

# SÍNTESES E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE NOVAS 3-ARIL-1,2,4-OXADIAZOLINAS BICÍCLICAS

Eduarda Karynne Souza<sup>1</sup>; Antônio Rodolfo de Faria<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Farmácia - DCFar – UFPE; E-mail: eduarda\_ks@hotmail.com,

<sup>2</sup>Docente/pesquisador do Depto de Ciências Farmacêuticas – DCFar – UFPE. E-mail: rodolfo.ufpe@gmail.com.

**Sumário:** No presente trabalho foi realizada a síntese e aplicação biológica de 1,2,4-oxadiazolinas. As oxadiazolinas possuem diversas ações biológicas, tais como anticâncer; antioxidante; anti-inflamatória; antibacteriana e anti-HIV. Por essa razão fazem parte de uma classe de compostos orgânicos de crescente interesse na química medicinal, uma vez que essa ciência está voltada para a identificação, desenvolvimento e síntese de novas substâncias biologicamente ativas. A série foi obtida utilizando como metodologia a reação de cicloadição 1,3-dipolar, reação comumente empregada na obtenção de heterociclos de cinco membros. As moléculas obtidas foram caracterizadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H e infravermelho e, posteriormente, foram submetidas ao teste biológico para avaliação de sua atividade citotóxica frente a quatro linhagens de células tumorais humana, que mostrou resultados de pouca a alta atividade citotóxica, destacando-se o composto *p*-NO<sub>2</sub> substituído com percentual de inibição de crescimento celular de 90,0% frente à linhagem celular de leucemia promielocítica aguda.

**Palavras-chave:** atividade citotóxica; cicloadição 1-3 dipolar; oxadiazolinas

## INTRODUÇÃO

As oxadiazolinas são heterociclos correlatos de uma classe de substâncias químicas alvo de grande estudo na química medicinal, os oxadiazóis e embora sejam menos frequentes que seus análogos totalmente oxidados, vários compostos oxadiazolínicos são descritos na literatura sendo relatadas diferentes atividades farmacológicas como anticâncer; antioxidante; anti-inflamatória; antibacteriana e anti-HIV, o que contribui para o crescente interesse na exploração química e farmacológica desse núcleo<sup>1</sup>. Em estudo recente Mendes descreveu a obtenção do inédito heterobíclio, pirrolidina[1,2-d]1,2,4-oxadiazolina, contendo a função hidrazona, que apresentou pronunciada atividade antinociceptiva, assim como antimicrobiana<sup>2</sup>. A partir desses dados, esse trabalho teve como objetivo a obtenção da série de compostos contendo o núcleo pirrolidina[1,2-d]1,2,4-oxadiazolina arilados na posição C3 e da realização de testes preliminares da atividade citotóxica dos mesmos. A necessidade do desenvolvimento de novos fármacos com atividade anticâncer se dá pelo fato do câncer ser um problema de saúde pública no mundo e do principal tratamento que são os agentes quimioterápicos apresentarem geralmente efeitos secundários indesejáveis, além de ser limitado o número de opções. A descoberta de novas drogas anticâncer, mais seguras e eficazes se faz necessária para atender a demanda terapêutica e são muitos os estudos que exploram compostos contendo heterociclos de cinco membros contendo átomos de nitrogênio e oxigênio<sup>3</sup>.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A síntese do biciclo oxadiazolina, foi realizada a partir da pirrolidina e benzaldeídos comerciais. A metodologia utilizada foi a reação de cicloadição 1,3-dipolar (Figura 1). A rota sintética empregada tem a pirrolidina comercial **01** como material de partida para

obtenção do trímero da  $\Delta^1$ -pirrolina **03**. Através da oxidação catalítica da pirrolidina pelo persulfato de sódio, em meio básico, forma-se o monômero **02**, que trimeriza no meio reacional, formando o respectivo trímero. Paralelamente realizou-se a síntese para obtenção dos cloretos de hidroxiiminoíla **06**, utilizando-se inicialmente benzaldeídos comerciais *p*-substituídos **04** para síntese das oximas **05** via ultrassom. As oximas, por sua vez, foram cloradas com *N*-clorossuccinimida (NCS) resultando nos cloretos de hidroxiiminoíla **06**. Na sequência os cicloadutos **08** foram formados através da reação de cicloadição 1,3-dipolar via ultrassom entre a  $\Delta^1$ -pirrolina **02** os *N*-óxidos de nitrila **07**, ambos formados *in situ* a partir do trímero e dos cloretos de hidroxiiminoíla, respectivamente. Os produtos obtidos tiveram sua estrutura elucidada por espectroscopia de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  e infravermelho.

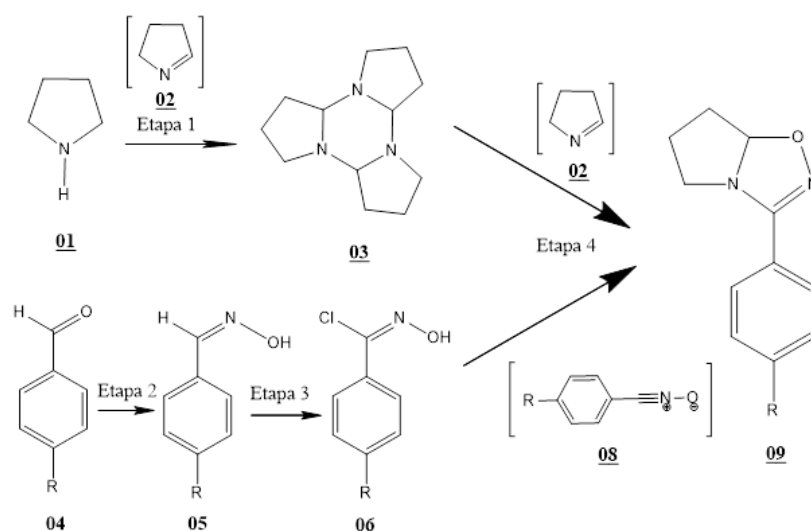


Figura 1- Rota sintética para obtenção das oxadiazolinas

A avaliação da atividade citotóxica dos compostos sintetizados foi realizada através do método do MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio. Foram utilizadas as linhagens de células tumorais humanas HEP-2 (carcinoma de laringe humana) e HT-29 (adenocarcinoma de colón humano) mantidas em meio de cultura DMEM, HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e MCF-7 (câncer de mama humano) mantidas em meio de cultura RPMI. Os meios foram suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO<sub>2</sub>. As células MCF-7, HEP-2 e HT-29 (10<sup>5</sup> células/mL) e HL-60 (0,3 x 10<sup>6</sup> células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24h. Em seguida as amostras dissolvidas em DMSO (1%) foram adicionadas aos poços em concentração final de 25 µg/mL. Após 72 h de reincubação foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL) e depois de 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foram aspirados e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm. Os experimentos foram realizados em quadruplicata e a percentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPad Prism 5.0*. Foi utilizado como padrão o fármaco doxorrubicina (5 µg/mL).

## RESULTADOS

Foram obtidas quatro oxadiazolinas *p*-substituídas (*p*-Cl, *p*-F, *p*-NO<sub>2</sub> e *p*-*t*-butil) com rendimentos de intermediários a bons e as moléculas tiveram sua estrutura comprovada por espectroscopia de IV (ν cm<sup>-1</sup>, KBr), RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Estão expressos na tabela 1 os dados físico-químico das moléculas sintetizadas:

Tabela 1- Dados físico-químicos das oxadiazolinas bicíclicas **9**

Produto	R <sub>f</sub> (AcOEt/ Hex. 20%)	P. F. (°C)	Rendimento (%)
<i>p</i> -Cl	0,316	73-76	69%
<i>p</i> -F	0,265	Líq. à t.a.	40%
<i>p</i> -NO <sub>2</sub>	0,163	132-134	64%
<i>p-t</i> -butil	0,347	70-73	59%

Fonte: Elaborado pelo autor

Foram submetidas ao teste de citotoxicidade os compostos *p*-Cl, *p*-F e *p*-NO<sub>2</sub> substituídos. A oxadiazolina *p-t*-butil embora tenha sido sintetizada e caracterizada pelas análises espectrométricas não foi submetida ao teste biológico, pois verificou-se a degradação do composto na cromatografia de camada delgada, onde algumas outras bandas surgiram na placa. As amostras foram testadas na concentração de 25 µg/mL e apresentaram percentual de inibição celular conforme a tabela abaixo:

Tabela 2 – Percentual de inibição de crescimento celular das oxadiazolinas

Produtos teste	% de inibição							
	HEP-2	Desvio Padrão	MCF-7	Desvio Padrão	HL-60	Desvio Padrão	HT-29	
oxadiazolina <i>p</i> -F	27,7	1,2	5,4	0,0	26,9	0,5	37,7	
oxadiazolina <i>p</i> -Cl	54,1	3,8	28,7	0,5	24,1	0,7	52,7	
oxadiazolina <i>p</i> -NO <sub>2</sub>	38,1	0,8	23,2	0,0	90,0	0,4	59,8	
Doxorrubicina	79,4	2,6	74,7	2,1	92,9	0,6	64,1	

Fonte: Elaborado pelo autor

## DISCUSSÃO

A reação de cicloadição 1,3-dipolar é uma das principais reações utilizadas na síntese de núcleos de cinco membros, empregados no meio científico e industrial. Nela ocorre uma adição entre um 1,3-dipolo, estrutura zwitteriônica e um dipolarófilo. No caso da formação das  $\Delta^2$ -1,2,4-oxadiazolinas, o dipolo é do tipo alenila e tem geometria linear, o *N*-óxido de nitrila **08** gerado *in situ* a partir do cloreto de hidroxiiiminoíla **07** e o dipolarófilo é a imina cíclica  $\Delta^1$ -pirrolina **02**. A  $\Delta^1$ -pirrolina **02** é obtida através da reação de oxidação da pirrolidina, que é catalisada pelo AgNO<sub>3</sub> em meio básico, por ser instável e reativo esse monômero trimeriza formando trímero **03**. Os cloretos de hidroxiiiminoíla, por sua vez, necessitam de uma etapa anterior, que é a síntese das oximas a partir dos benzaldeídos *p*-substituídos via ultrassom, que se mostra uma metodologia vantajosa pela economia de reagentes, tempo e materiais, além de ter excelentes rendimentos<sup>4</sup>. As oximas sofrem uma reação de cloração com NCS, utilizando como catalisador uma solução de piridina 6% em hexano originando os cloretos de hidroxiiiminoíla. Essa reação embora seja de fácil execução, mostrou-se dificultosa inicialmente, pois seu término conforme relatado em outros trabalhos, ocorria em duas horas, fato que não aconteceu na execução desse projeto, mesmo com a utilização de reagente novos. Uma possível resposta para isso seria a degradação da piridina, catalisador da reação, único reagente que não era novo. O cloreto de hidroxiiiminoíla e o trímero utilizados na reação de cicloadição via ultrassom, dão origem ao dipolo e ao dipolarófilo no meio reacional, que sofrem adição formando o heterobícclo pirrolidina[1,2-d]1,2,4-oxadiazolina. Esta reação envolve quatro elétrons  $\pi$  do 1,3-dipolo e 2 elétrons  $\pi$  do dipolarófilo e é explicada pela Teoria dos Orbitais de

Fronteira, ocorre pela sobreposição dos orbitais moleculares de fronteira dessas duas espécies envolvidas, por meio de seus elétrons  $\pi$ , onde duas ligações  $\pi$  se desfazem e duas novas ligações sigma são formadas. A formação desse biciclo obedece um mecanismo de reação não-concertado, onde inicialmente é formada a ligação N–C, e posteriormente a ligação O–C fechando o ciclo. Os coeficientes orbitales e a linearidade do dipolo impedem que as duas ligações sejam formadas ao mesmo tempo, sendo necessária a formação de um intermediário ímino dipolar, com nitrogênio  $sp^2$ , que promove a aproximação do oxigênio do dipolo com o carbono do dipolarófilo e a segunda ligação sigma pode ser formada<sup>2</sup>. Com relação ao teste biológico, o ensaio de MTT se baseia na absorção do sal MTT pelas células, que é reduzido na mitocôndria a formazana, expressa a viabilidade mitocondrial e conseqüentemente a viabilidade da célula. Quanto maior a concentração de formazana ao final do teste, maior é a redução do MTT, maior a viabilidade celular e menor o potencial citotóxico dos compostos testados. Com base nos valores obtidos no ensaio os compostos testados apresentaram variados graus de atividade citotóxica frente as linhagens celulares utilizadas, sendo o composto com a substituição *p*-F o que apresentou os menores valores, tendo pouca atividade. A oxadiazolina *p*-Cl mostrou citotoxicidade moderada frente às linhagens HEP-2 e HT-29. Destacou-se o composto *p*-NO<sub>2</sub> substituído com alta atividade citotóxica frente à linhagem HL-60, com percentual de inibição de 90%, muito próximo do percentual de inibição do fármaco padrão doxorrubicina (92,9%). Este último apresentou ainda atividade moderada contra à linhagem HT-29 (59,8%).

### CONCLUSÕES

Através da síntese dos compostos 09 e da realização do teste biológico de citotoxicidade foram explorados durante a execução desse trabalho as características químicas e biológicas do heterobiciclo  $\Delta^2$ -1,2,4-oxadiazolina. As moléculas foram obtidas com rendimentos satisfatórios e possíveis dificuldades de execução foram superadas ao longo do projeto. Frente aos resultados promissores obtidos, vislumbra-se a ampliação da série e a realização de outros testes biológicos, como o objetivo de melhor compreender do grupo farmacofórico, bem como a influência dos substituintes sobre ele.

### AGRADECIMENTOS

Ao CNPq/CAPES pelo apoio institucional. À Central Analítica do DQF-UFPE e ao LTM pelas análises espectroscópicas; ao Professor Rodolfo pela orientação e apoio em todas as etapas do projeto e a Professora Terezinha Gonçalves pelas análises biológicas.

### REFERÊNCIAS

1. Ahmed, T.; Daami-Remadi, M.; Jannet, H. B. Synthesis of new antifungal 1,2,4-bis-oxadiazolines using cycloaddition reaction of nitrile oxide with bis-Schiff base. *Indian Journal of Chemistry*. v. 52b, p. 922-928, 2013
2. Mendes, C. C. B. *Síntese e avaliação das atividades antinociceptiva e antichagásica de hidrazonas e semicarbazona Derivadas do novo heterociclo Pirrolidina[1,2-d][1,2,4]-2-oxadiazolina*. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.
3. Kamel, M. M. Synthesis, Characterization, Cytotoxicity and Toxicity of Pyrazole Derivatives. *Acta Chim. Slov*, v. 62, p. 136-151, 2014.
4. Santos, A. C. V. *Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana de 3-aril-2-isoxazolina[5,4-d]pirrolidinas na forma de base livre e de seus sais cloridratos*. 2014. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Departamento de Ciências Farmacêuticas, Recife, 2014.