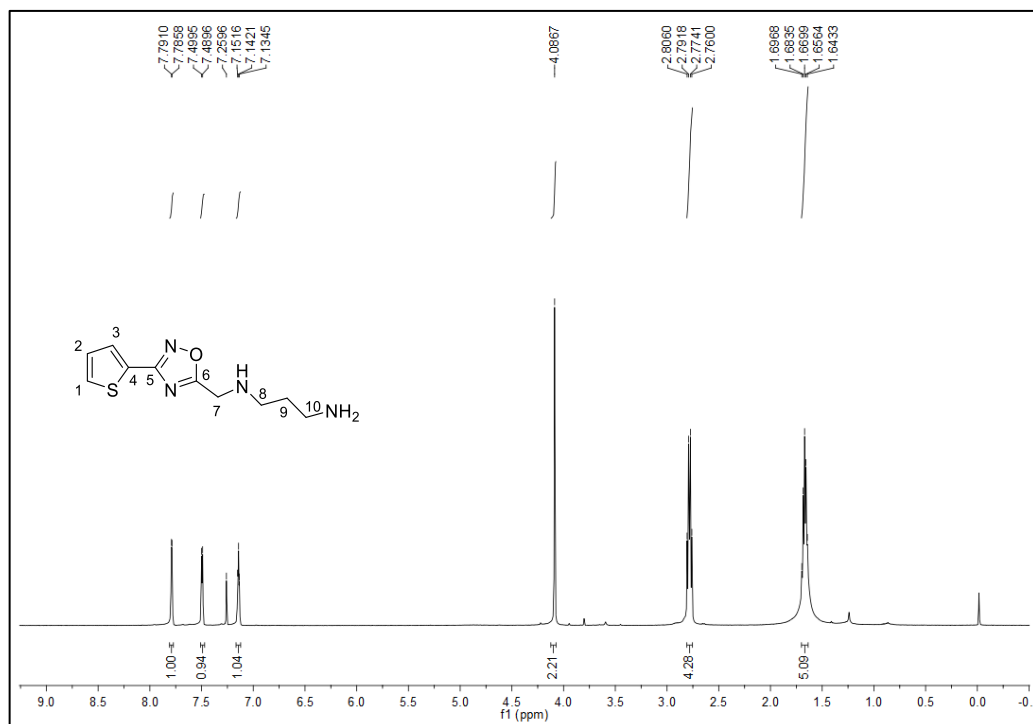
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) do composto (10)

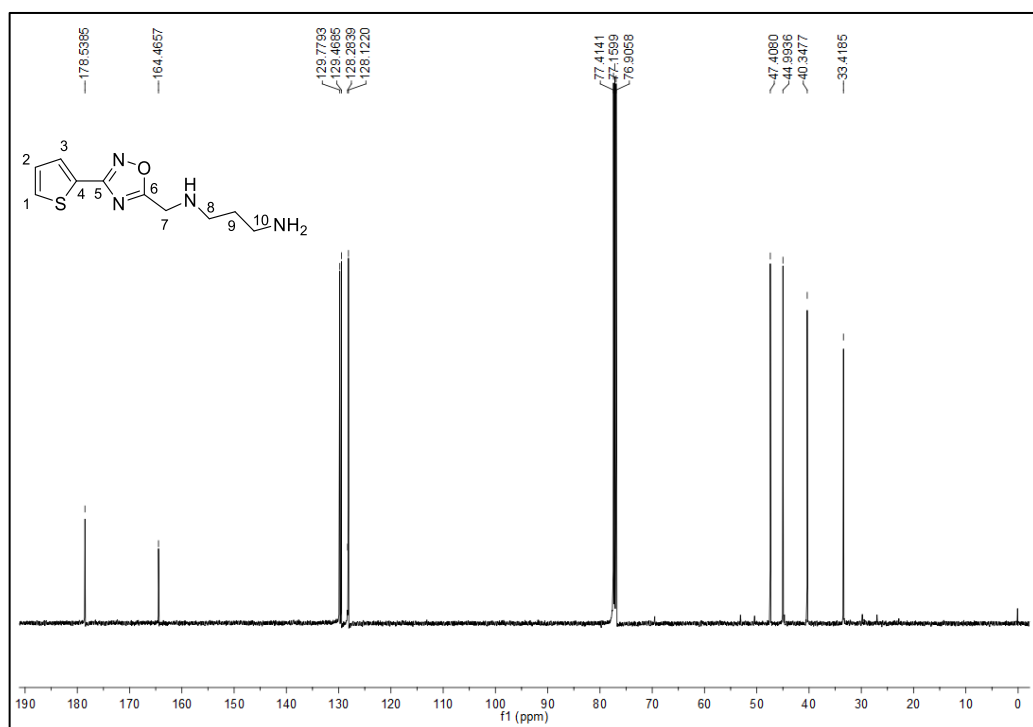
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (11).

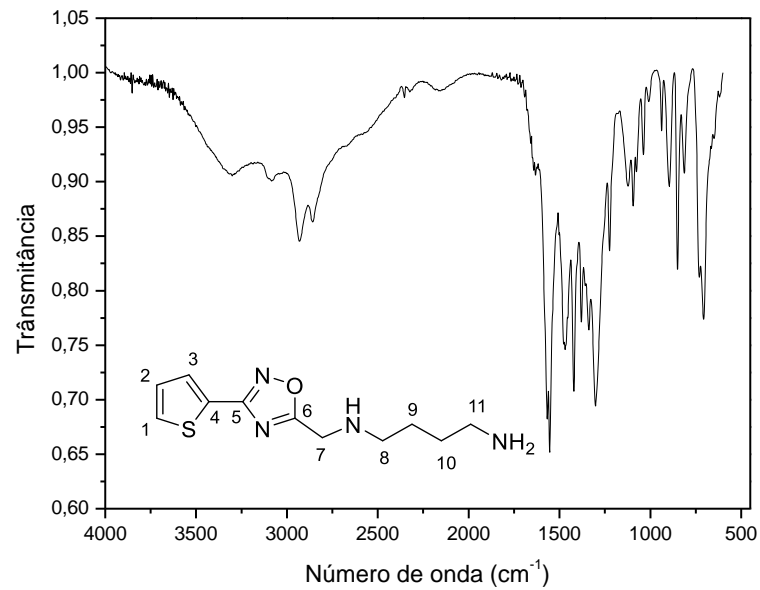
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do composto (**11**)

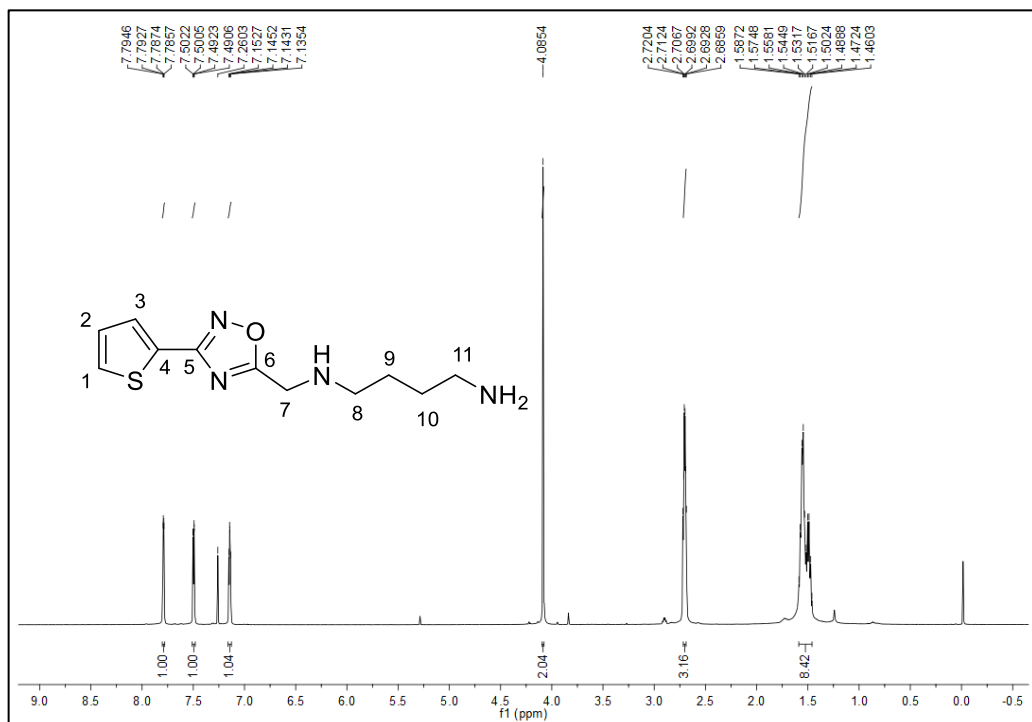
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) do composto (**11**)

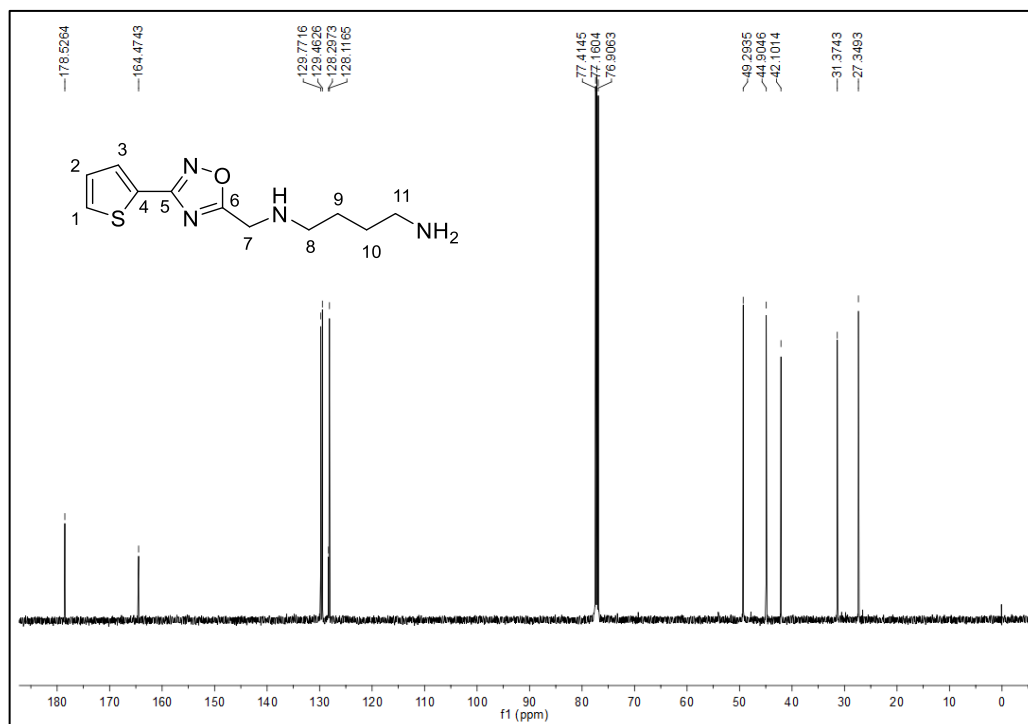
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (12).

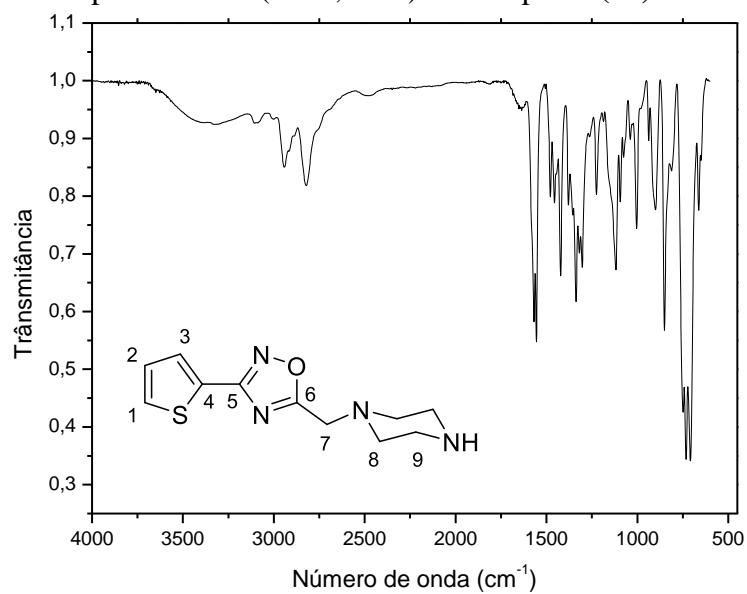
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do composto (12)

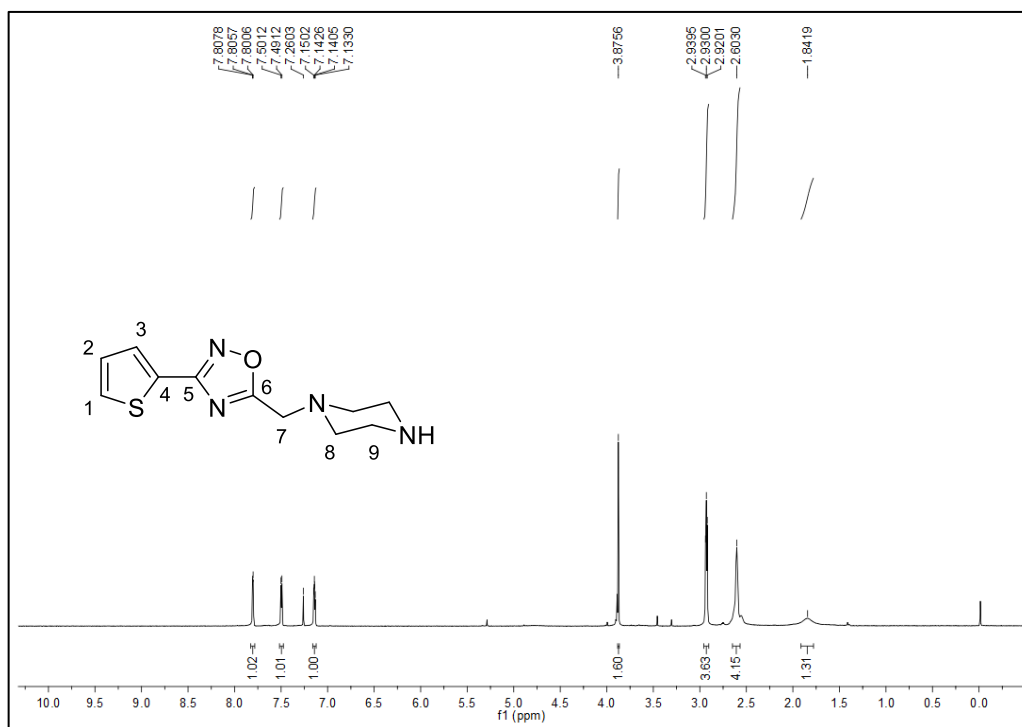
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) do composto (12)

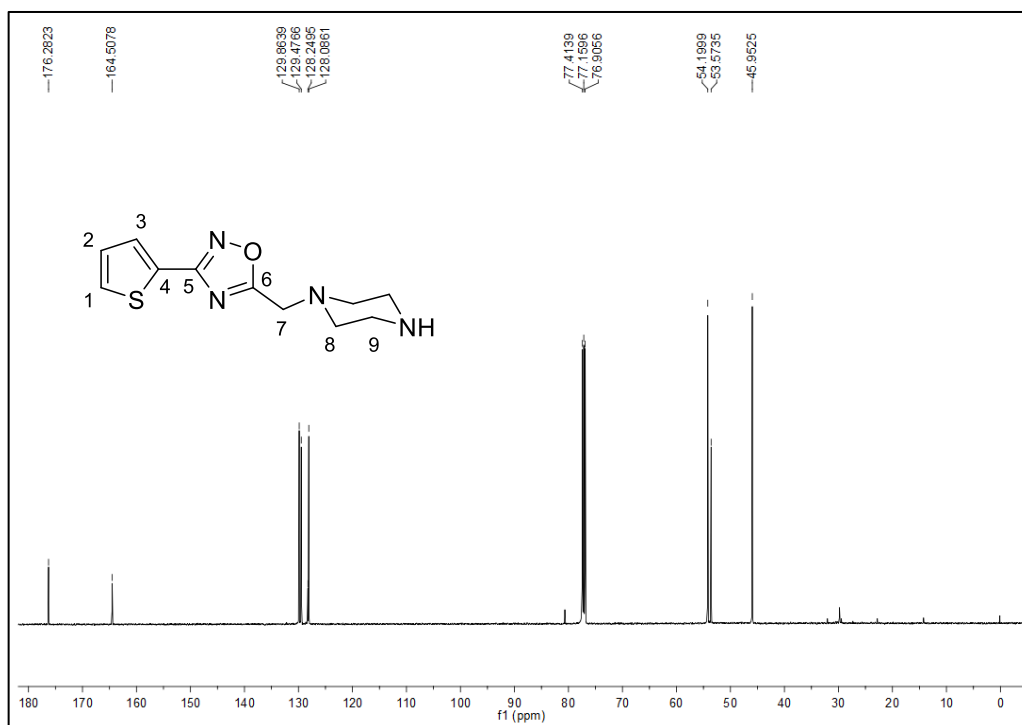
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (13).

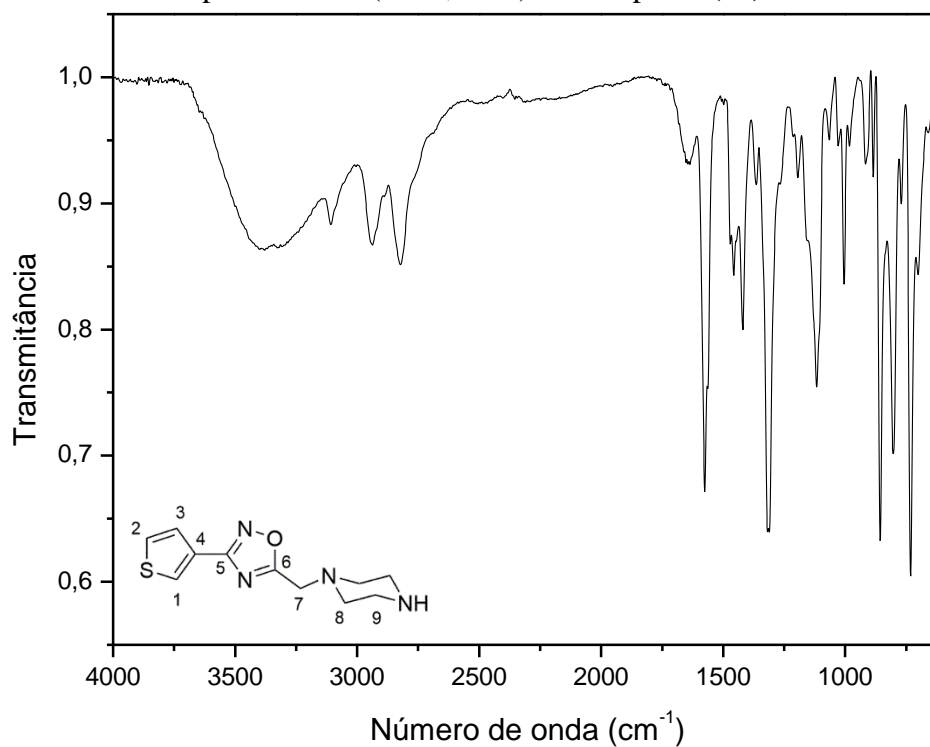
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do composto (**13**)

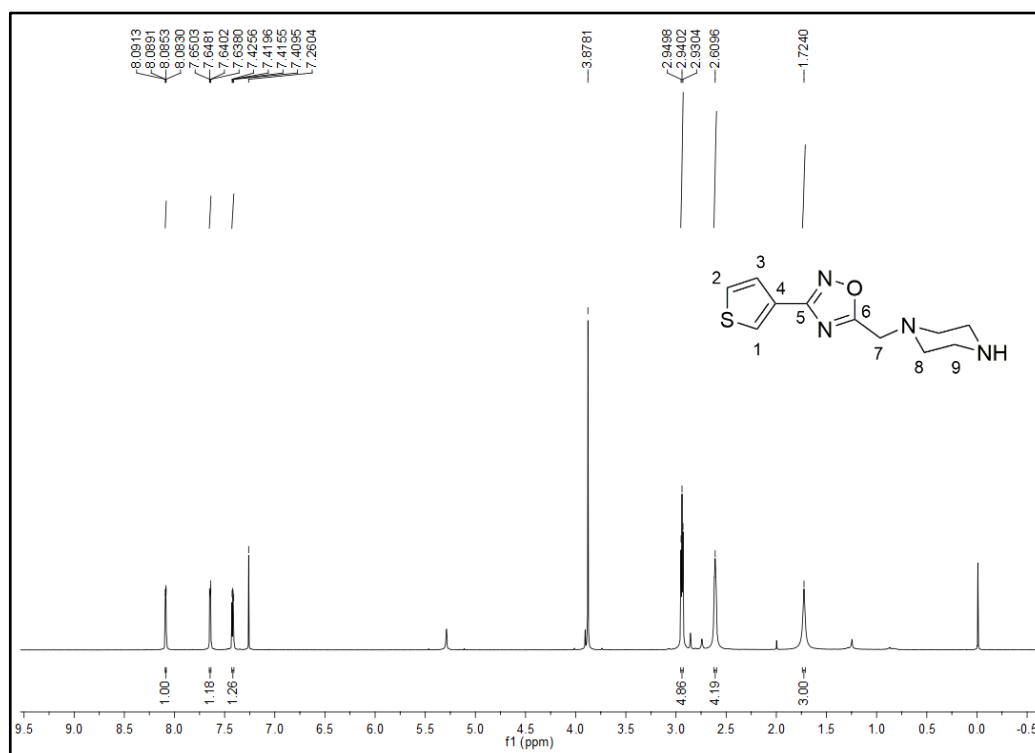
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) do composto (**13**)

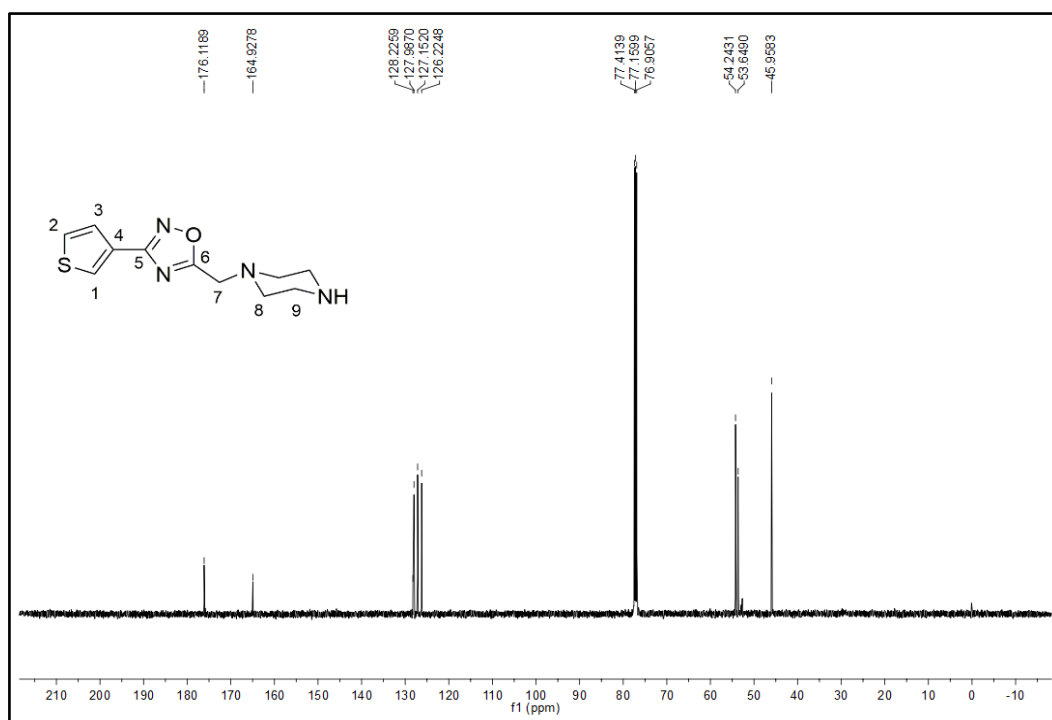
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (**14**).

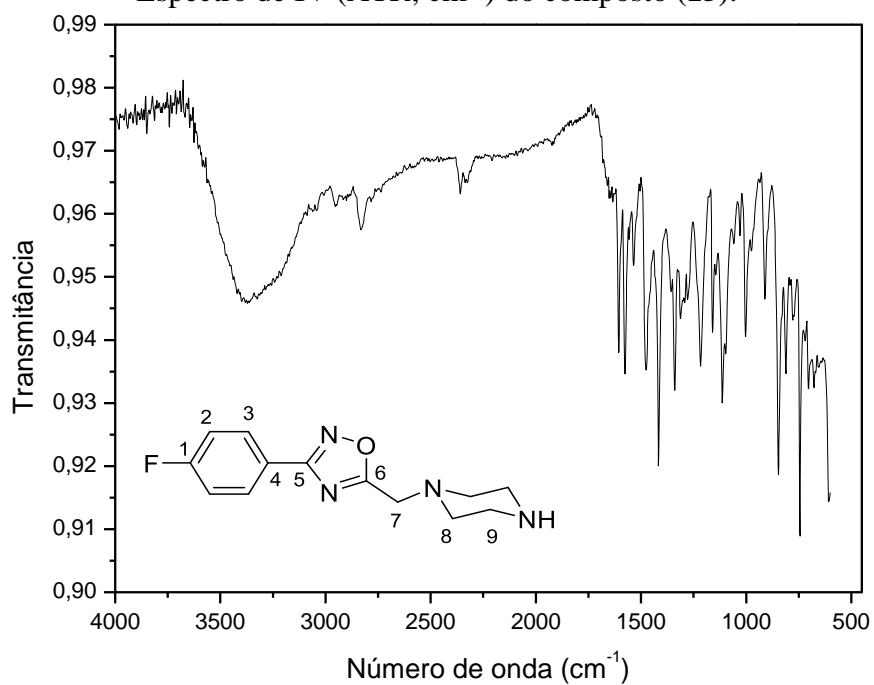
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do composto (**14**)

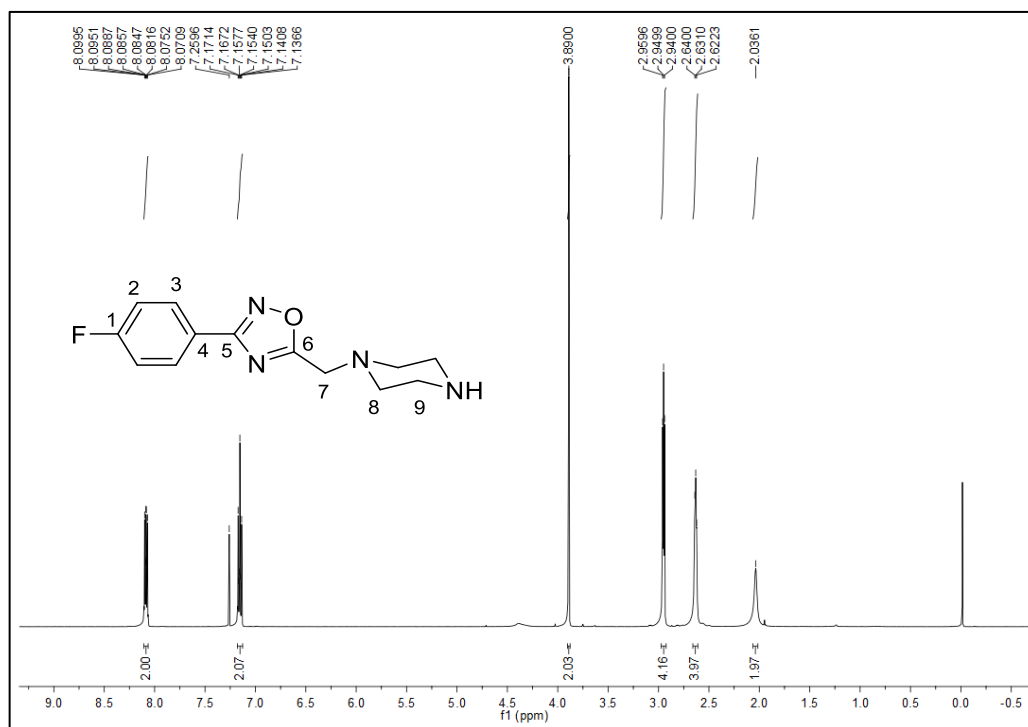
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) do composto (14)

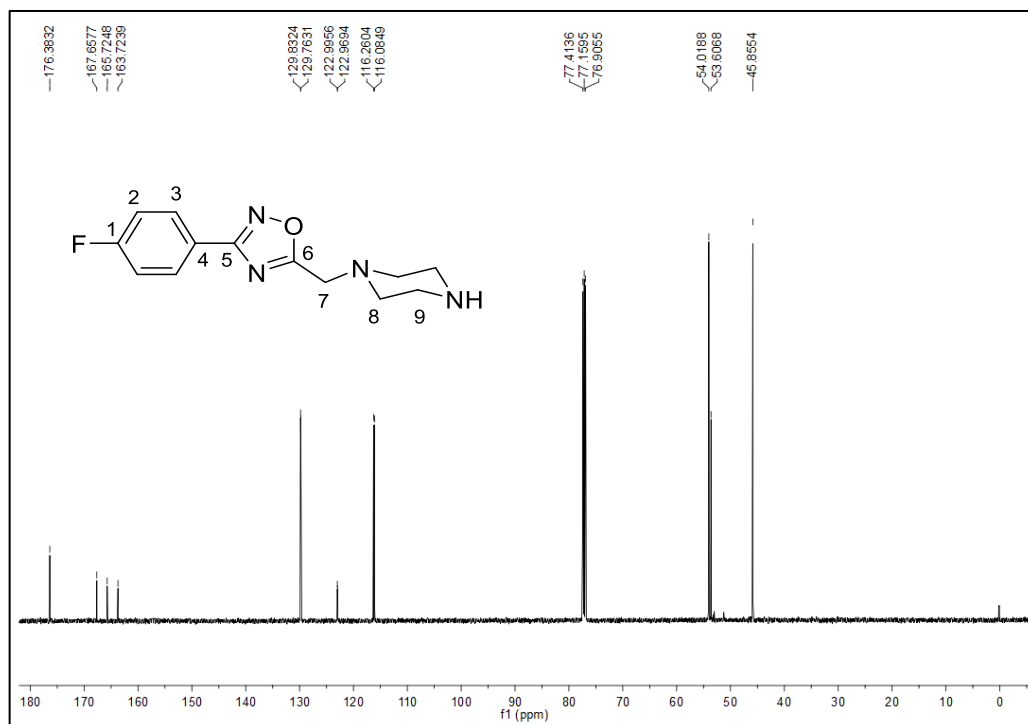
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (15).

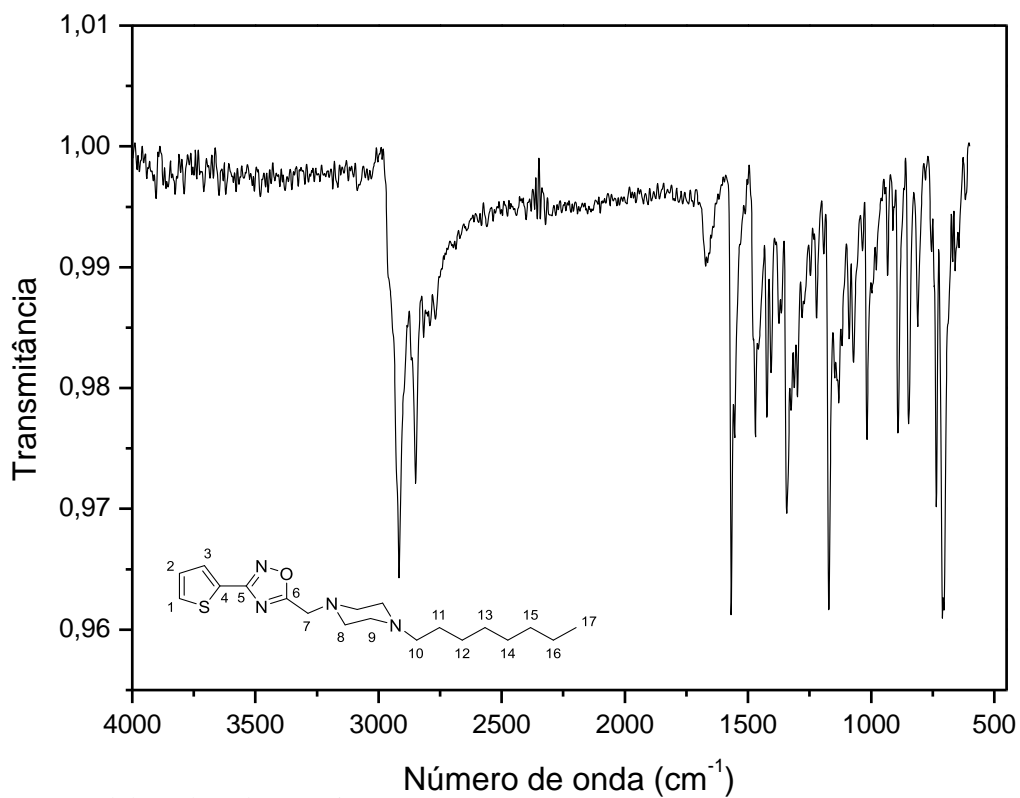
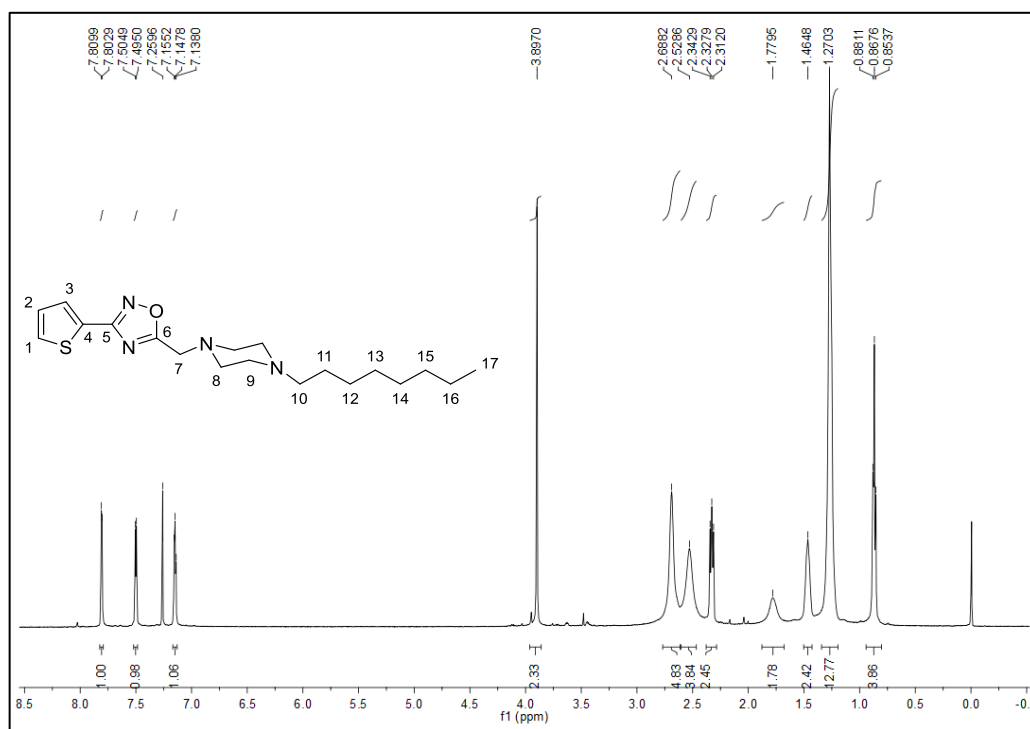
Fonte: Elaborada pela própria autora.

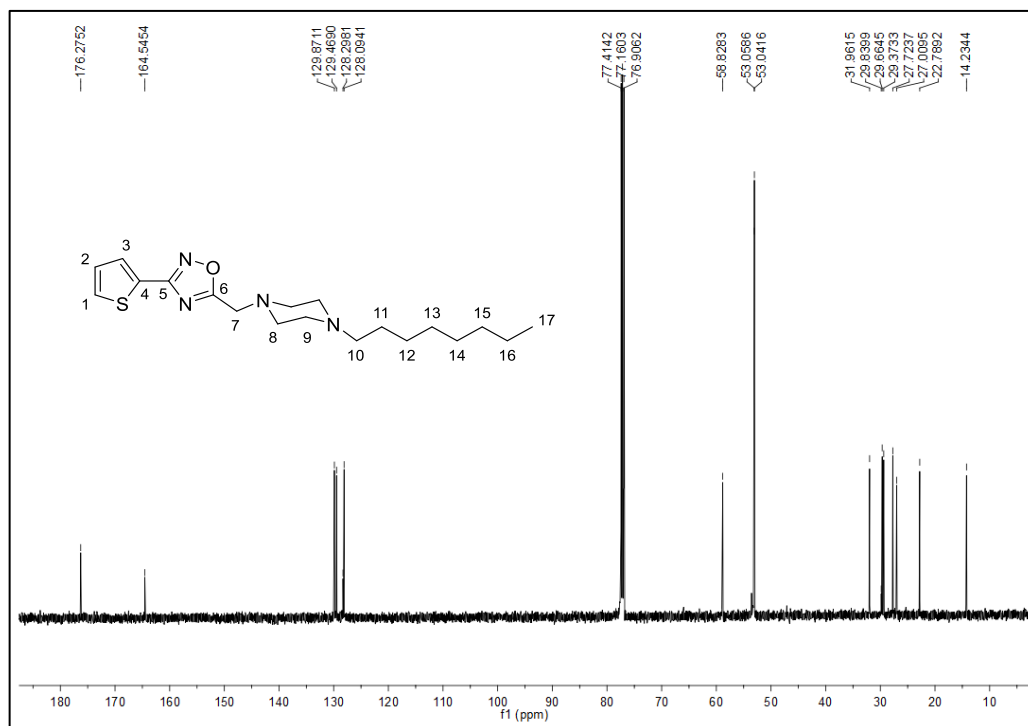
Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do composto (15)

Fonte: Elaborada pela própria autora.

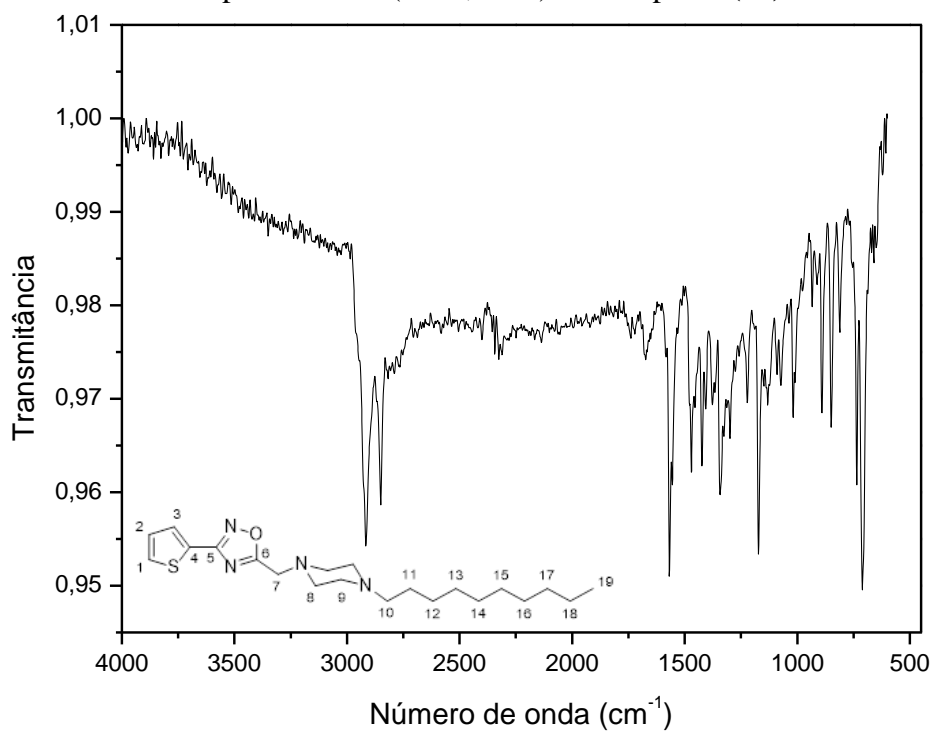
Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) do composto (15)

Fonte: Elaborada pela própria autora.

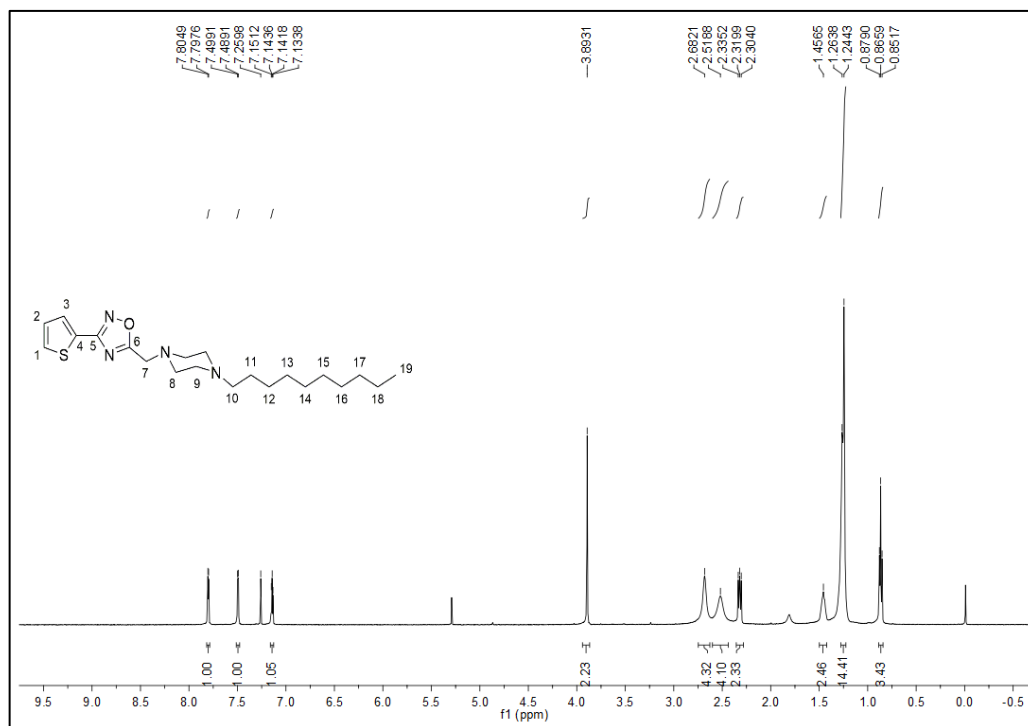
Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (16).Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do composto (16)

Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) do composto (16)

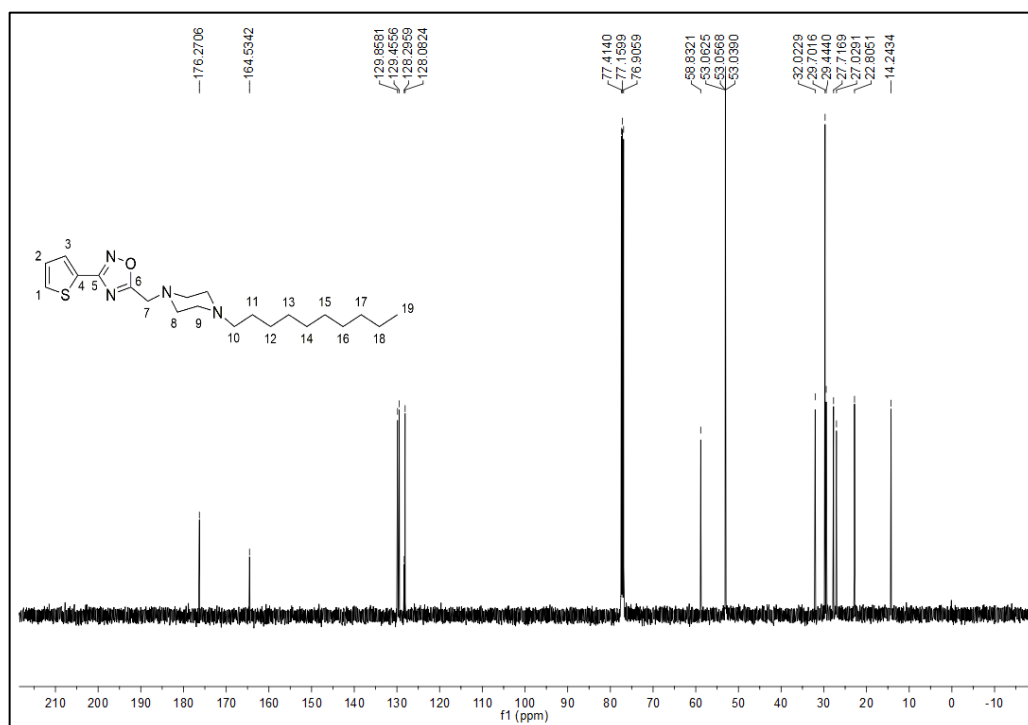
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (17).

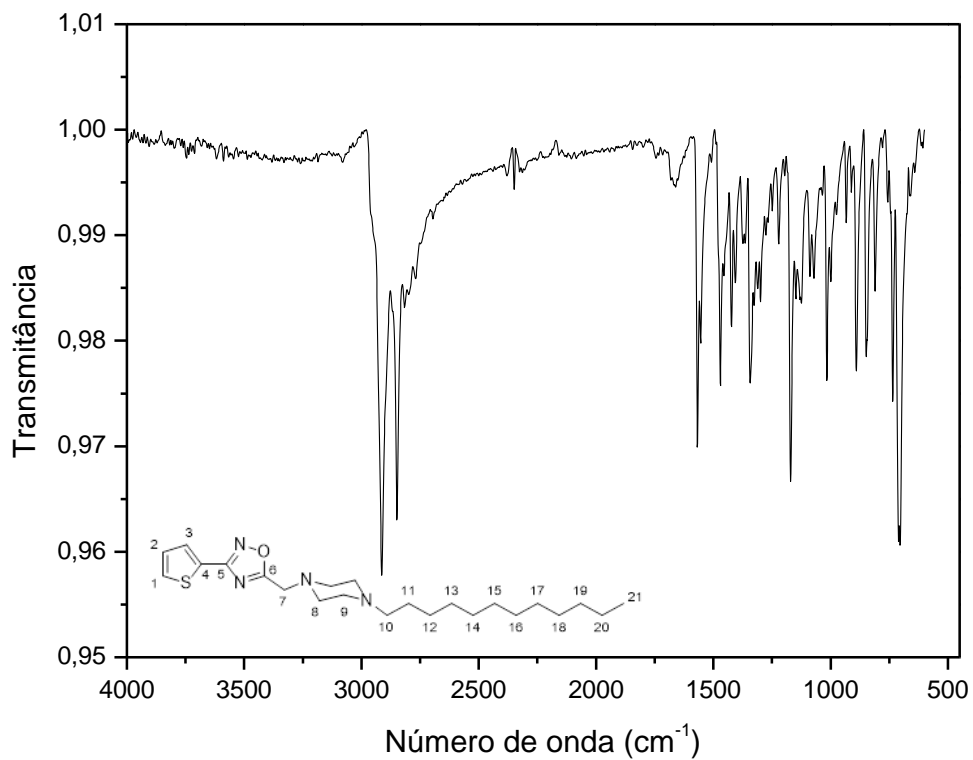
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do composto (17)

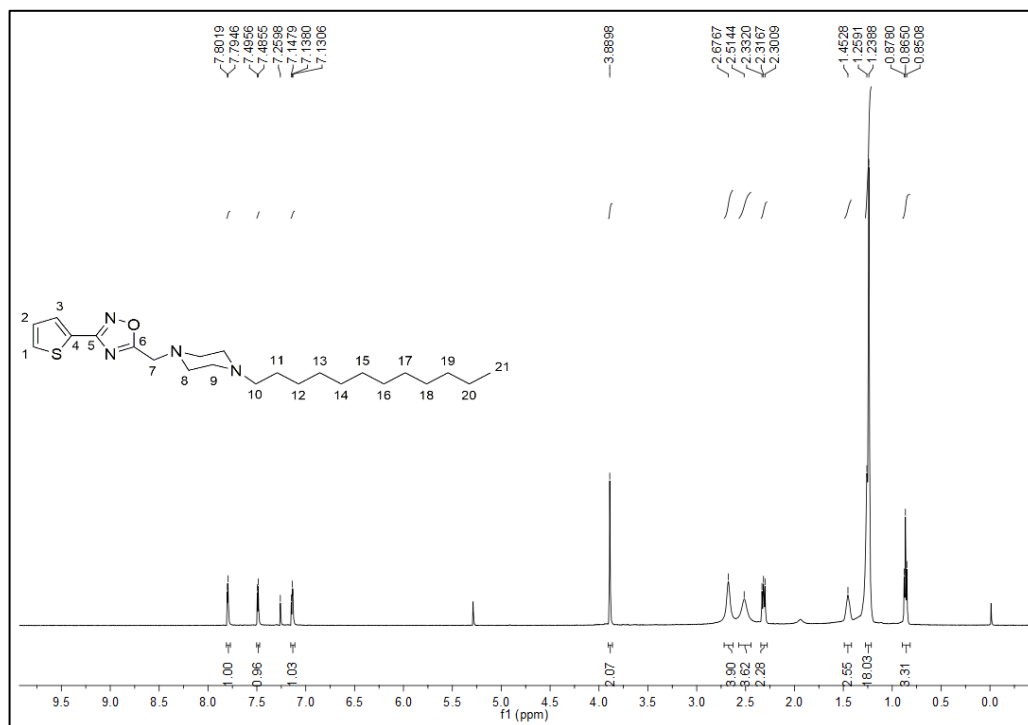
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) do composto (17)

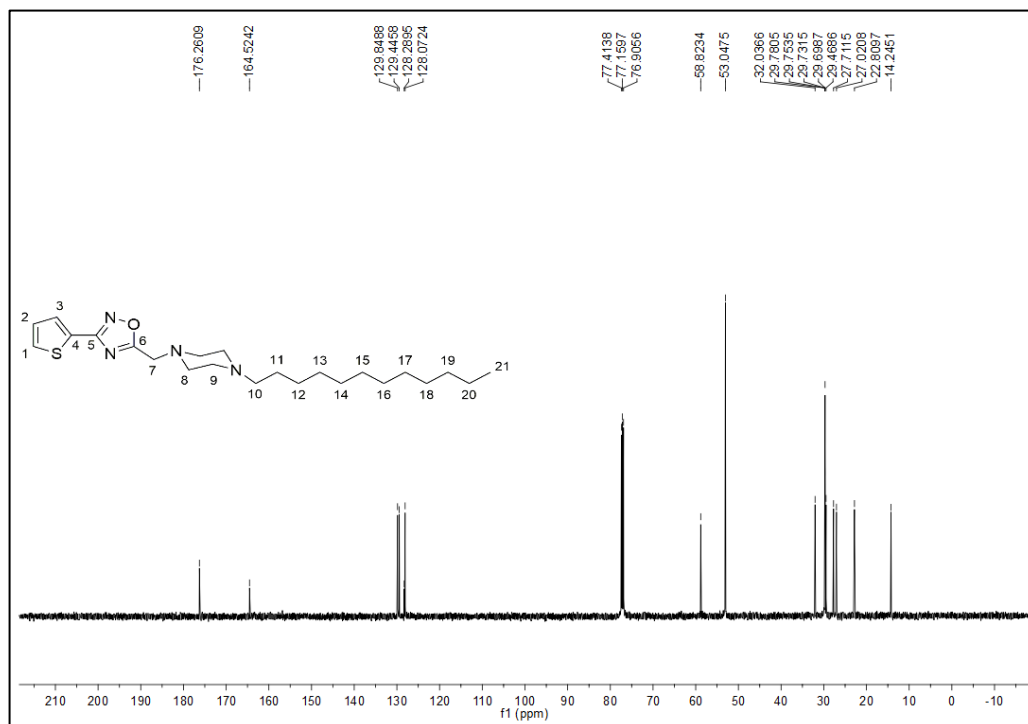
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (18).

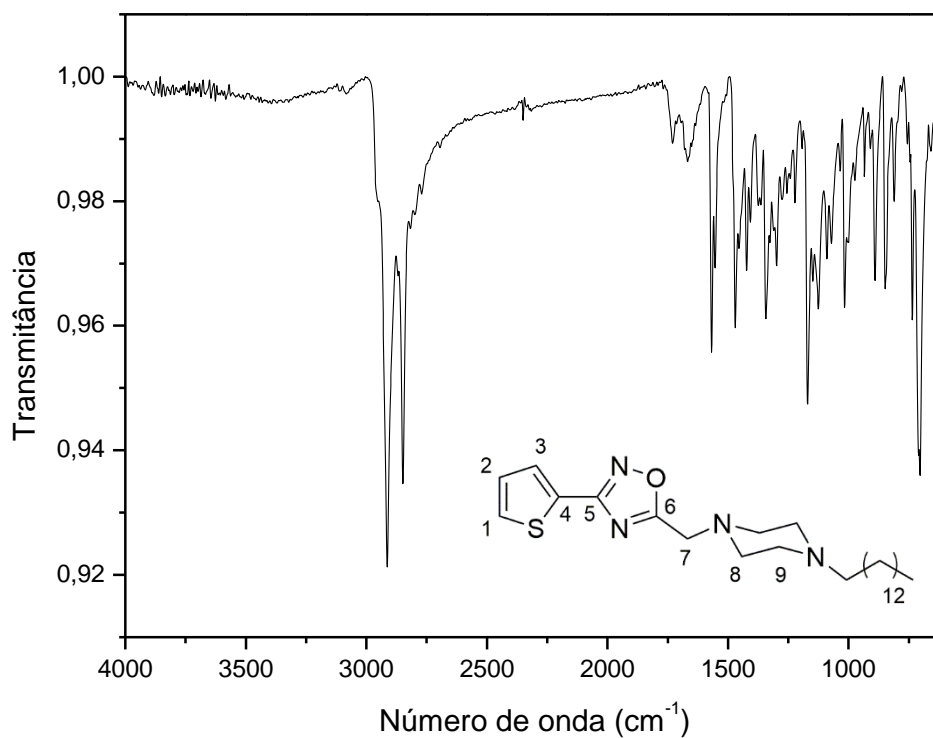
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do composto (18)

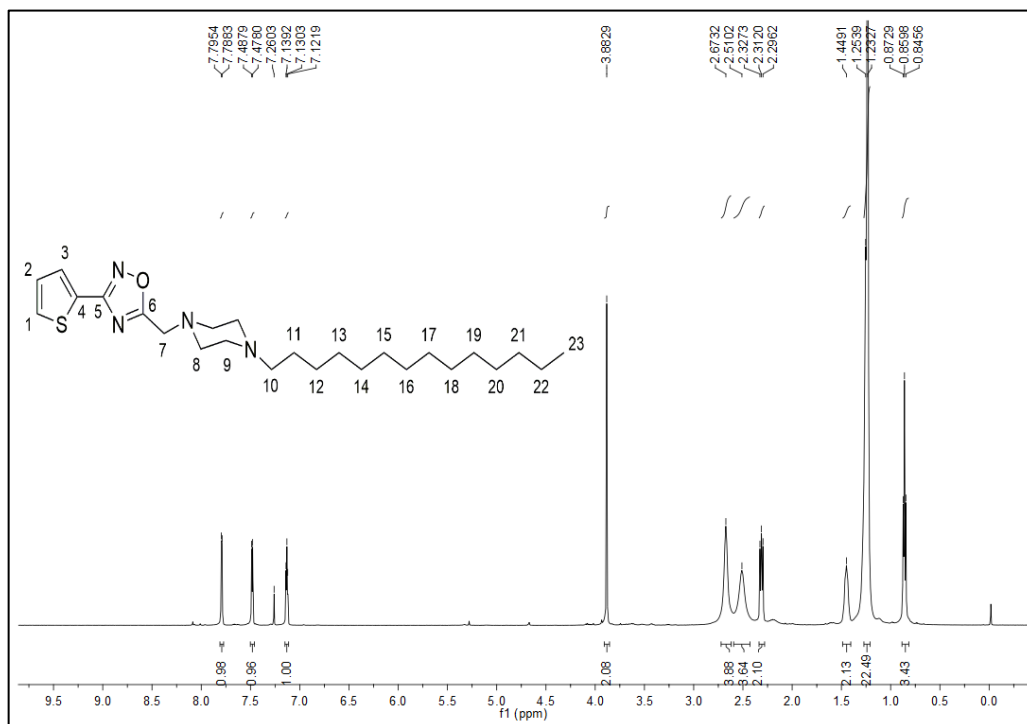
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) do composto (18)

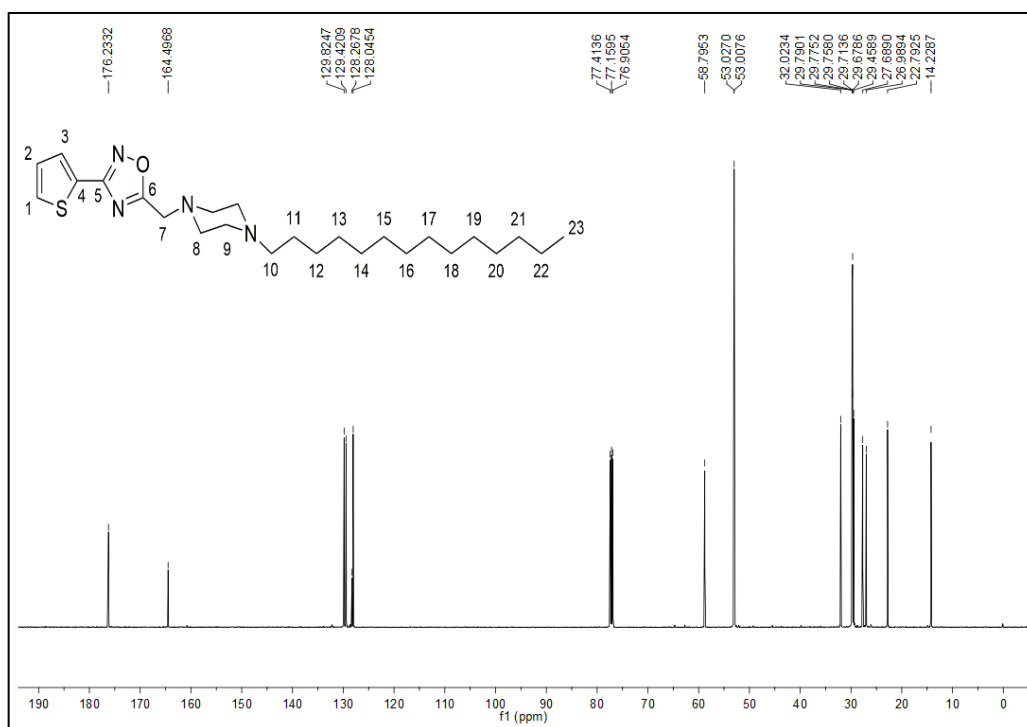
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (19).

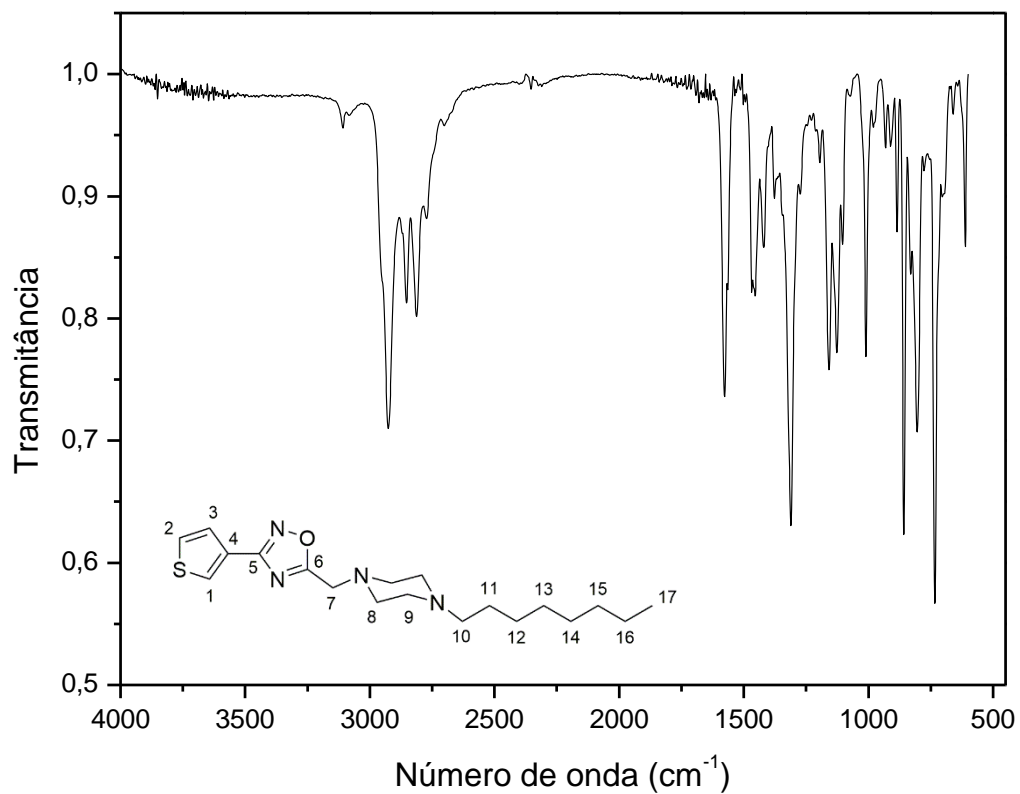
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do composto (19)

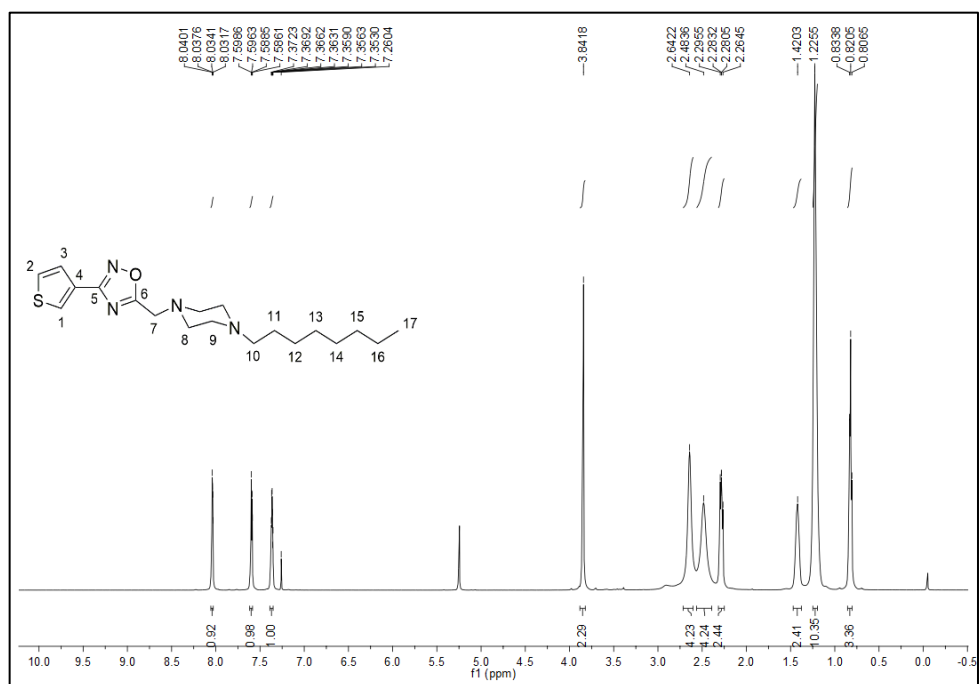
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) do composto (19)

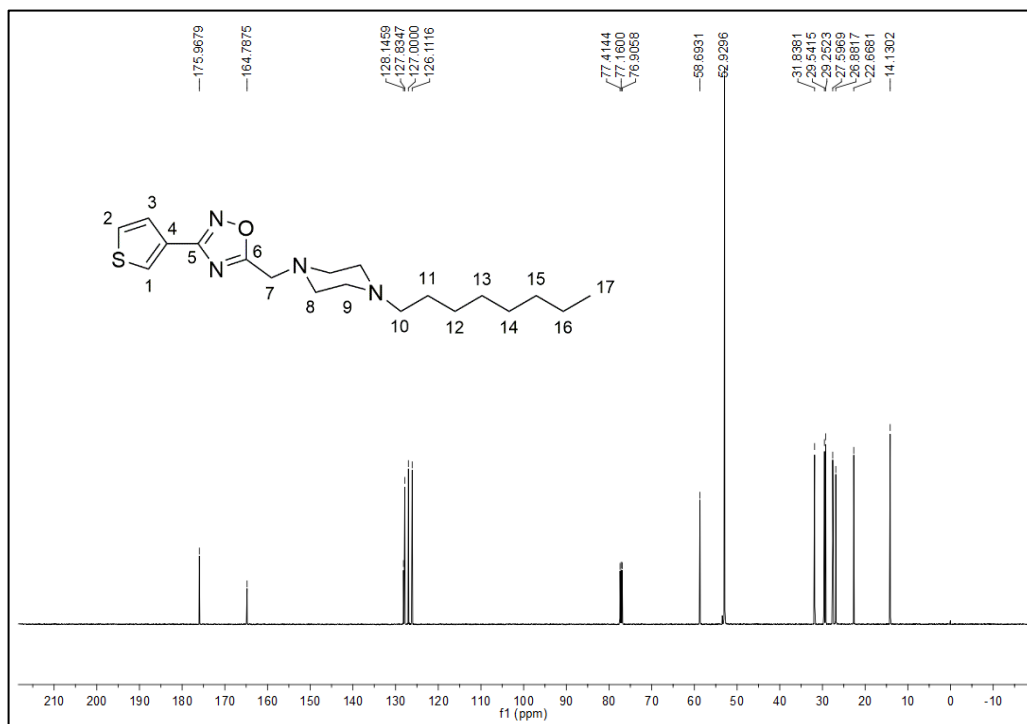
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (20).

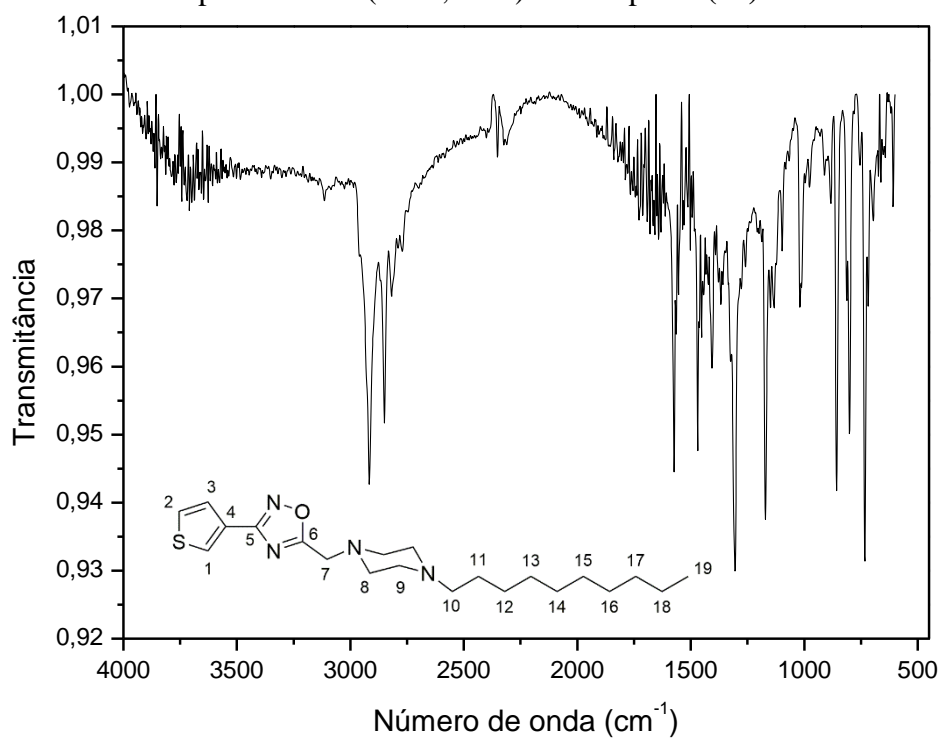
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do composto (20)

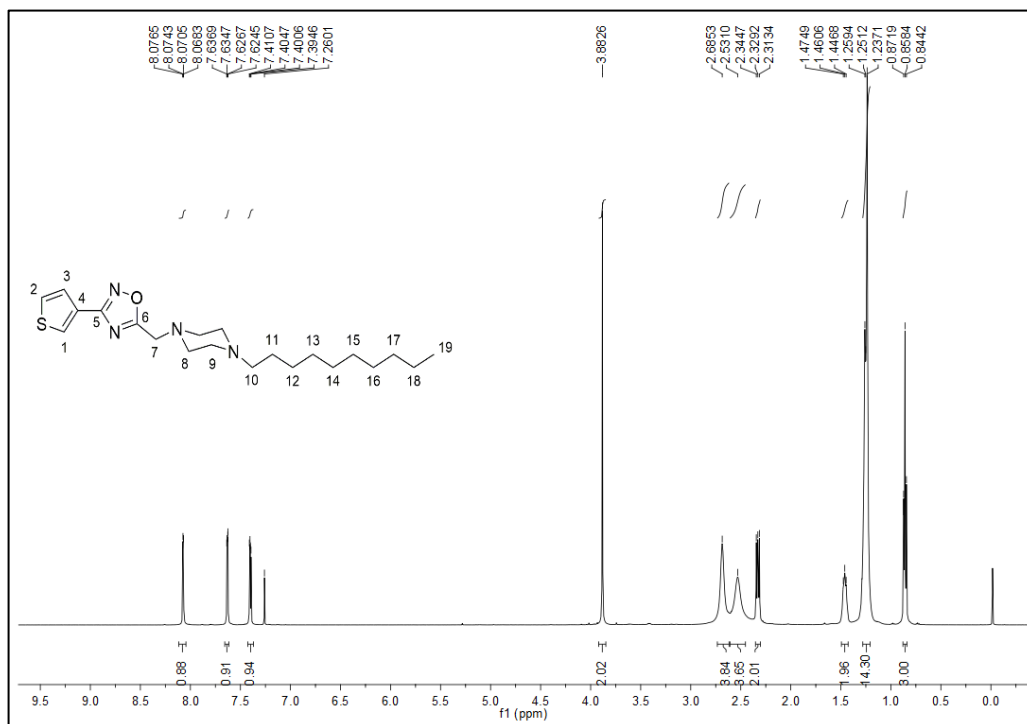
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) do composto (20)

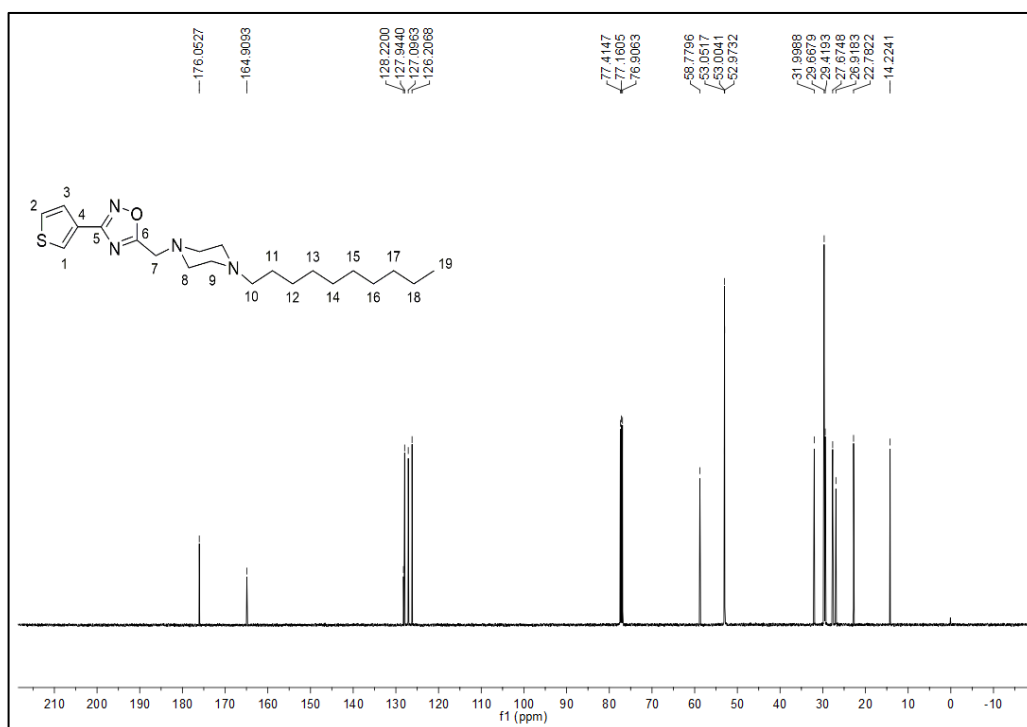
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (21).

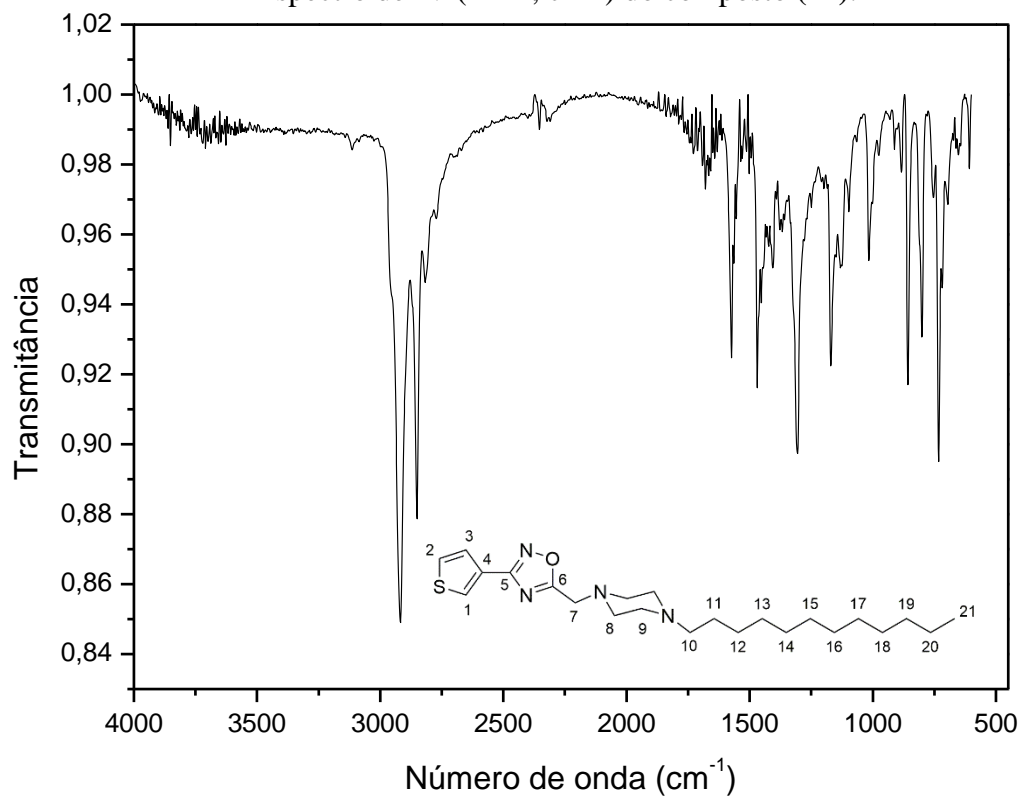
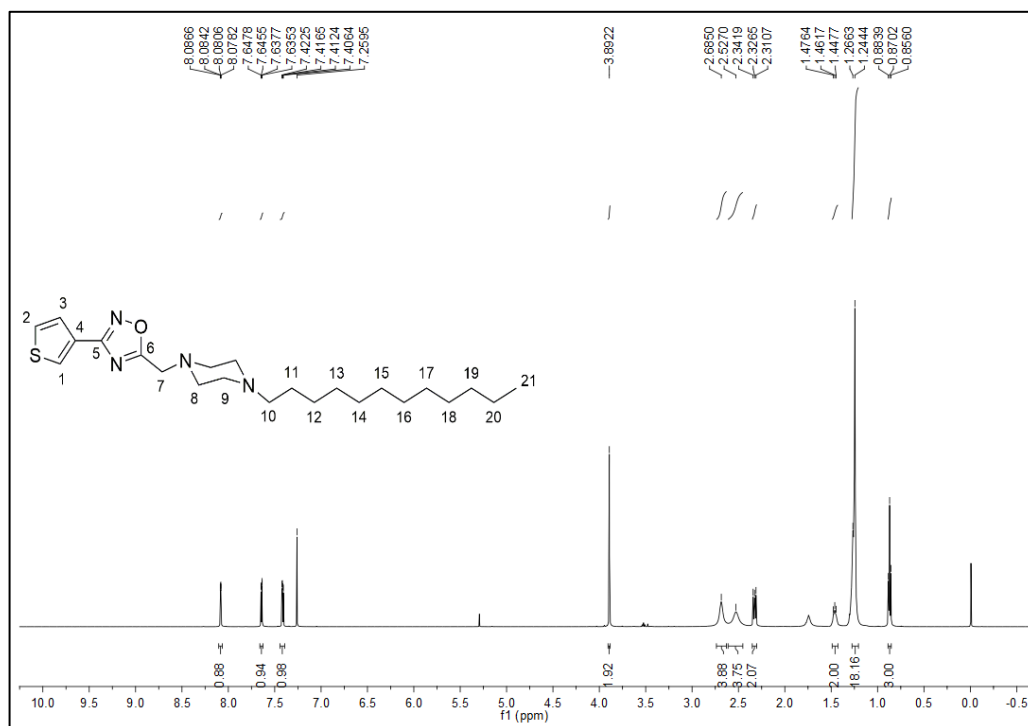
Fonte: Elaborada pela própria autora.

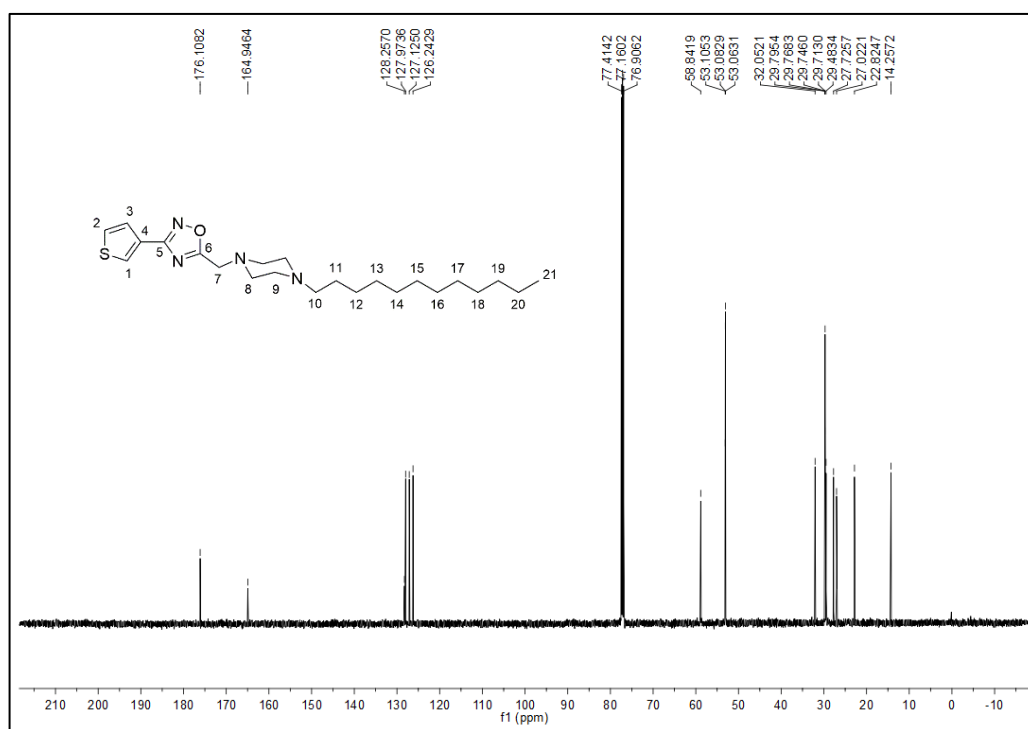
Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do composto (**21**)

Fonte: Elaborada pela própria autora.

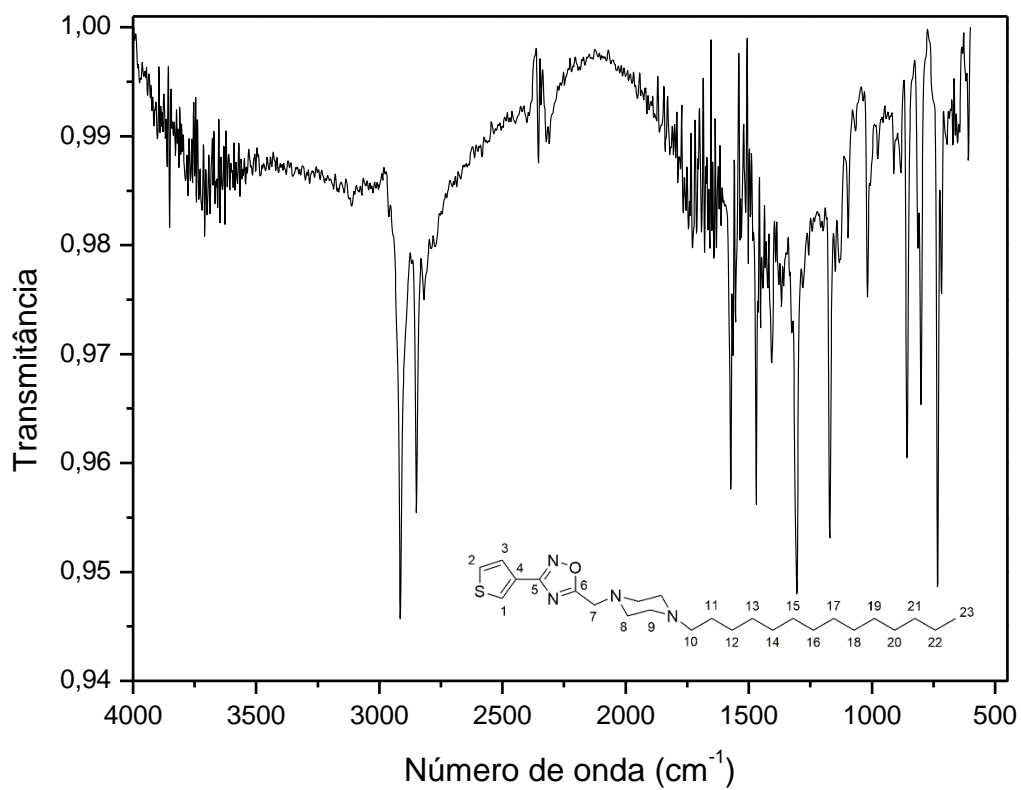
Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) do composto (**21**)

Fonte: Elaborada pela própria autora.

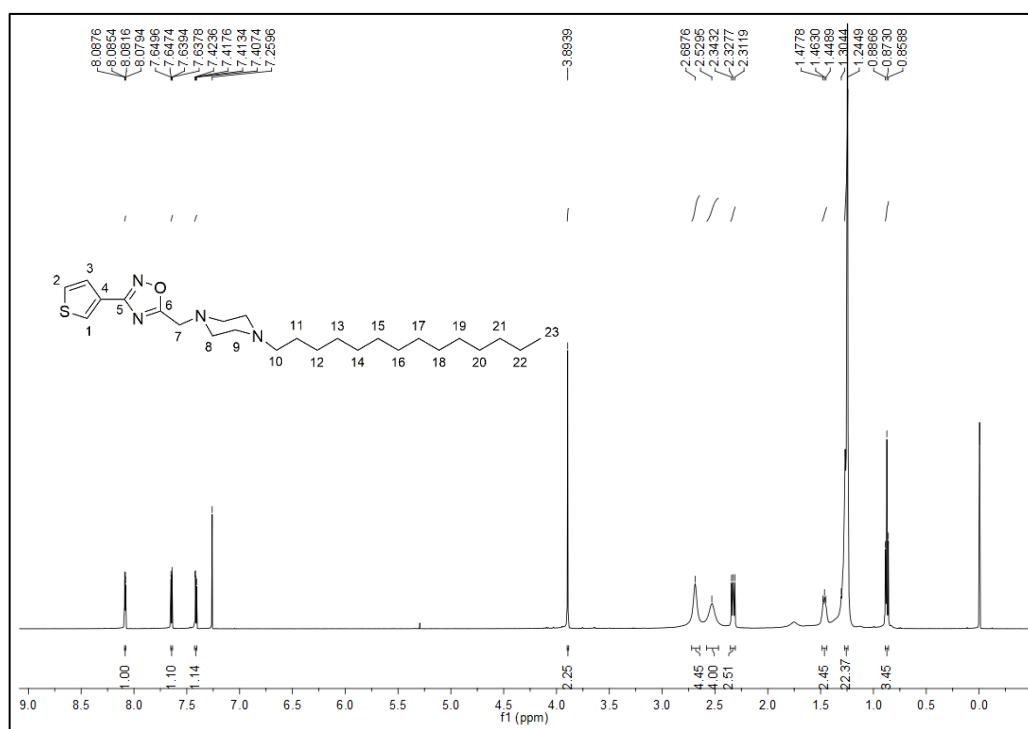
Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (**22**).Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do composto (**22**)

Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) do composto (**22**)

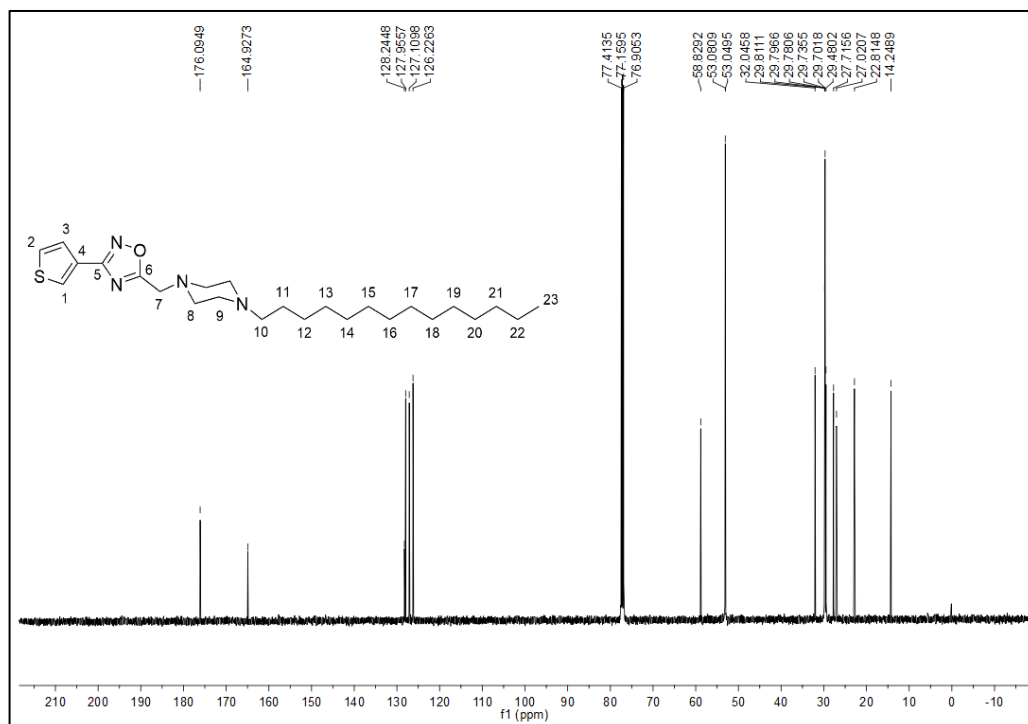
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (**23**).

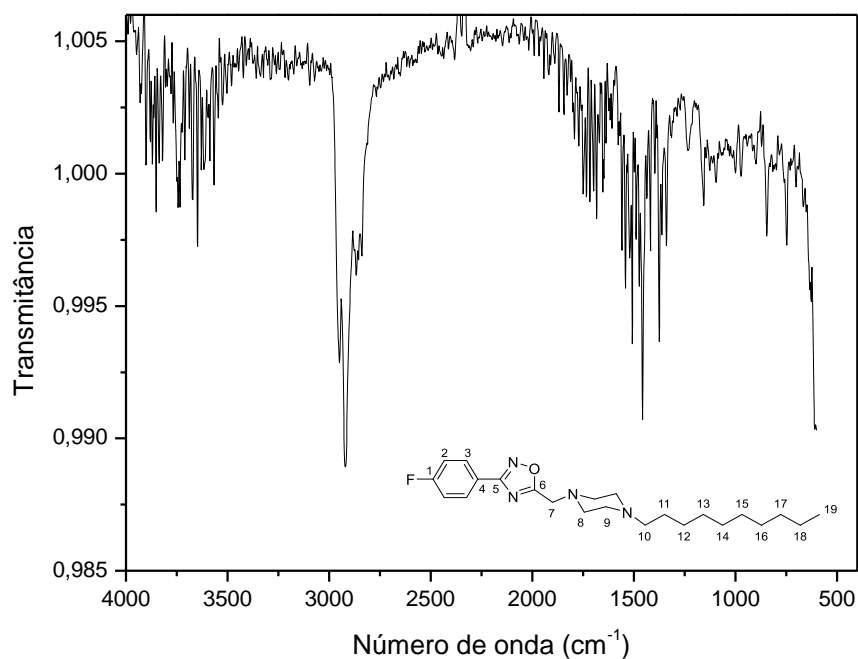
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do composto (**23**)

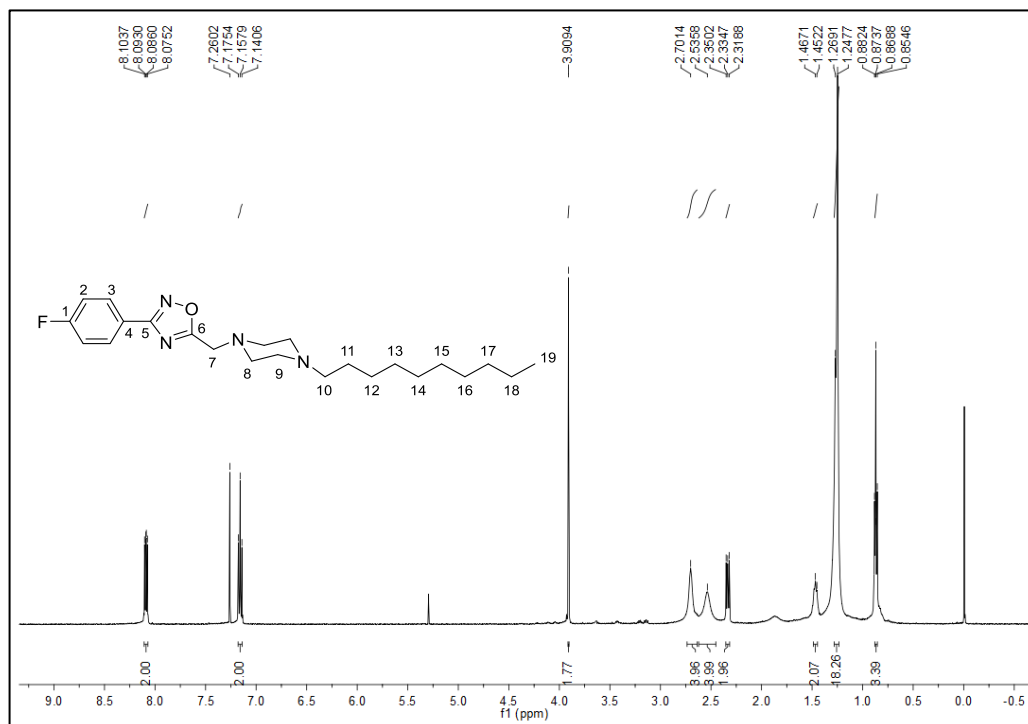
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) do composto (**23**)

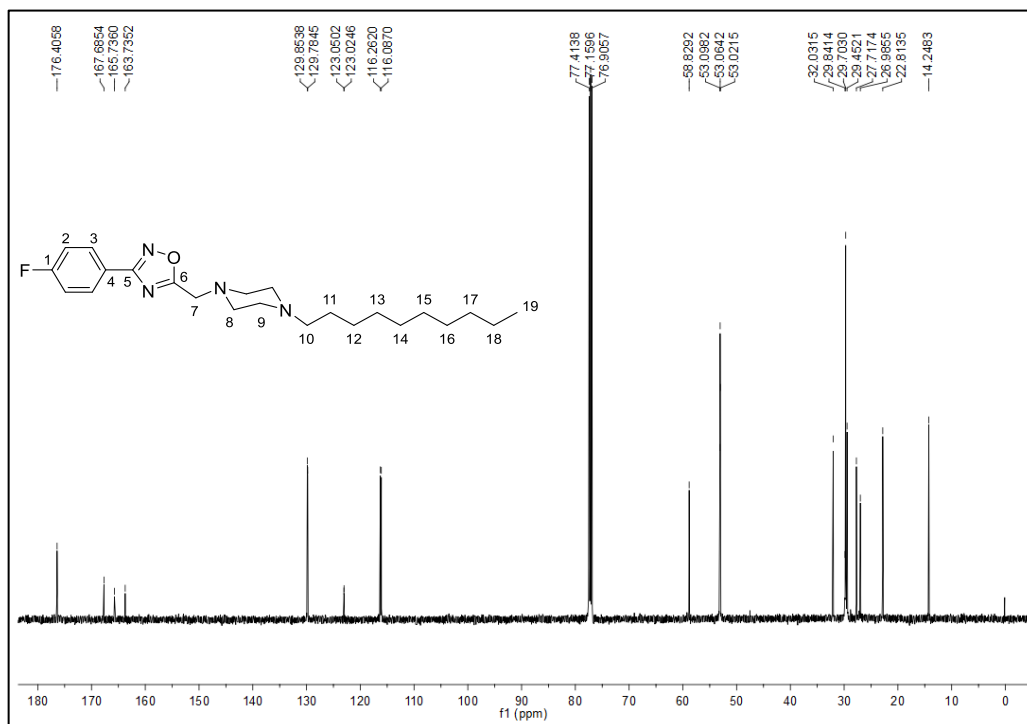
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (24).

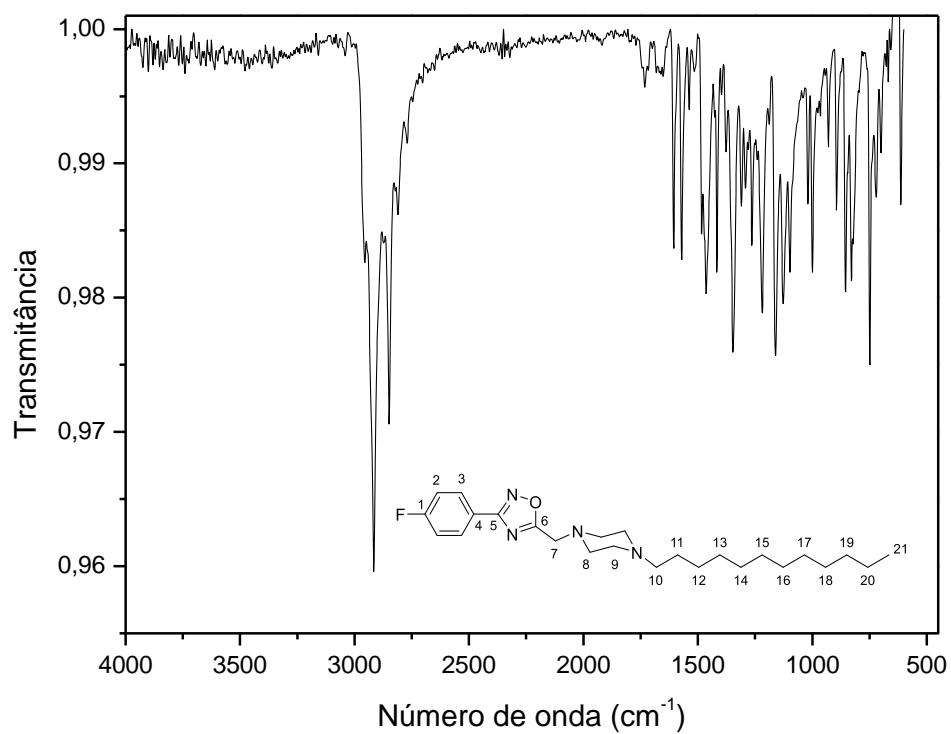
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do composto (24)

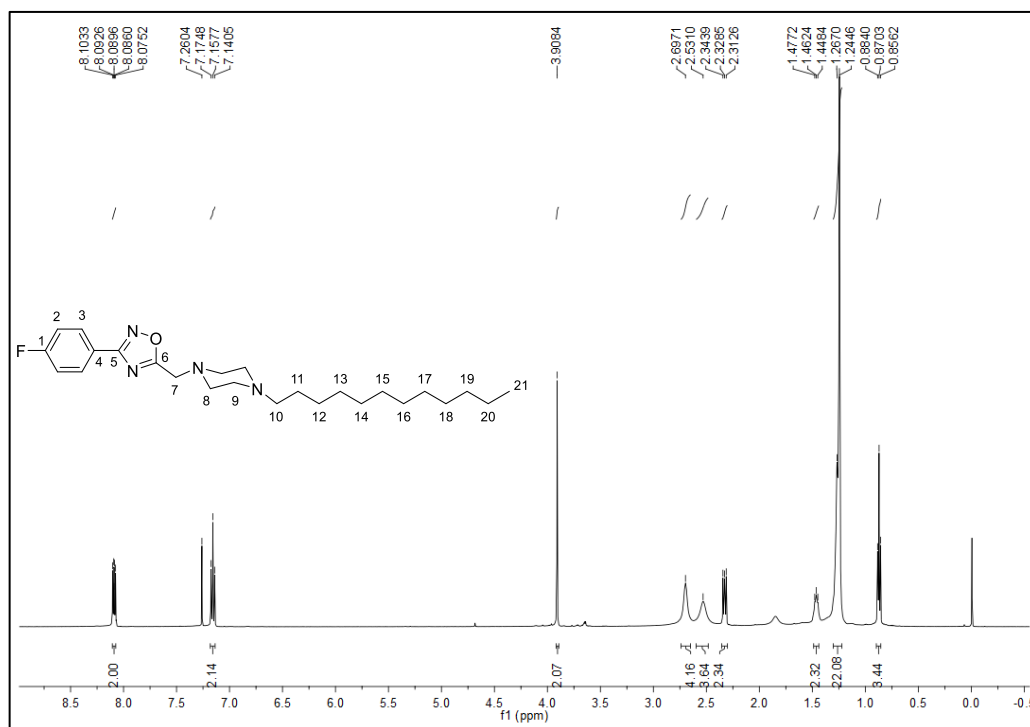
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) do composto (24)

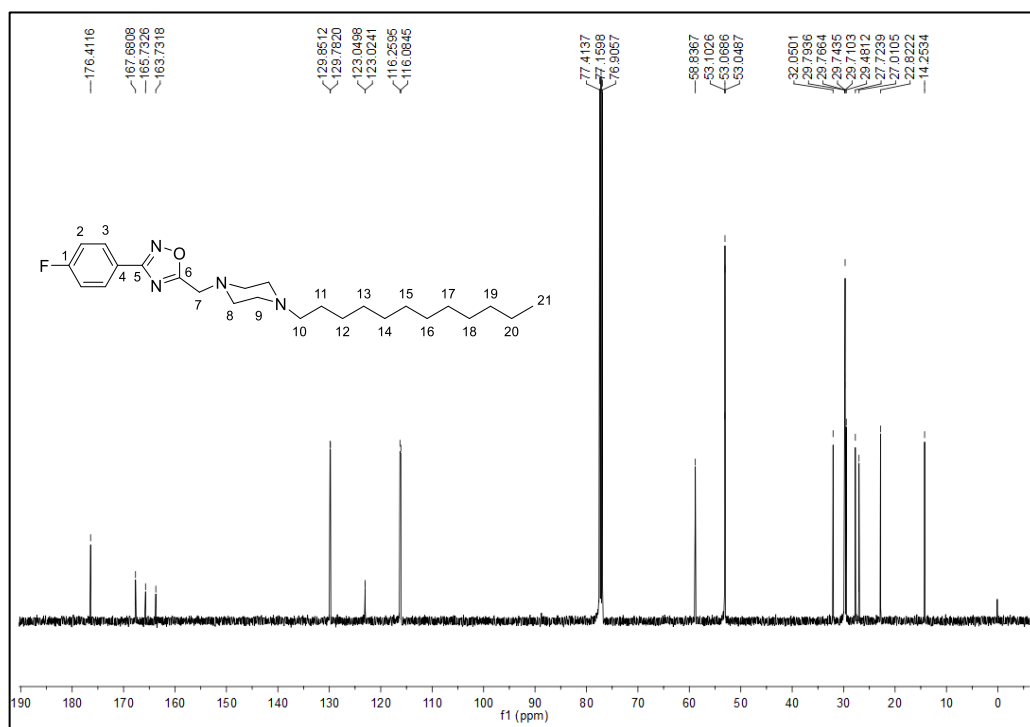
Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de IV (ATR; cm^{-1}) do composto (25).

Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do composto (**25**)

Fonte: Elaborada pela própria autora.

Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) do composto (**25**)

Fonte: Elaborada pela própria autora.