



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

EDUARDO AUGUSTO VASCONCELOS DE FREITAS RAMALHO

**SÍNTESE, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTICÂNCER DE NOVOS DERIVADOS OXAZOLIDINÔNICOS**

Recife

2018

EDUARDO AUGUSTO VASCONCELOS DE FREITAS RAMALHO

**SÍNTESE, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTICÂNCER DE NOVOS DERIVADOS OXAZOLIDINÔNICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Inovação Terapêutica, da Universidade Federal de
Pernambuco como requisito para a obtenção do
título de doutor em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta
Coorientadora: Dra. Marina Galdino da Rocha Pitta
Coorientador: Prof. Dr. Moacyr Jesus B. de Melo Rêgo

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Ramalho, Eduardo Augusto Vasconcelos de Freitas
Síntese, elucidação estrutural e avaliação da atividade anticâncer
de novos derivados oxazolidinônicos / Eduardo Augusto Vasconcelos
de Freitas Ramalho - 2018.
144 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Ivan da Rocha Pitta
Coorientadores: Marina Galdino da Rocha Pitta
Moacyr Jesus B. de Melo Rêgo
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica. Recife, 2018.

Inclui referências, apêndices e anexos

1. Câncer 2. Oxazolidinonas 3. Quimioterapia
I. Pitta, Ivan da Rocha (orient.) II. Pitta, Marina Galdino da Rocha
(coorient.) III. Rêgo, Moacyr Jesus B. de Melo (coorient.) IV. Título

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-119

EDUARDO AUGUSTO VASCONCELOS DE FREITAS RAMALHO

**SÍNTESE, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTICÂNCER DE NOVOS DERIVADOS OXAZOLIDINÔNICOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Inovação Terapêutica, da Universidade Federal de
Pernambuco como requisito para a obtenção do
título de doutor em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 05/04/2018

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Mardonny Bruno de Oliveira Chagas
Núcleo de Ciências da Vida – Centro Acadêmico do Agreste - UFPE

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria
Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Marina Galdino da Rocha Pitta
Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica - Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Tiago Rafael de Sousa Nunes
Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica - Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Douglas Carvalho Francisco Viana
Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica – Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

A minha família, minha base e meu alicerce.

A minha mãe, Beth por TUDO mesmo.

Ao meu pai, pelos conselhos e ensinamentos na área acadêmica.

A Maria Julliana por todo o suporte e encorajamento diário.

A Margarida Agostinho Lemos (Magal) pelo apoio nos momentos mais críticos.

A CAPES e a FACEPE, pelo financiamento que possibilitou a realização deste trabalho. Ao Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos – LPSF que disponibilizou equipamentos e todo o material necessário para a parte experimental.

A todos os colegas que fazem o LPSF.

Ao Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta e Dra. Marina Galdino da Rocha Pitta, pela orientação e suporte fornecidos.

Ao Prof. Dr. Moacyr Rêgo, pela condução de todos os testes biológicos no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas – LINAT.

A Valécia de Cássia pela disponibilidade e organização na realização dos ensaios biológicos.

E por fim, a cada uma das pessoas que de alguma maneira tornou possível a concretização deste trabalho.

“O amor é a alegria pelo bem; o bem é o único fundamento do amor. Amar significa querer fazer bem a alguém”.

Santo Tomás de Aquino

RESUMO

O câncer é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, sendo este o motivo pelo qual demanda grande atenção da comunidade científica mundial no intuito de obter agentes quimioterápicos úteis e seguros. A quimioterapia é o tratamento mais empregado contra o câncer, pois possui a vantagem de se distribuir por todos os locais do corpo, contudo sabe-se que este método não atua apenas em células malignas, ocasionando prejuízo a células saudáveis. A busca por novas moléculas para o tratamento do câncer é uma estratégia vigente, desta forma este trabalho teve como objetivo a síntese e caracterização estrutural de novos 15 derivados oxazolidinônicos candidatos a fármacos com potencial atividade anticâncer frente a células malignas. As moléculas foram sintetizadas e caracterizadas obtendo-se 15 compostos (LPSF/NBM). Diferentes estratégias sintéticas foram abordadas a fim de sintetizar moléculas bioativas no câncer, tais como a reação de adição de Michael e condensação de Knoevenagel. Todos os compostos foram caracterizados por diferentes técnicas espectroscópicas tais como Ressonância Magnética Nuclear, Espectrometria de Massas e Infravermelho. Dentre as 15 novas moléculas da série LPSF/NBM propostas, 11 foram sintetizadas com sucesso obedecendo os critérios de pureza e rendimento aceitáveis para os ensaios biológicos. Esses compostos foram testados em células das linhagens de leucemia, linfoma e câncer de próstata e em relação à sua atividade anticâncer, pode-se observar que os novos derivados oxazolidinônicos demonstraram seletividade frente a células do sangue periférico. Já em relação ao perfil citotóxico frente a células tumorais, destacam-se os compostos LPSF/NBM-1 e LPSF/NBM-2. A citometria de fluxo indicou que LPSF/NBM-2 foi capaz de aumentar a porcentagem de células na fase G2/M, sugerindo uma conexão com mecanismos de morte celular, tal característica poderia indicar futuras aplicações para molécula candidata a terapia adjuvante para o referido tumor. O desenvolvimento de novas metodologias representa um avanço para a síntese de novos derivados oxazolidinônicos, a utilização do referido método propiciou a síntese desses novos derivados contendo substituintes potencialmente reativos.

Palavras-chave: Câncer. Oxazolidinonas. Quimioterapia. Ciclo celular.

ABSTRACT

Cancer is one of the greatest public health problems in the world, and this is why it demands great attention from the world scientific community in order to obtain useful and safe chemotherapeutic agents. Chemotherapy is the most commonly used treatment against cancer because it has the advantage of being distributed throughout the body, however, it is known that this method does not only act on malignant cells, causing damage to healthy cells. The search for new molecules for the treatment of cancer is a current strategy, so this work aimed at the synthesis and structural characterization of new oxazolidinone derivatives candidates for drugs with potential anticancer activity against malignant cells. The molecules were synthesized and characterized to give 15 compounds (LPSF/NBM). Different synthetic strategies have been addressed in order to synthesize bioactive molecules in cancer, such as the Michael addition reaction and Knoevenagel condensation. All compounds were characterized by different spectroscopic techniques such as Nuclear Magnetic Resonance, Mass Spectrometry and Infrared. Among the 15 new molecules of the proposed LPSF/NBM series, 11 were successfully synthesized according to acceptable purity and yield criteria for biological assays. These compounds were tested in cells of the leukemia, lymphoma and prostate cancer lines and in relation to their anticancer activity, it can be observed that the new oxazolidinones derivatives demonstrated selectivity towards peripheral blood cells. Regarding the cytotoxic profile against tumor cells, the most important are the LPSF/NBM-1 and LPSF/NBM-2 compounds. Flow cytometry indicated that LPSF/NBM-2 was able to increase the percentage of cells in the G2/M phase, suggesting a connection with mechanisms of cell death, such a feature could indicate future applications for molecule candidate for adjuvant therapy for said tumor. The development of new methodologies represents an advance for the synthesis of new oxazolidinones derivatives, the use of said method provided the synthesis of these new derivatives containing potentially reactive substituents.

Keywords: Cancer. Oxazolidinones. Chemotherapy. Cell cycle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Atividade dos agentes quimioterápicos antineoplásicos, de acordo com a fase do ciclo celular	17
Figura 2- Esquema OZDs, alvos e respostas celulares	18
Figura 3- Heterodímeros PPAR/RXR se ligam a PPREs localizados em promotores de genes alvo. PPAR se associa ao complexo co-repressor na ausência de ligante. Na presença de um ligante, ocorre a ativação da transcrição gênica	20
Figura 4- Estrutura da Pioglitazona.....	21
Figura 5- Estrutura da Rosiglitazona.....	21
Figura 6- Oxazolidin-2-ona	23
Figura 7- Principais atividades biológicas atribuídas ao núcleo oxazolidinônico	24
Figura 8- Halometiloxiranos e aminas primárias na presença de sais de carbonato como precursores do núcleo oxazolidinônico	25
Figura 9- Espectro de ^1H RMN da molécula LPSF/NBM-3 (CDCl_3 , 300 MHz)	47
Figura 10- Espectro de ^{13}C RMN da molécula LPSF/NBM-3 (CDCl_3 , 75 MHz)	48
Figura 11- Espectro de Infravermelho da molécula LPSF/NBM-3	49
Figura 12- Espectrometria de Massas GC-MS da molécula LPSF/NBM-3	50
Figura 13- Espectro de RMN 2D da molécula LPSF/NBM-3	51
Figura 14- Derivado oxazolidinônico sintetizado por Hedaya e cols. apresentando significativa atividade contra células MCF-7	53
Figura 15- Fenil piperidina di-substituída com grupamentos 4-trifluorofenil.....	55
Figura 16- Ensaio de ciclo celular em células MOLT-4	56
Figura 17- Ensaio de morte celular com os novos derivados oxazolidinônicos	56
Figura 18- Estruturas moleculares do LPSF/NBM-1, LPSF/NBM-2 e Citarabina ...	57
Quadro 1- Ésteres de Cope e seus substituintes sintetizados no LPSF	36
Quadro 2- Novos derivados oxazolidinônicos originados de benzaldeídos substituídos sintetizados no LPSF	44

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1- Rota de síntese inicialmente proposta para a obtenção dos novos derivados oxazolidinônicos	31
Esquema 2- Condensação de Knoevenagel	33
Esquema 3- Síntese de condensação de Knoevenagel para produtos intermediários	37
Esquema 4- Mecanismo de reação hipotético para obtenção dos ésteres de Cope	38
Esquema 5- Síntese de adição de Michael	39
Esquema 6- Mecanismo reacional hipotético de C-alquilação	40
Esquema 7- Esquema sintético baseado na condensação de Knoevenagel	42
Esquema 8- Mecanismo hipotético de condensação de Knoevenagel	43
Esquema 9- Esquema demonstrativo das tentativas de sintetizar a série LPSF/NBMs através de adição de Michael utilizando intermediários	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Reagentes utilizados na síntese dos novos derivados oxazolidinônicos..	30
Tabela 2- Concentrações de células plaqueadas com base no NIC-60	35
Tabela 3- Rendimentos reacionais obtidos na síntese das moléculas da série LPSF/NBM nos métodos 1 e 2	46
Tabela 4- Valores de IC ₅₀ obtidos através dos novos derivados oxazolidinônicos frente a diferentes linhagens tumorais	52

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDK	Ciclina Dependente de Quinases
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, <i>Desoxiribonucleic Acid</i>
FM	Fórmula Molecular
E2F	Fator de transcrição E2, <i>Transcription Factor E2</i>
GC-MS	Cromatografia gasosa, <i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i>
IV	Infravermelho
LPSF	Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos
LC-MS	Cromatografia Líquida, <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i>
MHz	<i>Megahertz</i>
mm	Milímetros
nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial de Saúde
OZD	Oxazolidinonas
PF	Ponto de Fusão
PM	Peso Molecular
pKR	Proteína quinase R
pRB	Proteína do Retinoblastoma
PPAR	Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma
PPGIT	Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica
Rdt	Rendimento
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TZD	Tiazolidinadionas
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 OBJETIVOS.....	15
1.1.1 Geral.....	15
1.1.2 Específicos.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 CÂNCER.....	16
2.2 TRATAMENTOS E ALVOS TERAPÊUTICOS.....	17
2.3 RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMA....	19
2.3.1 PPAR e Câncer.....	20
2.4 NÚCLEO OXAZOLIDINÔNICO.....	23
2.4.1 Síntese do Núcleo Oxazolidinônico.....	24
2.4.2 Atividade antitumoral do Núcleo Oxazolidinônico.....	25
3 METODOLOGIA.....	29
3.1 PARTE QUÍMICA.....	29
3.1.1 Materiais e Equipamentos.....	29
3.1.2 Reagentes e Solventes.....	30
3.2 ESTRATÉGIA SINTÉTICA 1: OBTENÇÃO DA SÉRIE LPSF/NBM ATRAVÉS DE DUAS ETAPAS.....	31
3.3 ESTRATÉGIA SINTÉTICA 2: OBTENÇÃO DA SÉRIE LPSF/NBM ATRAVÉS DE ETAPA ÚNICA.....	32
3.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	33
3.4.1 Materiais e Equipamentos.....	33
3.4.2 Linhagem e Cultivo celular.....	34
3.4.3 Ensaio de Citotoxicidade.....	34
3.4.4 Efeitos dos novos derivados oxazolidinônicos no ciclo celular	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 ESTRATÉGIA SINTÉTICA 1: OBTENÇÃO DA SÉRIE LPSF/NBM ATRAVÉS DE DUAS ETAPAS.....	36
4.2 ESTRATÉGIA SINTÉTICA 2: OBTENÇÃO DA SÉRIE LPSF/NBM ATRAVÉS DE ETAPA ÚNICA.....	41
4.3 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL.....	47

4.4 RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE.....	52
4.5 ENSAIO DE CICLO E MORTE CELULAR.....	55
5 CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS.....	60
APÊNDICE A – Propriedades físico-químicas dos compostos sintetizados no LPSF.....	65
APÊNDICE B – Artigo de revisão submetido no periódico <i>Mini-reviews in Medicinal Chemistry</i>	71
ANEXO A - Espectros de Ressonância Magnética Nuclear.....	90
ANEXO B – Demais caracterizações estruturais realizadas.....	112

1 INTRODUÇÃO

O câncer constitui-se como uma das patologias a qual demanda grande atenção por parte da comunidade científica mundial, caracterizando-se como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. Neste contexto, indústria e academia tem realizado esforços direcionados no intuito de obter agentes quimioterápicos úteis e seguros. A quimioterapia é o tratamento mais empregado, pois possui a vantagem de se distribuir por todos os locais do corpo. No entanto, sabe-se que os agentes quimioterápicos não agem exclusivamente em células tumorais, podendo levar a diferentes graus de toxicidade em células normais, dependendo do tempo e da concentração plasmática em que se encontram presentes no organismo. Apesar dos avanços científicos obtidos recentemente, muitos tipos de câncer ainda são incuráveis. Além disso, ressalta-se a questão da resistência adquirida pelas células tumorais frente a alguns agentes quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer.

A busca de novas moléculas para o tratamento do câncer tem se mostrado uma estratégia vigente no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) da Universidade Federal de Pernambuco. Uma das classes químicas de moléculas que são exploradas pelo LPSF pertence a série das tioxoxazolidinonas, as quais apresentam como característica principal a presença de um núcleo oxazolidinônico. Oxazolidinonas são uma classe de azóis, oxazolidinas com carbono entre o nitrogênio e oxigênio oxidado para uma cetona, portanto oxazolidinona (PANDIT *et al*, 2012). As oxazolidinas estão presentes em diversas moléculas de interesse farmacêutico. Além da atividade antibacteriana bem estabelecida, estudos recentes mostram uma crescente gama de atividades dos derivados oxazolidínicos como: atividade antifúngica, hipoglicêmica, anticonvulsivante e anticâncer (SINGH, 2011; TADESSE, 2011).

Estudos prévios demonstraram bioatividade de oxazolidinonas *N*-substituídas em diferentes linhagens celulares tumorais, apresentando resultados promissores contra células de cânceres ovariano e oral (KUMAR *et al* 2009). Desta forma, os objetivos deste trabalho foram sintetizar, caracterizar estruturalmente, otimizar o processo de síntese de oxazolidinonas, bem como avaliar o potencial anticâncer destes novos agentes oxazolidinônicos *in vitro* frente linhagens tumorais de células neoplásicas de câncer de próstata, leucemia, linfoma, bem como

sua seletividade frente a células periféricas do sangue (PBMC - *Peripheral Blood Mononuclear Cell*).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

- Desenvolver novas alternativas terapêuticas através da síntese orgânica de novos antineoplásicos citotóxicos derivados de oxazolidinonas da série LPSF/NBM, bem como avaliar sua atividade anticâncer *in vitro* frente a linhagens de câncer de origens sólida e hematopoiética.

1.1.2 Específicos

- Obter novos derivados oxazolidinônicos utilizando o mínimo de etapas e com maior rendimento reacional possível;
- Caracterizar novos agentes oxazolidinônicos através das técnicas espectroscópicas de ^{13}C RMN e ^1H RMN, Infravermelho e Espectrometria de Massas;
- Avaliar o potencial citotóxico dos novos compostos em linhagens de câncer de próstata (DU145 e PC-3), leucemia mieloide (K562), leucemia promielocítica aguda (HL60), Leucemia linfoblástica aguda (MOLT-4) e sua seletividade frente a células PBMC;
- Investigar mecanismos indutores de morte e vias de sobrevivência celular, avaliando seus perfis citotóxicos;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER

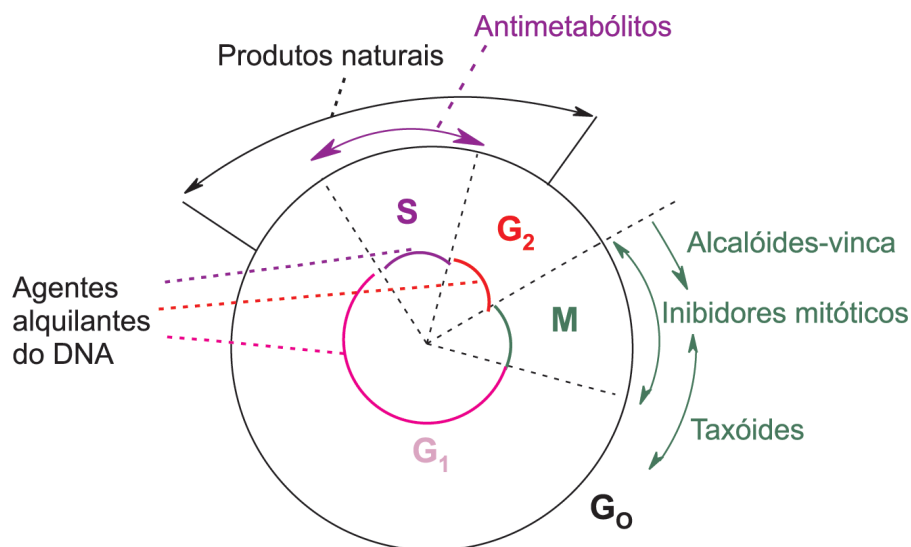
O câncer é o resultado do crescimento autônomo e desordenado de células e tecidos, sendo considerada uma das doenças de maior incidência no mundo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) ocorreram 14.1 milhões de novos casos de câncer no mundo com 8.2 milhões de mortes no ano de 2012 (GLOBOCAN, 2012). Estima-se que a prevalência deve crescer em todo o mundo devido ao crescimento e envelhecimento da população, em particular nos países menos desenvolvidos, em que cerca de 82% da população mundial reside. Hábitos de vida que são conhecidos por aumentar o risco de câncer, como o tabagismo, má alimentação, sedentarismo e alterações reprodutivas (incluindo menor paridade e idade mais avançada no primeiro parto), tem contribuído para o aumento do número de casos da doença em países menos desenvolvidos economicamente. Neste contexto, indústria e academia tem realizado esforços direcionados no intuito de obter agentes quimioterápicos úteis e seguros. A quimioterapia é o tratamento mais empregado, pois possui a vantagem de se distribuir por todos os locais do corpo. No entanto, sabe-se que os agentes quimioterápicos não agem exclusivamente em células tumorais, podendo levar a diferentes graus de toxicidade em células normais, dependendo do tempo e da concentração plasmática em que se encontram presentes no organismo. As principais formas de tratamento utilizadas atualmente envolvem cirurgia, quimioterapia e radioterapia, as quais são usadas em conjunto, variando apenas quanto à importância de cada uma e a ordem de sua indicação (SHEWACH & KUCHTA, 2009). Oxazolidinonas são uma classe de azóis, oxazolidinas com carbono entre o nitrogênio e oxigênio oxidado para uma cetona, portanto oxazolidinona (PANDIT *et al.*, 2012). As oxazolidinas estão presentes em diversas moléculas de interesse farmacêutico. Além da atividade antibacteriana bem estabelecida, estudos recentes mostram uma crescente gama de atividades dos derivados oxazolidínicos como: atividade antifúngica, hipoglicêmica, anticonvulsivante e anticâncer (SINGH, 2011; TADESSE, 2011). KUMAR *et al* (2009) sintetizaram oxazolidinas *N*-substituídas para avaliação de sua citotoxicidade *in vitro* em linhagens celulares tumorais, apresentando resultados promissores contra células de cânceres ovariano e oral.

2.2. TRATAMENTOS E ALVOS TERAPÊUTICOS

As principais formas de tratamento utilizadas atualmente envolvem cirurgia, quimioterapia e radioterapia (SHEWACH & KUCHTA, 2009), as quais são usadas em conjunto, variando apenas quanto à importância de cada uma e a ordem de sua indicação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). A quimioterapia geralmente envolve o uso de fármacos de baixa massa molecular, que destroem as células tumorais ou limitam sua proliferação. Por agirem tanto em células tumorais quanto em células saudáveis, muitos agentes citotóxicos causam efeitos colaterais, como depressão da medula óssea, lesões no trato gastrintestinal, queda de cabelo e náuseas, além do desenvolvimento de resistência clínica (THURSTON, 2007).

Desde o início do uso da quimioterapia, na década de 1940, um grande número de novos medicamentos anticâncer tem sido desenvolvido (SHEWACH & KUCHTA, 2009). Esses medicamentos podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação, e também de acordo com a sua atuação no ciclo celular, podendo ser divididos em ciclo-específicos e ciclo-inespecíficos (INCA, 2008) (Figura 1).

Figura 1- Atividade dos agentes quimioterápicos antineoplásicos, de acordo com a fase do ciclo celular.

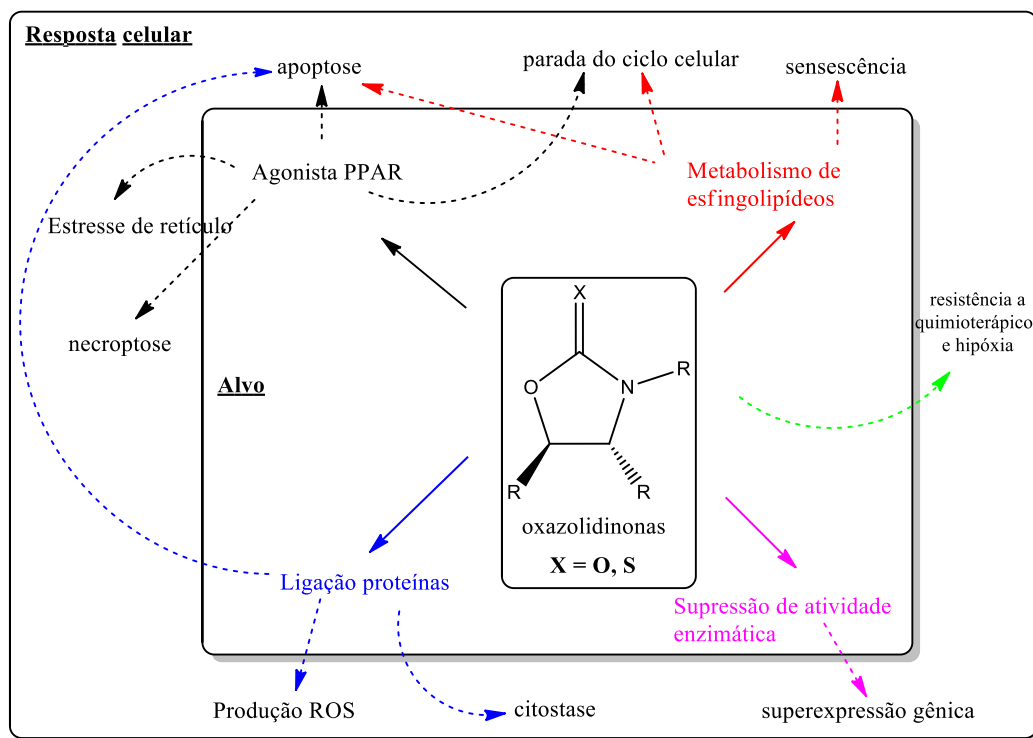


Fonte: ALMEIDA *et al.*, 2005.

Dentre os principais alvos terapêuticos no que tange a pesquisa clínica envolvendo derivados oxazolidinônicos, pode-se destacar:

- Agonismo parcial de PPAR γ ;
- Interferência no metabolismo de esfingolipídios;
- Bloqueadores da atividade enzimática em desordens hormonais;
- Ligação com proteínas-chave (Figura 2);

Figura 2- Núcleo oxazolidinônico e alguns de seus alvos originando diferentes tipos de respostas celulares



Fonte: Autor, 2017.

A interação de moléculas com núcleo oxazolidinônico em sua estrutura é responsável por gerar diversas respostas celulares em diferentes tipos de tumores. Dentre as respostas celulares descritas até o momento, estão: indução a apoptose, parada do ciclo celular, senescência, estresse de retículo, regulação da expressão gênica, entre outras.

2.3 RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMA

Os PPARs (Receptores ativados por Proliferadores de Peroxissoma) são fatores de transcrição que pertencem a superfamília dos receptores nucleares (MANGELSDORF *et al.*, 1995). O PPAR liga-se a dois hexanucleotídeos como heterodímeros com o receptor retinoide X (RXR), propiciando a ativação de vários genes alvo (HSU *et al.*, 1998; GERVOIS *et al.*, 1999; KLIEWER *et al.*, 1992). Foram identificados três subtipos de PPARs, o PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ , os quais apresentaram alto grau de conservação. Os três subtipos apresentam entre si, domínio de ligação com o DNA de 80% enquanto que seus domínios de ligação apresentaram um menor índice, o que justifica suas diferentes ativações por compostos endógenos e exógenos gerando diferentes respostas biológicas entre os três tipos de PPARs (DESVERGNE e WAHLI, 1999; WILLSON *et al.*, 2000).

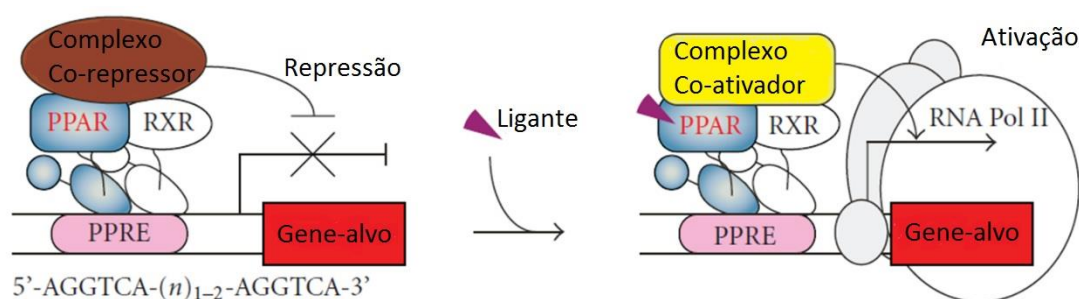
O PPAR α encontra-se expresso em órgãos como fígado, rins, intestino delgado e coração, está envolvido com a conformação lipoproteica. O PPAR α é ativado por diversas moléculas como os ácidos graxos insaturados de cadeia longa, eicosanoides e drogas hipolipidêmicas tal como fenofibrato (KREY *et al.*, 1997; ISSEMAN e GREEN, 1990; FORMAN, CHEN e EVANS, 1997; KLIEWER *et al.*, 1997). Ativadores de PPAR α já foram utilizados para tratamento de dislipidemia causando redução dos triglicérides do plasma e elevação do colesterol HDL (FRUCHART, 2001; STAELS *et al.*, 1998).

O PPAR δ (também conhecido como PPAR β) é expresso sistemicamente e está relacionado a oxidação de ácidos graxos, diferenciação de queratinócitos, cicatrização e resposta de macrófagos a lipoproteínas de densidade muito baixa (WANG *et al.*, 2003; TAN *et al.*, 2001; DRESSEL *et al.*, 2003; CHAWLA *et al.*, 2003; TANAKA *et al.*, 2003). Foram propostos para tratamento de doenças metabólicas (BARISH, NARKAR e EVANS, 2006; TAKAHASHI *et al.*, 2006).

O PPAR γ possui duas isoformas: PPAR γ 1 e PPAR γ 2 (TONTONOZ *et al.*, 1994; FAJAS *et al.*, 1997). PPAR γ 2, a qual é gerada através de *splicing* alternativo, contém 28 aminoácidos a mais na porção N-terminal, se comparado ao PPAR γ 1. PPAR γ 3 caracteriza-se por ser uma variante da PPAR γ 1 e codificando uma proteína idêntica a sua isoforma 1 (FAJAS, FRUCHART e AUWERX, 1998). O PPAR γ 2 é expresso exclusivamente nos adipócitos com função primordial na diferenciação dos mesmos, armazenamento lipídico no tecido adiposo branco e dissipação de energia no tecido adiposo marrom (TONOTOZ *et al.*,

1994; TONOTOZ, HU e SPIEGELMAN, 1994). Já o PPAR γ 1 é expresso no cólon, sistema imune (em monócitos e macrófagos) e outros. Com exceção da função do PPAR γ 2 no tecido adiposo, o PPAR γ participa de processos inflamatórios e regulação do ciclo celular, bem como outras funções (LEHRKE e LAZAR, 2005).

Figura 3- Heterodímeros PPAR/RXR se ligam a PPRES localizados em promotores de genes alvo. PPAR se associa ao complexo co-repressor na ausência de ligante. Na presença de um ligante, ocorre a ativação da transcrição gênica.



Fonte: adaptado de Tachibana *et al.*, 2008.

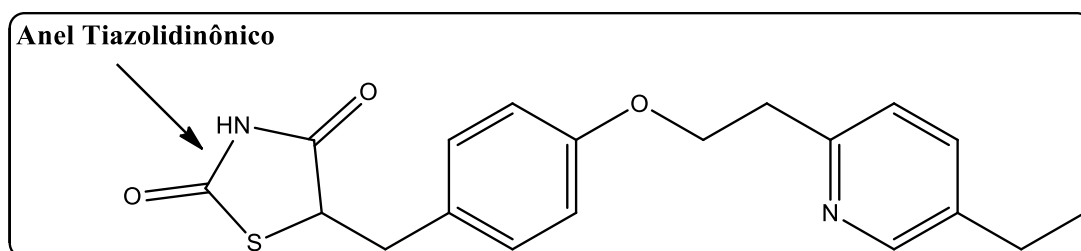
O PPAR γ está ligado ao metabolismo da glicose através do aumento da sensibilidade da insulina, representando um potencial alvo terapêutico para diabetes tipo 2 (LEHRKE e LAZAR, 2005), além disso, possuem alta afinidade de ligação com drogas tiazolidínicas (TZDs) (LEHMANN *et al*, 1995). Com isso, pode-se classificar os PPARs de maneira geral como alvos moleculares para o desenvolvimento de drogas para tratar diabetes tipo 2 e síndromes metabólicas. Por outro lado, PPARs também desempenham função na regulação da progressão do câncer.

2.3.1 PPAR e Câncer

A classe de moléculas denominada Tiazolidinadionas (TZDs), também conhecidas como glitazonas tais como: ciglitazona, troglitazona, rosiglitazona e pioglitazona as quais foram lançadas na década de 90, também conhecidas como “sintetizadores de insulina” pela sua capacidade de reduzir os níveis de glicose no sangue (BAILEY e DAY, 2001). Apresentam como alvo molecular o PPAR γ , o qual foi intensamente investigado por diversos grupos de pesquisa em todo o mundo (DAY, 1999). Embora as glitazonas compartilhem um

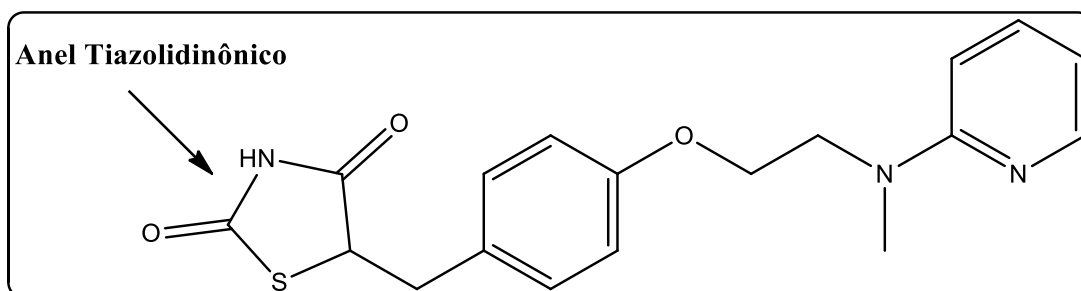
núcleo tiazolidínico comum a todas, elas possuem diferenças significantes em eficácia e segurança. A pioglitazona embora seja menos eficaz na ativação do PPAR γ se comparada a rosiglitazona (LEHMANN *et al.*, 1995) é igualmente eficaz como agente sintetizador de insulina apresentando melhores efeitos em lipídios e esteatose hepática (BALKRISHNAM *et al.*, 2007; BEYSEN *et al.*, 2008; DE VRIES e RUSSEL-JONES, 2009).

Figura 4- Estrutura da Pioglitazona



Fonte: Autor, 2017

Figura 5- Estrutura da Rosiglitazona



Fonte: Autor, 2017

Sabe-se que as tiazolidinas são agonistas totais dos PPARs, e, devido a sua complexidade, torna-se responsável por promover diversos alvos terapêuticos para várias doenças tais como: Dislipidemia, diabetes, inflamação, desordens degenerativas e câncer (TYAGI *et al.*, 2011). Embora as bases moleculares para explicar a atividade das tiazolidinas como agentes antitumorais ainda não estejam completamente elucidadas, estudos indicam que os efeitos antitumorais são exercidos por mecanismos dependentes e independentes de PPAR γ (JOSHI, PAL e RAMAA, 2014). Estudos *in vitro* conduzidos com fibroblastos de camundongo demonstram que a ativação do PPAR γ inibe o desenvolvimento tumoral através da parada do ciclo celular de células cancerígenas através de efeitos nos *checkpoints* ou inibição de fatores de crescimento (BLANQUICETT, ROMAN e HART, 2008). Tiazolidinas possuem como alvo os inibidores de quinases dependentes de ciclinas (CDK) tais como p18, p21 e p27. Inibidores de CDK bloqueiam o progresso do ciclo celular através da inativação da

formação do complexo ciclina-CDK, a qual é crucial para a fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb) quando associada com a E2F. Outro importante efeito destas moléculas é na promoção da parada do ciclo celular na fase G1, o que está relacionado com a diminuição de expressão da ciclina D1 em várias linhagens de células. Esta diminuição da expressão da ciclina D1 é acompanhada da diminuição da expressão de CDK2 e CDK4, bem como atenuação da fosforilação da proteína pRb, o que provoca parada no ciclo celular (BLANQUICETT, ROMAN e HART, 2008).

Além da interferência no ciclo celular, outro mecanismo bem aceito no tratamento de tumores consiste na indução da apoptose. Neste contexto a apoptose consiste num mecanismo molecular de fundamental importância o qual os ativadores de PPAR γ exercem ações contra células que se tornaram malignas (SAINIS *et al.*, 2008). Tiazolidinas mostraram-se eficazes na indução da apoptose através das vias intrínseca e extrínseca (ELROD e SUN, 2008; GRILLIER-VUISSOZ *et al.*, 2012). De forma geral, esta indução da apoptose pode ser PPAR γ dependente e/ou PPAR γ independente, dependendo do tipo celular e seus ligantes.

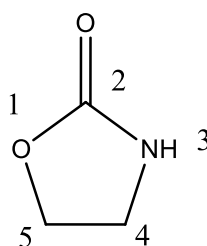
As glitazonas (TZD) ativam PPAR γ estimulando a heterodimerização com o receptor retinoide X, recrutamento de coativadores e dissociação de co-repressores que são responsáveis por induzir a apoptose pelo decréscimo de proteínas anti-apoptóticas tais como bcl-2/bcl-x e survivina, enquanto que aumenta os níveis de proteínas pró-apoptóticas, p53, Bcl-2 (BAD) e fosfatase e homólogos de tensina (JOHNSON e GALE, 2010). Algumas glitazonas demonstraram induzir células tumorais a apoptose pela via intrínseca, porém de forma PPAR γ independente.

No intuito de distinguir a dependência de ativação do PPAR γ pelas glitazonas, Shiau e colaboradores sintetizaram derivados de pioglitazona, troglitazona e ciglitazona contendo atividade de ligação com PPAR γ e moléculas análogas sem efeito de atividade de ligação com PPAR γ . Estes análogos possuem uma dupla ligação na porção terminal no anel tiazolidina-2,4-diona que suprime a ligação com o PPAR γ (SHIAU *et al.*, 2005). Tanto a troglitazona comum quanto a modificada apresentaram atividade de liberação do citocromo C e fragmentação do DNA em linhagens de células de próstata atribuindo a inibição do crescimento a apoptose. Estes achados sugerem que as TZDs são capazes de induzir a apoptose independentemente da ativação de PPAR γ . A indução da apoptose no referido estudo deu-se em parte, devido a inibição da função anti-apoptótica de Bcl-2 e Bcl-X_L (GALLI *et al.*, 2006).

2.4 NÚCLEO OXAZOLIDINÔNICO

Oxazolidinonas são uma classe de azóis, oxazolidinas com carbono entre o nitrogênio e oxigênio oxidado para uma cetona, portanto oxazolidinona (PANDIT *et al.*, 2012) (Figura 6).

Figura 6- Oxazolidin-2-ona.



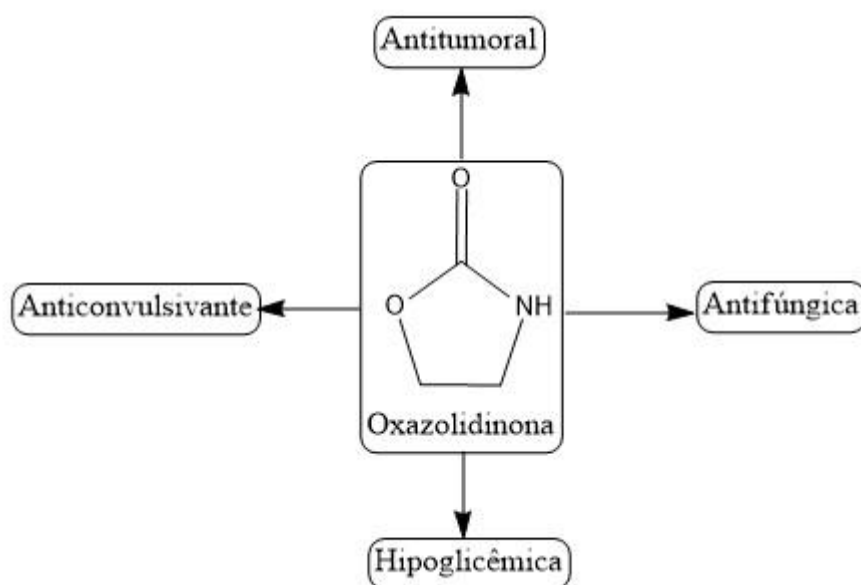
Fonte: Autor, 2017.

Essas moléculas foram descobertas pela empresa DuPont, e patenteadas em 1978 (FUGITT & LUCKENBAUGH, 1978). No início dos anos 2000 foi considerada como uma nova classe de agentes antimicrobianos considerada com boa atividade contra bactérias patogênicas Gram-positivas.

A primeira oxazolidinona a ser comercializada foi a Linezolida, aprovada para tratamento de pacientes com infecções causadas por bactérias Gram-positivas (BARRETT, 2000; SHAW & BARBACHYN, 2011). Oxazolidinonas inibem seletivamente a síntese de proteínas bacterianas através de ligação com a subunidade ribossomal 50S, impedindo a formação de um complexo de iniciação 70S funcional (ZHOU *et al.*, 2002; STEVENS *et al.*, 2004).

As oxazolidinas estão presentes em diversas moléculas de interesse farmacêutico. Além da atividade antibacteriana, há relatos na literatura de derivados oxazolidínicos com atividade antifúngica (DEVI *et al.*, 2013), hipoglicêmica (AGRAWAL *et al.*, 2005; DOW *et al.*, 1990), anticonvulsivante (KOMBIAN & PHILLIPS, 2012) e anticâncer (SINGH, 2011; TADESSE, 2011).

Figura 7- Principais atividades biológicas atribuídas ao núcleo oxazolidinônico



.Fonte: Autor, 2017.

A utilização de derivados oxazolidinônicos como agentes anticâncer datam do final da década de 60 e início de 70. Em 1973, Fugitt e Martinelli sintetizaram uma série de 2-oxazolidinonas com cadeia lateral alquinoximetil na posição 5. Embora estes compostos não tenham apresentado atividade antitumoral significativa, serviu de base para outros estudos os quais mostrariam os derivados oxazolidinônicos como potenciais agentes anticâncer.

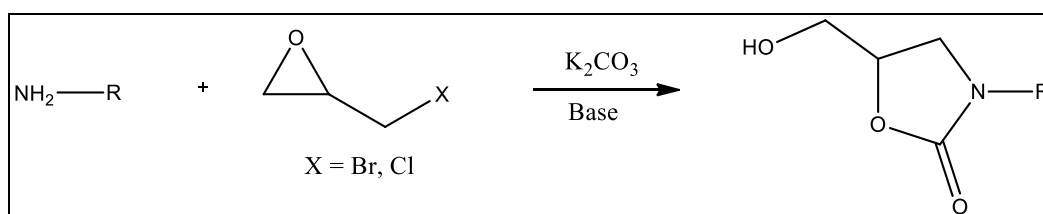
Atualmente vários grupos de pesquisa do redor do mundo vem obtendo significativos resultados utilizando derivados de oxazolidina como agente antitumoral através de diversos mecanismos de ação, tais como inibição de diferentes fatores de crescimento, enzimas e proteínas quinases incluindo telomerasas, histonas deacetilases, fator de crescimento epidermal, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) entre outros.

2.4.1 Síntese do núcleo oxazolidinônico

Moléculas orgânicas contendo núcleos oxazolidinônicos em sua estrutura foram reconhecidas inicialmente por sua excelente atividade antibacteriana contra agentes

bacterianos que adquirem resistência a antibióticos previamente utilizados na clínica, especialmente contra o *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA). Devido a sua importância e versatilidade, diversos métodos sintéticos foram desenvolvidos visando obter uma maior diversidade de substituintes no núcleo oxazolidínico no intuito de se obter variadas atividades biológicas. Resumidamente, o núcleo oxazolidínico tem sido sintetizado por várias reações diferentes, dentre elas: Síntese assimétrica DuPont; Uso de halometiloxiranos, amins primárias e sais de carbonato; Reações com ureia e etanolaminas utilizando micro-ondas; Iodociclocarbamação, entre outras (PANDIT *et al.*, 2012). Na presente revisão será citado apenas o método partindo de amins primárias utilizando sais de carbonato na presença de uma base (figura 8) devido à sua viabilidade metodológica e econômica.

Figura 8- Halometiloxiranos e amins primárias na presença de sais de carbonato como precursores do núcleo oxazolidinônico.



Fonte: Pandit *et al.*, 2012.

2.4.2 Atividade antitumoral do núcleo oxazolidinônico

Sabe-se que TZDs são agonistas totais sintéticos de PPAR γ e que a ativação total deste acarreta efeitos indesejados de alta toxicidade para as células. Desta forma, cabe buscar novas alternativas para desenvolver moléculas agonistas parciais de PPAR γ que se configurem mais seguras e menos tóxicas em relação aos agonistas totais. As moléculas sintetizadas configuram-se como novos análogos de oxazol-5-onas, os quais foram desenhados e virtualmente analisados como possíveis candidatos a agentes anticâncer. Os efeitos das TZDs nos receptores de células cancerígenas ocorrem devido a mecanismos tais como apoptose, diferenciação celular e parada do ciclo celular. No caso de apoptose as TZDs se ligam com alta afinidade ao o subtipo de PPAR γ . Após ativação advinda dos ligantes sintéticos, ocorre a formação de um heterodímero com o receptor retinoide X os quais ligam-se com elementos de resposta PPRE que regulam a transcrição de alguns genes. Sabe-se que as tiazolidinas são

capazes de induzir parada no ciclo celular na fase G1 através de um mecanismo independente de PPAR γ , o qual envolve depleção parcial de reservas de cálcio intracelular, ativação de proteína quinase R (PKR), bem como estímulo da degradação proteassomal das ciclinas D1 e D3. Além destes, existem outros mecanismos (independente de PPAR γ) os quais as TZDs exercem efeitos antitumorais os quais incluem aumento de expressão de PTEN/AMPK e diminuição da expressão da cascata de sinalização Akt/mTOR/p70S6 (PAL, JOSHI e RAMAA, 2014).

É conveniente citar que agonistas totais de PPAR γ promovem efeitos colaterais adversos tais como hepatotoxicidade, retenção de líquidos e problemas cardiovasculares (DANIEL, 2000). Ainda não se sabe como ocorre o referido perfil citotóxico, porém estudos apontam que modificações no grupo farmacofórico podem acarretar numa diminuição de tais efeitos adversos (WILLIAMS E LENKE, 2005), já que o anel tiazolidínico como grupo toxicofórico, estando relacionado com a formação de quatro metabólitos reativos (SAHA *et al.*, 2010). Posteriormente, alguns estudos também indicaram que o perfil citotóxico estava relacionado a atividade agonista total de PPAR γ . Neste contexto, surgiu a teoria de que os efeitos adversos de agonistas totais de PPAR γ podem ser mitigados através do uso de agonistas parciais (CHOI *et al.*, 2010). Sabe-se que os agonistas parciais de PPAR γ atuam através de um mecanismo independente da hélice 12 α (domínio de ligação com o ligante, hélice C-terminal dos receptores nucleares), diminuindo a atividade transcricional e gerando menos efeitos colaterais (GUASCH *et al.*, 2012).

No intuito de contornar os problemas com a alta citotoxicidade, pesquisadores optaram por sintetizar compostos contendo anéis de oxazol-5-ona mapeando-os com base em seus perfis citotóxicos. Oxazol-5-onas são conhecidas como drogas terapeuticamente versáteis atuando como inibidores de desidrogenase (SUTIN *et al.*, 2007), imunomoduladores (MESAIK *et al.*, 2004), anti-angiogênicos (PERRON *et al.*, 2002) e antitumorais (PAL, JOSHI e RAMAA, 2014).

Os efeitos colaterais associados as TZD já foram descritos em alguns estudos anteriores (VILLACORTA *et al.*, 2009; SCHWARTZ *et al.*, 2006). Sabe-se que o anel tiazolidínico promove a oxidação da glutatona originada como metabólito, o que é considerado o principal fator no que se refere a citotoxicidade. A inclusão do núcleo oxazolidínico como grupo farmacofórico constitui uma alternativa plausível, mantendo a configuração eletrônica da molécula, já que o átomo de oxigênio presente no anel

oxazolidínico substitui o átomo de enxofre presente no anel tiazolidínico, evitando a formação da glutatona, reduzindo as chances de gerar metabólitos tóxicos para a célula.

Oxazolidin-5-onas apresentaram-se significativamente ativas quando testadas em células de linhagem de câncer de mama (MCF-7). Alguns compostos apresentaram atividade contra câncer de nasofaringe (células KB), leucemia (K562), câncer oral (GURAV), ovário (Ovkar-3) e fígado (HepG2). De acordo com os autores do estudo, o composto que apresentou alta especificidade contra as células de câncer de mama, também apresentou capacidade de estimular adipogênese, e que testes estão sendo realizados com modificações moleculares com a adição e grupamentos retiradores e doadores de elétrons no intuito de verificar mais a fundo as propriedades desta frente ao câncer de mama, podendo ainda ser utilizada conjuntamente com outras drogas já existentes para desencadear uma resposta mais eficiente no combate ao câncer.

O acúmulo de ceramida durante os processos iniciais do estágio de apoptose é observado como um fator relevante na indução do processo de morte celular. (HANNUN, 1994). Dentre todos os metabólitos, a ceramida constitui-se como uma das moléculas mais importantes como mensageiro secundário das vias de sinalização dos esfingolípídios, sendo conhecida por induzir apoptose, senescência e parada do ciclo celular em alguns tipos de câncer em humanos (WEBB, ARNHOLT e VENABLE, 2010; BOURBON, SANDIRASEGARANE e KESTER, 2009). Singh e colaboradores (2011), sintetizaram análogos heterocíclicos de ceramida contendo atividade apoptótica da ceramida tradicional. Para isto, sintetizaram análogos de ceramida contendo um anel com oxazolidin-2-ona em sua estrutura, os quais foram desenhados com uma combinação de um álcool primário na posição C1 e o nitrogênio da amida na posição em C2 da ceramida juntos pelo grupo carbonil adicional (HA *et al.*, 2006). A presente conformação foi deduzida através de observações iniciais de que haveriam fortes interações entre os hidrogênios alcoólicos e os nitrogênios da amida (REREK *et al.*, 2001). Em determinado composto, constatou-se que o grupo hidroxil primário do substrato natural ligou-se com o anel oxazolidínico, o que pode ter sido responsável pelo bloqueio da perturbação metabólica a qual ocorre no grupo hidroxil na posição C1 da estrutura esfingoide. O referido análogo foi capaz de manter a mesma conformação do sistema que contém o álcool alílico, o qual funciona como substrato natural que consiste em um elemento chave para a atividade biológica através da geração de espécies reativas de oxigênio (REYNOLDS, MAURER e KOLESNICK, 2004; JARVIS *et al.*, 1996). Estudos demonstram que compostos contendo 3-alcalonil ou benzoil-4-(1-hidroxi-2-enil)-

oxazolidin-2-onas como análogos heterocíclicos de ceramida apresentam-se bioativos frente a células de linhagem de leucemia HL-60 (SINGH *et al*, 2011). Células de leucemia humana HL-60 tratadas com 20 μ M de cada análogo oxazolidinônico por 16 horas onde moléculas contendo substituintes tais como propionil, ciclopentanoil e *p*-nitrobenzil-4-(1-hidroxihexadec-2-enil)-oxazolidin-2-onas apresentaram melhores atividades antileucêmicas do que a C2-Cer natural com boa correlação entre morte celular e fragmentação do DNA.

3 METODOLOGIA

3.1 PARTE QUÍMICA

3.1.1 Materiais e equipamentos

Para a síntese dos novos derivados tiooxazolidinônicos LPSF/NBMs foram necessários os seguintes materiais: A cromatografia em camada delgada foi realizada em placa Merck silicagel 60 F254, de 0,25 mm de espessura, reveladas em luz ultravioleta (254 nm). Todos os reagentes e solventes que foram utilizados na síntese dos compostos e para suas análises pertencem as marcas Sigma Aldrich, Merck, Vetec ou Quimis. Os equipamentos utilizados na síntese e caracterização estrutural das referidas moléculas são: Espectrofotômetro de Absorção no Infravermelho - FTIR Bruker Modelo IFS 66; HPLC Bruker; Determinação dos pontos de fusão – Buchi M-560; Lâmpada de Ultravioleta; Rota evaporador – Buchi; Placas Merck silicagel 60 F254, de 0,25 mm de espessura, reveladas em luz ultravioleta (254 nm).

Todos os reagentes e produtos químicos foram obtidos de maneira comercial através de diferentes fabricantes. As reações foram monitoradas através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e quando necessário, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os espectros de ^1H RMN foram medidos em Equipamento Bruker® 300, usando SiMe_4 (TMS) como padrão interno. Os deslocamentos químicos são dados em δ (ppm). O solvente deuterado utilizado foi CDCl_3 . Padrões de desdobramento foram designados como segue: s = simpleto, d = duplete, dd = duplo duplete, t = tripleto, dt = duplo tripleto, q = quarteto, m = multipleto.

3.1.2 Reagentes e solventes

A seguir encontram-se listados os reagentes utilizados em todos os experimentos químicos realizados no LPSF bem como seus fabricantes, pureza e número de registro *Chemical Abstracts Service* (CAS).

Tabela 1- Reagentes utilizados na síntese dos novos derivados oxazolidinônicos.

Reagente	Fabricante	Pureza	CAS
4-NO ₂ (IP-13)	Sigma-Aldrich	98%	555-16-8
3-indol (IP-19)	Sigma-Aldrich	97%	487-89-8
3-Br (IP-25)	Sigma-Aldrich	97%	3132-99-8
3,4,5-OCH ₃ (IP-26)	Sigma-Aldrich	98%	86-82-7
3-Br, 4-OCH ₃ (IP-47)	Sigma-Aldrich	98%	34841-06-0
4-CF ₃ (IP-57)	Sigma-Aldrich	98%	455-19-6
4-OCF ₃ (IP-58)	Sigma-Aldrich	96%	659-28-9
4-SCH ₃ (IP-90)	Sigma-Aldrich	95%	3446-89-7
9-antracênol (IP-92)	Merck	-	642-31-9
4-CN (IP-93)	Sigma-Aldrich	95%	105-07-7
10-cloro-antracênol (IP-94)	Sigma-Aldrich	97%	10527-16-9
4-Br, 2-OCH ₃ (IP-95)	Sigma-Aldrich	97%	43192-33-2
4-CH(OEt) ₂ (IP-96)	Sigma-Aldrich	97%	81172-89-6
3-etil-2-tioxooxazolidin-4-ona	Sigma-Aldrich	97%	10574-66-0
EtOH	Merck	99,9%	64-17-5
Dimetilformamida (DMF)	Sigma-Aldrich	99,8%	68-12-2
Acetonitrila (ACN)	Merck	99,9%	75-05-8
Tolueno	Sigma-Aldrich	99,5%	108-88-3

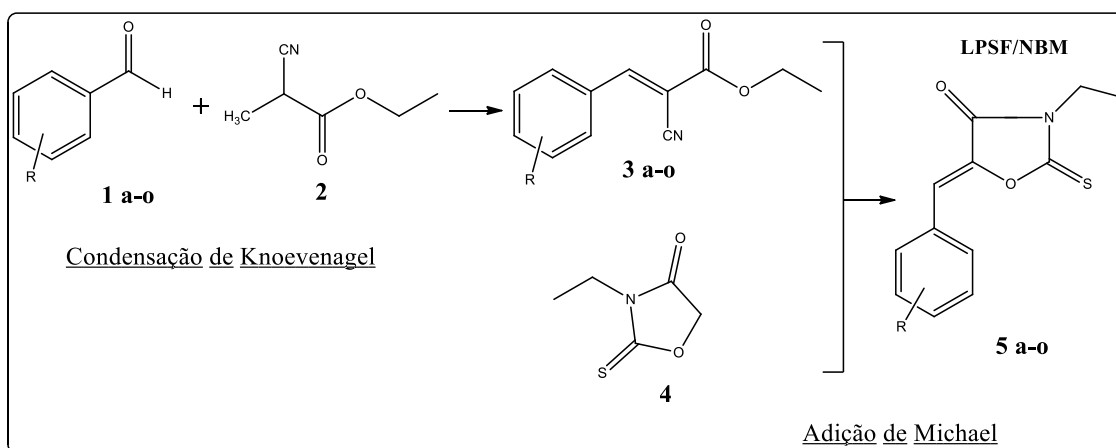
Trietilamina	Sigma-Aldrich	99,5%	121-44-8
Morfolina	Sigma-Aldrich	99%	110-91-8
Ácido acético glacial	Sigma-Aldrich	99%	64-17-9
Acetato de amônio	Sigma-Aldrich	99%	631-61-8

Fonte: Autor, 2017.

3.2 ESTRATÉGIA SINTÉTICA 1: OBTENÇÃO DA SÉRIE LPSF/NBM ATRAVÉS DE DUAS ETAPAS

A rota de síntese proposta para a obtenção da série LPSF/NBM foi inicialmente descrita baseada na expertise do grupo de pesquisa utilizando duas etapas: A primeira consiste na condensação de Knoevenagel a fim de sintetizar intermediários (ésteres cianocinâmicos da série LPSF/IPs) e posteriormente a adição de Michael como etapa final com objetivo de gerar as 15 moléculas finais (série LPSF/NBM) utilizando os intermediários substituídos oriundos da etapa anterior com a 3-etil-2-tioxooxazolidin-4-ona obtida de maneira comercial. O esquema pode ser visualizado a seguir:

Esquema 1- Rota de síntese inicialmente proposta para obtenção dos novos derivados oxazolidinônicos.



Fonte: Autor, 2017.

As reações foram realizadas em balões de fundo redondo com duas bocas de 250 mL sob agitação magnética adaptado a um condensador. Foram adicionadas quantidades equimolares de aldeído aromático substituído (1 a-o) e cianoacetato de etila (2) na presença de morfolina como catalisador e tolueno como solvente. A mistura reacional foi aquecida sob refluxo a 110°C durante 4 horas. Ao final da reação os produtos LPSF/IP (3 a-o) foram removidos através de um rotaevaporador giratório e filtrados com papel de filtro. Os cristais foram então transferidos para o interior de dessecadores contendo sílica gel. Após a completa secagem dos produtos, os mesmos foram transferidos para frascos âmbar devidamente identificados para pesagem e cálculo do rendimento da reação.

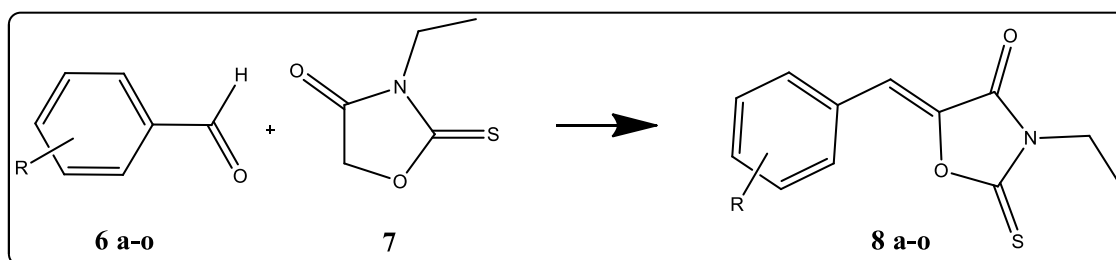
Em seguida, partiu-se para a síntese dos produtos finais LPSF/NBM (5 a-o) através da reação de adição de Michael. Adicionou-se quantidades equimolares de 3-etil-2-tioxooxazolidin-4-ona (4) e os ésteres cianocinâmicos da série LPSF/IP (3 a-o), variando o substituinte. Utilizou-se acetonitrila (ACN) como solvente (10 mL) e 5-8 gotas de morfolina como catalisador. A reação foi conduzida sob refluxo e agitação à temperatura de 50°C por 4h. Foram feitas Cromatografias de Camada Delgada (CCD) a cada hora, utilizando como fase móvel o sistema de sete partes de hexano para três de acetato de etila (H:A 7:3), no intuito de verificar a formação dos produtos finais. Em seguida, a reação foi levada ao rotaevaporador para remoção da ACN, a 40°C e pressão de 60 mbar. Após a remoção do solvente, realizou-se uma recristalização com etanol em placa a 60°C e subsequente filtração. Com o precipitado formado, os produtos foram transferidos ao dessecador contendo sílica gel para armazenamento. Os produtos foram pesados e guardados em frascos âmbar para posterior caracterização e cálculo do rendimento reacional.

3.3 ESTRATÉGIA SINTÉTICA 2: OBTENÇÃO DA SÉRIE LPSF/NBM ATRAVÉS DE ETAPA ÚNICA

O procedimento geral para a obtenção dos produtos finais LPSF/NBM (8 a-o) deu-se através da mistura equimolar entre benzaldeídos substituídos (6 a-o) e 3-etil-2-tioxooxazolidin-4-ona (7). Utilizou-se 4 mL/mmol de ácido acético glacial como solvente e

acetato de amônio (2 equiv.) como promotor da reação (esquema 2). A massa de partida de todas as reações variou entre 0,5 g (3,4 mmol) e 0,8 g (5,5 mmol). A mistura reacional foi aquecida a 120°C sob agitação e refluxo por 4 horas. Após resfriamento, os cristais foram naturalmente precipitados dentro do balão e então lavados com dH₂O e etanol absoluto. Na sequência, filtrou-se o precipitado com auxílio de um papel de filtro de 80 g/m².

Esquema 2- Condensação de Knoevenagel



Fonte: Autor, 2017.

3.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.4.1 Materiais e equipamentos

As células do sangue periférico foram isoladas de acordo com o método de centrifugação em Ficoll-Hypaque (GE Healthcare). As células foram contadas numa câmara de Neubauer e sua viabilidade foi determinada pelo método de exclusão azul tripan. A porcentagem de células marcadas foi então analisada por citometria de fluxo usando um citômetro de fluxo Accuri C6 (Becton, Dickinson e Company, Franklin Lakes, NJ, EUA) e a análise de dados foi realizada por meio do software Accuri C6 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA).

3.4.2 Linhagem e cultivo celular

A citotoxicidade dos compostos foi testada em cinco linhagens de células tumorais humanas, foram elas: HL-60 (leucemia promielocítica aguda), MOLT-4 (leucemia linfoblástica aguda) K562 (leucemia mieloide crônica), PC3 e DU145 (próstata). O ensaio de PBMC foi realizado através da obtenção de células mononucleares de sangue periférico advindas de voluntários sadios os quais se abstiveram do uso de medicação crônica e/ou ingestão de álcool nas últimas 72h. Todas as linhagens celulares foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meios RPMI-1640 (HL-60, MOLT-4 e K562), F12 (PC3) e DMEN *low glucose* (DU145) suplementado com 10% de soro fetal bovino, glutamina 2 mM, estreptomicina a 100 mg/mL, e 100 U/mL de penicilina a 37°C numa solução umidificada a atmosfera de 5% de CO₂. As células foram mantidas a 37°C contendo 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino. A troca de meio foi realizada sempre que necessário para manter a viabilidade celular.

3.4.3 Ensaio de citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade, foi utilizado o método de MTT, que consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio (MTT) em azul de formazan, essa conversão é feita partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. As células foram plaqueadas em concentrações variáveis seguindo o protocolo internacionalmente padronizado pela *National Cancer Institute* (NCI-60) (tabela 2) e em seguida foram adicionados em triplicata o composto testado nas concentrações de 1, 10, e 100 µM. As placas foram então incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ e a 37°C. Ao término deste período, foram adicionados 20 µL de MTT e as placas foram novamente incubadas, permanecendo por mais três horas. Logo após esse período foi aplicado 130 µL de SDS a 20%, com o objetivo de solubilizar os cristais formados pelas células viáveis. A absorbância foi lida após o período de 24 horas em leitora de placas (EL808, Biotek, EUA), no comprimento de onda de 570 nm.

Cada dosagem de composto foi feita em triplicata, e a média da viabilidade de cada experimento foi calculada com base no valor obtido para o controle contendo DMSO a 0,1%.

Tabela 2- Concentrações de células tumorais com base no NIC-60.

Linhagem	Número de células
HI-60	4×10^4
MOLT-4	3×10^4
K562	5×10^3
PC-3	$7,5 \times 10^3$
DU145	1×10^4

Fonte: Autor, 2017.

3.4.4 Efeito dos novos derivados oxazolidinônicos no ciclo celular

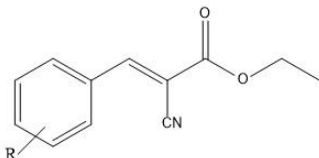
Utilizou-se solução de Iodeto de propídio (PI) a qual foi feita com 20 mL de PBS, 20 µL de triton X-100 (0,1 % v/v), 200 µL de 20 mg/mL de RNase A (Cf = 200 µg/mL). Em seguida as células foram separadas e lavadas com PBS e ressuspensas em 1 mL de etanol 70% por duas horas a temperatura ambiente ou por até 20 dias a -20°C. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 2800 rpm e descartou-se o etanol, vertendo-os. Foram realizadas duas novas lavagens com PBS seguida de nova ressuspensão em 200 µL de solução PI. Em seguida as células foram encubadas por 30 minutos a temperatura ambiente a 37°C sob abrigo da luz. Por fim, realizou-se uma nova centrifugação e ressuspensão em 200-400 µL de PBS. O conteúdo foi analisado usando um citômetro de fluxo Accuri C6 (Becton, Dickinson e Company, Franklin Lakes, NJ, EUA). O perfil do ciclo celular foi posteriormente analisado usando o software Accuri C6 (Becton, Dickinson e Company, Franklin Lakes, NJ, EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTRATÉGIA SINTÉTICA 1: OBTENÇÃO DA SÉRIE LPSF/NBM EM DUAS ETAPAS

Na presente seção encontram-se os resultados referentes a metodologia inicialmente proposta para a síntese da série LPSF/NBM a qual utiliza duas etapas, passando necessariamente pela síntese de produtos intermediários ésteres de Cope da série LPSF/IP substituídos (quadro 1). Justifica-se a utilização deste método com base na expertise do grupo de pesquisa do LPSF como estratégia para a obtenção de derivados oxazolidinônicos bem como moléculas de outras séries, tais como derivados tiazolidinônicos e imidazolidinônicos, as quais já foram obtidas com a utilização de produtos intermediários em suas respectivas rotas de síntese em outras oportunidades.

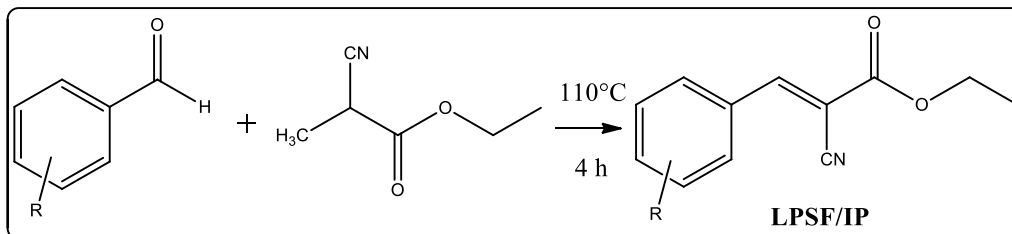
Quadro 1- Ésteres de Cope e seus substituintes sintetizados no LPSF.

	R	Código LPSF	R	Código LPSF
	4-NO ₂	LPSF IP-13	4-OCF ₃	LPSF IP-58
	4-(NCH ₃) ₂	LPSF IP-16	4-SCH ₃	LPSF IP-90
	3-indol	LPSF IP-19	9-antracenil	LPSF IP-92
	2-OCH ₃ , 5-Br	LPSF IP-23	4-CN	LPSF IP-93
	3-Br	LPSF IP-25	10-Cl-antracenil	LPSF IP-94
	3,4,5-OCH ₃	LPSF IP-26	4-Br, 2-OCH ₃	LPSF IP-95
	3-Br, 4-OCH ₃	LPSF IP-47	4-CH(OEt) ₂	LPSF IP-96
	4-CF ₃	LPSF IP-57	-----	-----

Fonte: Autor, 2016

A proposta sintética (esquema 3) foi baseada no mecanismo de condensação de Knoevenagel utilizando 1 equivalente molar de cianoacetato de etila e diferentes benzaldeídos substituídos. Foi proposta a síntese de 15 moléculas intermediárias da série LPSF/IP as quais originam, após a realização da segunda etapa, as 15 moléculas finais da série LPSF/NBM.

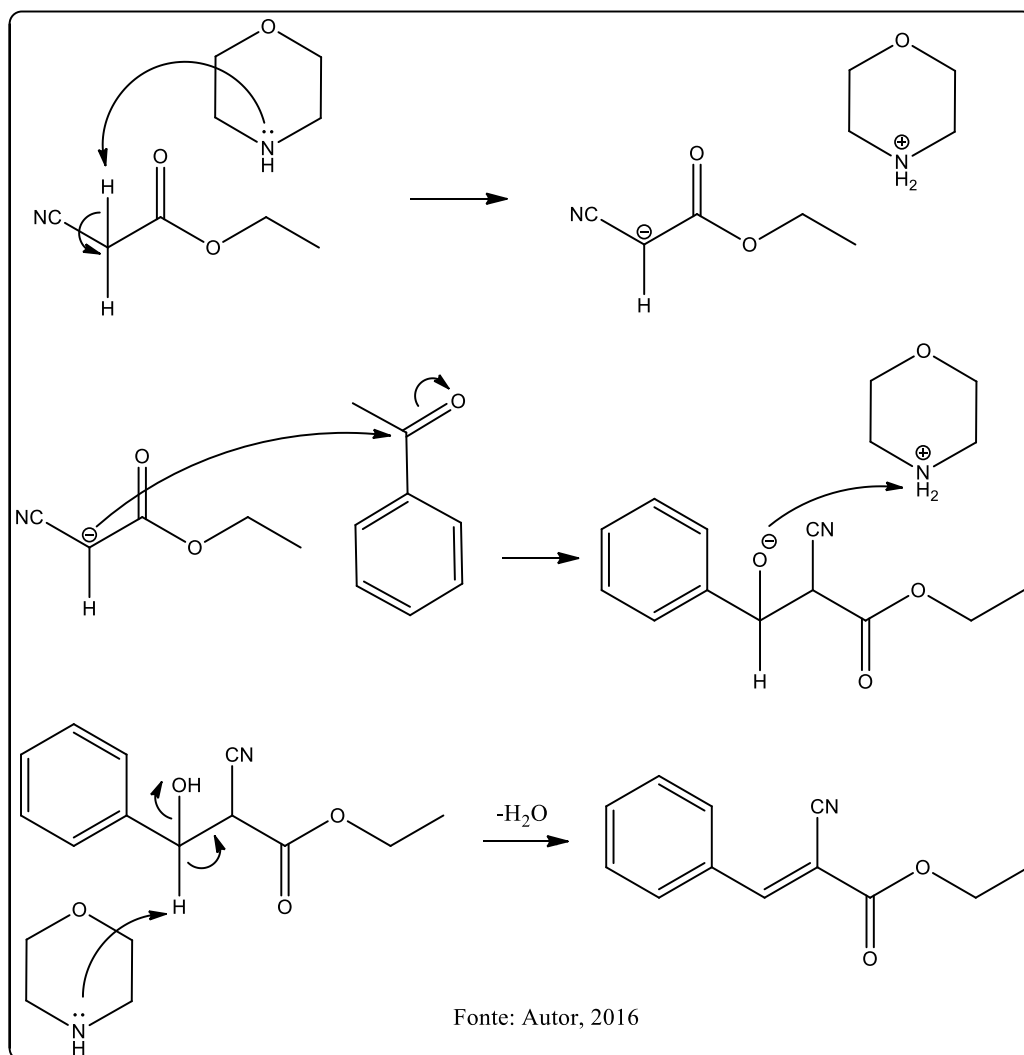
Esquema 3- Síntese de condensação de Knoevenagel para produtos intermediários



Fonte: Autor, 2017.

Derivados de aldeídos aromáticos, tais como os ésteres de Cope, são obtidos através da reação de condensação de Knoevenagel entre aldeídos aromáticos substituídos e cianoacetato de etila, em presença de uma base, no caso, morfolina. O éster cianocinâmico atua como um intermediário para as reações de adição de Michael na posição C5 da 3-etil-2-tioxooxazolidin-4-ona.

Esquema 4- Mecanismo de reação hipotético para obtenção dos ésteres de Cope



Fonte: Autor, 2016.

No mecanismo hipotético, o par de elétrons não ligantes presente no átomo de nitrogênio da morfolina ataca um dos hidrogênios ligados ao carbono α da molécula do cianoacetato de etila, capturando-o. Este processo facilita o ataque do carbono nucleófilo do cianoacetato de etila ao carbono da carbonila presente nos aldeídos aromáticos, visto que o átomo de oxigênio, por ser mais eletronegativo tende a alocar a nuvem de elétrons para si. Isto faz com que a carga parcial do carbono da carbonila fique positiva, favorecendo o ataque do carbono nucleófilo do cianoacetato. Após a formação da nova ligação, o oxigênio encontra-se com excesso de elétrons (carga formal negativa) abstraindo um dos prótons presentes na molécula do catalisador, formando então um grupamento hidroxila. A molécula da morfolina

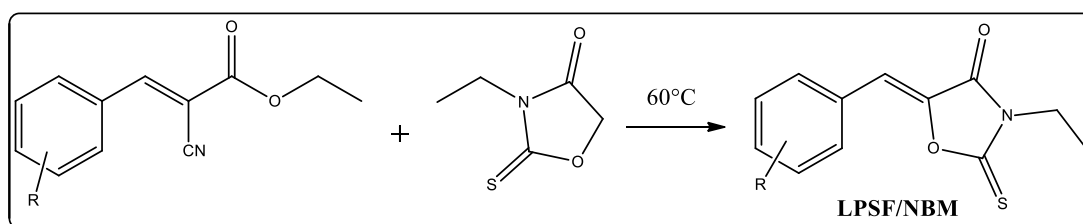
volta a apresentar o par de elétrons não ligantes no átomo de nitrogênio, abstraindo o hidrogênio do carbono β do cianoacetato de etila. Este ataque favorece a formação de uma ligação α, β insaturada bem como a saída de uma molécula de água, já que a temperatura do meio reacional encontra-se a 110°C. Um dos pares de elétrons não ligantes do oxigênio do grupo hidroxila ataca um dos hidrogênios novamente presentes na molécula de morfolina e o captura, formando uma molécula de água, condensando-a. Desta forma, se obtém os ésteres de Cope, moléculas intermediárias da série LPSF/IP.

Foram utilizadas quantidades equimolares de cianoacetato de etila e aldeído aromático substituído. Utilizou-se morfolina como catalisador (exceto na síntese do IP-13 utilizou-se benzeno) e tolueno como solvente.

No mecanismo hipotético descrito, pode-se observar a formação de um íon carbânion originado através da captura de um dos prótons do carbono adjacente ao grupamento cianeto pela morfolina. Ocorre então uma adição nucleofílica de um carbânion ao grupo carbonila, cujo carbono encontra-se parcialmente positivo devido a maior eletronegatividade do átomo de oxigênio, favorecendo o ataque nucleofílico. Em seguida ocorre uma reação de desidratação, onde uma molécula de água é eliminada através da alta temperatura (110°C) e a dupla ligação é estabelecida, originando os ésteres de cope, as moléculas da série LPSF/IP.

A seguir, a segunda etapa de síntese foi realizada a fim de se obter os novos derivados oxazolidinônicos (LPSF/NBM) através de uma reação de adição de Michael entre ésteres de Cope aromáticos substituídos e 3-etil-2-tioxoxazolidin-4-ona obtida de maneira comercial, na presença de morfolina. Acetonitrila foi utilizada como solvente. Nesta reação, o éster cianocinâmico atua como um intermediário para as reações de adição de Michael na posição 5 da 3-etil-2-tioxoxazolidin-4-ona conforme o esquema a seguir.

Esquema 5- Síntese de adição de Michael

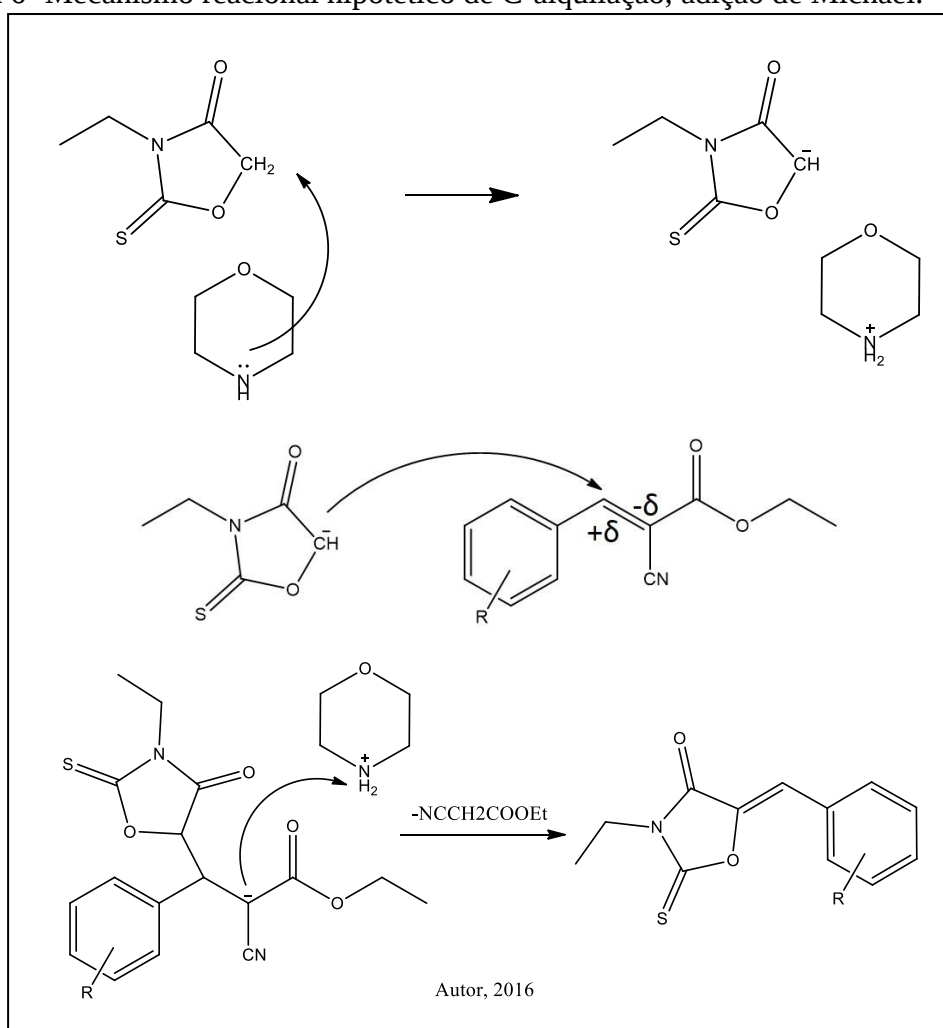


Fonte: Autor, 2017.

Dentre as 15 moléculas propostas no presente trabalho utilizando a referida metodologia (estratégia sintética 1) a qual emprega duas etapas, apenas LPSF/NBM-9 e

LPSF/NBM-10 apresentaram-se viáveis para utilização nos ensaios biológicos subsequentes. A comprovação estrutural foi realizada através de ^1H e ^{13}C RMN. Contudo, o método apresentou baixo rendimento quando comparado ao de única etapa. As demais moléculas da série LPSF/NBM não apresentaram espectros condizentes com suas respectivas estruturas e também apresentaram um baixo rendimento, justificando a escolha pelo método de condensação de Knoevenagel através de etapa única para a síntese dos novos 15 derivados oxazolidinônicos (tratado na seguinte seção).

Esquema 6- Mecanismo reacional hipotético de C-alkilação, adição de Michael.



Fonte: Autor, 2016.

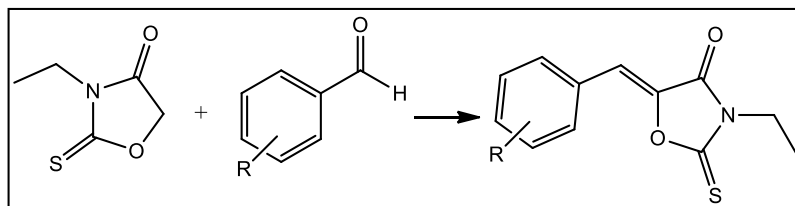
No mecanismo hipotético, o par de elétrons não ligantes presente no átomo de nitrogênio da morfolina ataca um dos hidrogênios ligados ao carbono situado na posição 5 da molécula da 2-tio-oxazolidinona, capturando-o, formando um nucleófilo. Este, por sua vez

irá atacar o carbono α , β insaturado presente nos ésteres de Cope, que, devido à ressonância de elétrons, propicia o ataque nucleófilo quando a carga encontra-se parcialmente positiva ($+\delta$). Ocorre então a formação da ligação C-C. Após a alquilação, o carbono adjacente ao grupamento nitrila, que encontra-se ainda nucleófilo, atacará um dos hidrogênios presentes na morfolina. Ocorrerá a quebra da ligação que mantinha o éster cianocinâmico unido ao complexo, promovendo o reestabelecimento da α , β insaturação e a saída do grupamento éster e cianeto. O catalisador é reestabelecido e são formados os novos derivados oxazolidínicos. Dentre todos os intermediários propostos a serem sintetizados através da reação de condensação de Knoevenagel, a síntese ocorreu como esperado para 14 moléculas. A única divergência apresentada foi em relação ao composto LPSF/IP-13, contendo o substituinte 4-nitrobenzaldeído, o qual apresentou sinais de degradação através do protocolo de síntese padrão, utilizando morfolina como catalisador, refluxo, temperatura e tolueno como solvente. Para a síntese do referido cianoacrilato de etila foram utilizadas quantidades equimolares de cianoacetato de etila e 4-nitrobenzaldeído. A reação ocorreu sem refluxo e sob agitação à temperatura ambiente e durou aproximadamente dois minutos e meio. Foi observada a alteração da cor do meio reacional logo após a adição de 8 gotas de trietilamina. Esta reação foi a única a utilizar benzeno como solvente.

4.2 ESTRATÉGIA SINTÉTICA 2: OBTENÇÃO DA SÉRIE LPSF/NBM EM ETAPA ÚNICA

Uma proposta sintética baseada no mecanismo da Condensação de Knoevenagel foi desenvolvida. Esta metodologia foi reproduzida a partir de um estudo proposto por Harada *et al.*, 2012 e apresentou-se como a mais viável, econômica e eficaz. As condições reacionais foram adaptadas no intuito de promover um melhor rendimento e um menor tempo de reação. A proposta sintética para obtenção dos novos derivados oxazolidinônicos encontra-se esquematizada a seguir:

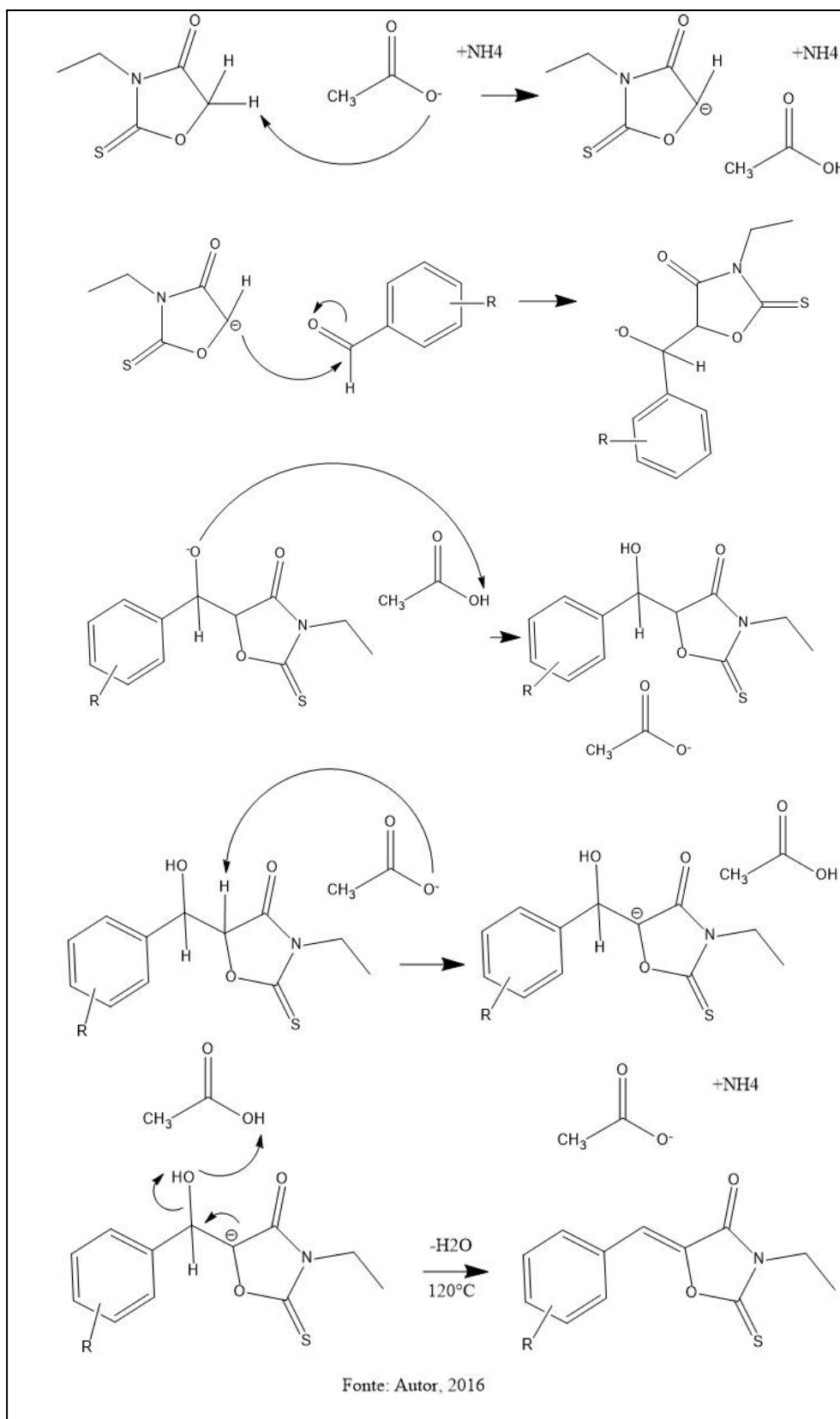
Esquema 7- Esquema sintético baseado na condensação de Knoevenagel



Fonte: Autor, 2016.

A execução da referida estratégia justifica-se como alternativa ao insucesso da metodologia descrita anteriormente na seção prévia a qual constava de duas etapas. Desta forma, a síntese orgânica em etapa única foi adotada como principal estratégia a fim de se obter as moléculas alvo do presente estudo. A seguir encontra-se descrito o provável mecanismo de reação referente ao esquema 7.

Esquema 8- Mecanismo hipotético de condensação

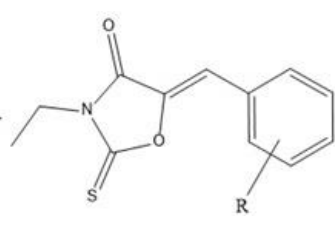


Fonte: Autor, 2016.

No mecanismo hipotético (esquema 8), o carbono da posição 5 do anel tiooxazolidínico é desprotonado através do oxigênio detentor de carga formal negativa advindo do acetato de amônio, que em solução, se converte em acetato. Desta forma, o carbono da posição 5 do anel tiooxazolidínico torna-se nucleófilo, atacando o carbono da carbonila presente nos benzaldeídos substituídos (quadro 2).

O promotor acetato de amônio em ácido acético glacial dissocia-se gerando uma base a qual irá abstrair um dos hidrogênios localizados no carbono da posição 5 do anel oxazolidinônico. Desta forma, irá ocorrer a formação de um carbono nucleófilo que por sua vez irá atacar o carbono da carbonila situado nos aldeídos aromáticos, formando a ligação C-C e a estrutura básica da molécula-alvo. Os elétrons serão alocados no oxigênio da carbonila através do efeito mesomérico. Este oxigênio rico em elétrons irá capturar o próton ligado ao oxigênio do promotor acetato, deixando-o novamente rico em elétrons. O oxigênio nucleófilo irá atacar o outro hidrogênio restante posicionado em C5 no anel pentamérico, gerando um nucleófilo. Esta carga negativa será deslocada, dando origem a uma dupla ligação e provocando a saída de uma molécula de H₂O, devido a temperatura de 120°C. Forma-se então as moléculas da série LPSF/NBMs substituídas.

Quadro 2- Novos derivados oxazolidinônicos* originados de benzaldeídos substituídos sintetizados no LPSF.

	R	Código LPSF	R	Código LPSF
	5-Br, 2-OCH3	LPSF NBM-1	4-NO2	LPSF NBM-11
	3-Br	LPSF NBM-2	4-OCF3	LPSF NBM-12
	3,4,5-(OCH3)3	LPSF NBM-3	9-antraceno	LPSF NBM-16
	3-Br, 4-OCH3	LPSF NBM-4	4-CN	LPSF NBM-17
	4-(OEt-CH3)2	LPSF NBM-7	10-Cl-antraceno	LPSF NBM-18
	4-Br, 2-OCH3	LPSF NBM-8	4-CF3	LPSF NBM-19
	4-N(CH3)2	LPSF NBM-9	3-indol	LPSF NBM-20
	4-SCH3	LPSF NBM-10		

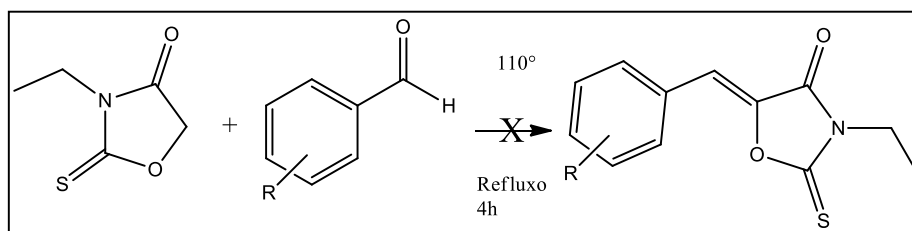
Fonte: Autor, 2016.

*Em moléculas/substituintes grifados em negrito a síntese ocorreu como esperado.

Dentre as 15 moléculas propostas, a presente estratégia propiciou a síntese de 11 novos derivados oxazolidinônicos. Foram elas: LPSF/NBM-1, LPSF/NBM-2, LPSF/NBM-3, LPSF/NBM-4, LPSF/NBM-8, LPSF/NBM-9, LPSF/NBM-10, LPSF/NBM-11, LPSF/NBM-17, LPSF/NBM-19 e LPSF/NBM-20.

Ademais, foram realizadas algumas tentativas com objetivo de sintetizar novos derivados oxazolidinônicos através de reação de condensação de Knoevenagel, reagindo 3-etil-2-tioxoxazolidin-4-ona com aldeídos aromáticos substituídos, porém utilizando morfolina como catalisador e acetonitrila (ACN) como solvente. As reações não ocorreram como esperado (esquema 9).

Esquema 9- Esquema demonstrativo de tentativas de sintetizar a série LPSF/NBM por condensação de Knoevenagel utilizando catalisador.



Fonte: Autor, 2016.

A seguir encontra-se a tabela comparativa com os rendimentos obtidos através de ambas as estratégias sintéticas utilizadas no desenvolvimento deste trabalho. O método 1 é descrito como o método envolvendo duas etapas de síntese. O método 2 é referente a estratégia sintética em única etapa. Observa-se que o rendimento global foi de 46.6%. Em contrapartida, o rendimento global do método 2 foi de 71%. O cálculo do rendimento global foi realizado através da soma dos rendimentos de todas as reações e dividido pelo número de reações realizadas. As moléculas LPSF/NBM-17 e LPSF/NBM-20 não apresentaram rendimento algum através do método 1.

Tabela 3- Rendimentos reacionais obtidos na síntese das moléculas da série LPSF/NBM utilizando o método em duas etapas (método 1) e o método em etapa única (método 2).

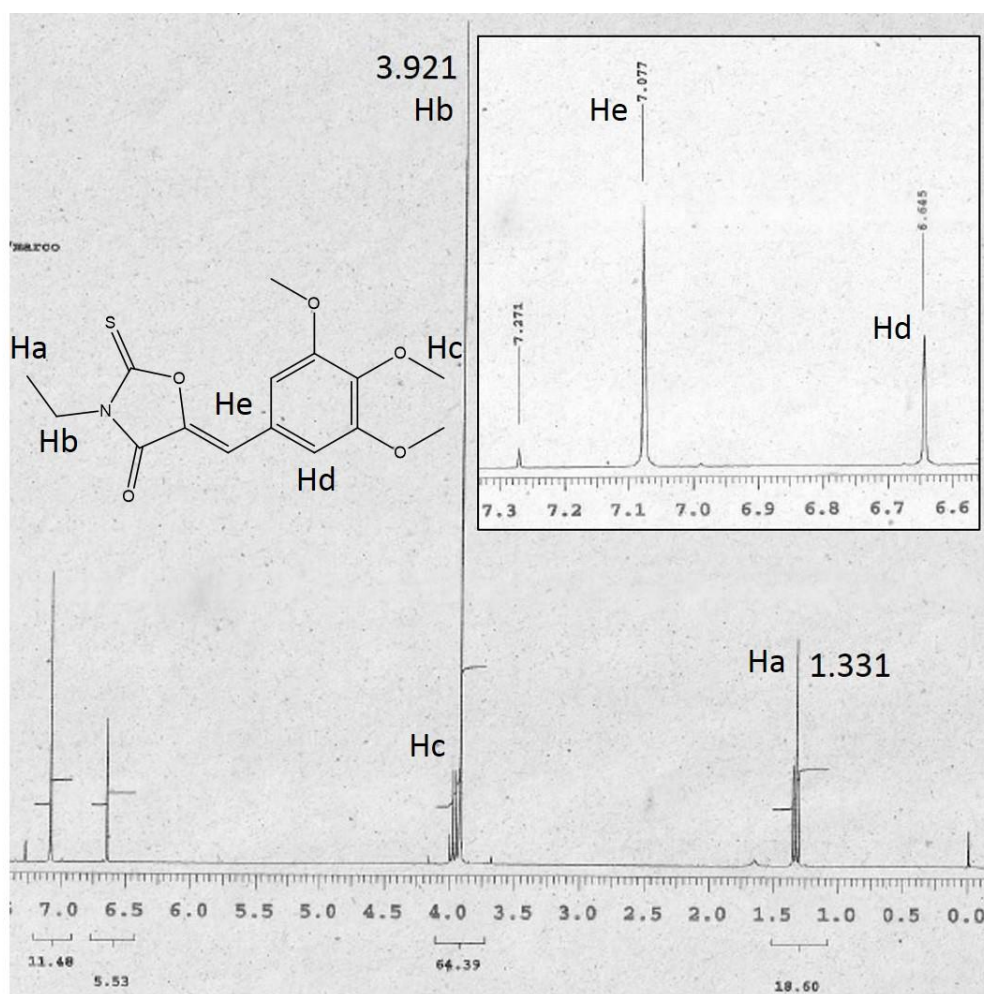
Molécula	Método 1 Rdt % (Rdt médio 46.6%)	Método 2 Rdt % (Rdt médio 71 %)
LPSF/NBM-1	58	72
LPSF/NBM-2	60	69
LPSF/NBM-3	50	72
LPSF/NBM-4	87	74
LPSF/NBM-8	37	74
LPSF/NBM-9	89	89
LPSF/NBM-10	22	72
LPSF/NBM-11	11	70
LPSF/NBM-17	-	67
LPSF/NBM-19	6	50
LPSF/NBM-20	-	76

Fonte: Autor, 2017.

4.3 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

O espectro de ^1H RMN (figura 9) comprovou a formação da estrutura do novo derivado oxazolidinônico LPSF/NBM-3, o qual foi aqui escolhido para ser analisado e discutido com base nas técnicas de elucidação estrutural realizadas no presente estudo. Pode-se observar o sinal em δ 1.33 ppm referente ao tripleto dos hidrogênios da metila (Ha). Mais adiante no espectro pode-se observar a presença do sinal δ 3.97 ppm referente aos hidrogênios dos grupamentos metoxi (Hc) diretamente ligados ao anel benzênico, bem como a presença do sinal δ 7.07 ppm, relativo ao singlete localizado no carbono da instauração da molécula (He), demonstrando que a síntese orgânica parece ter ocorrido como esperado.

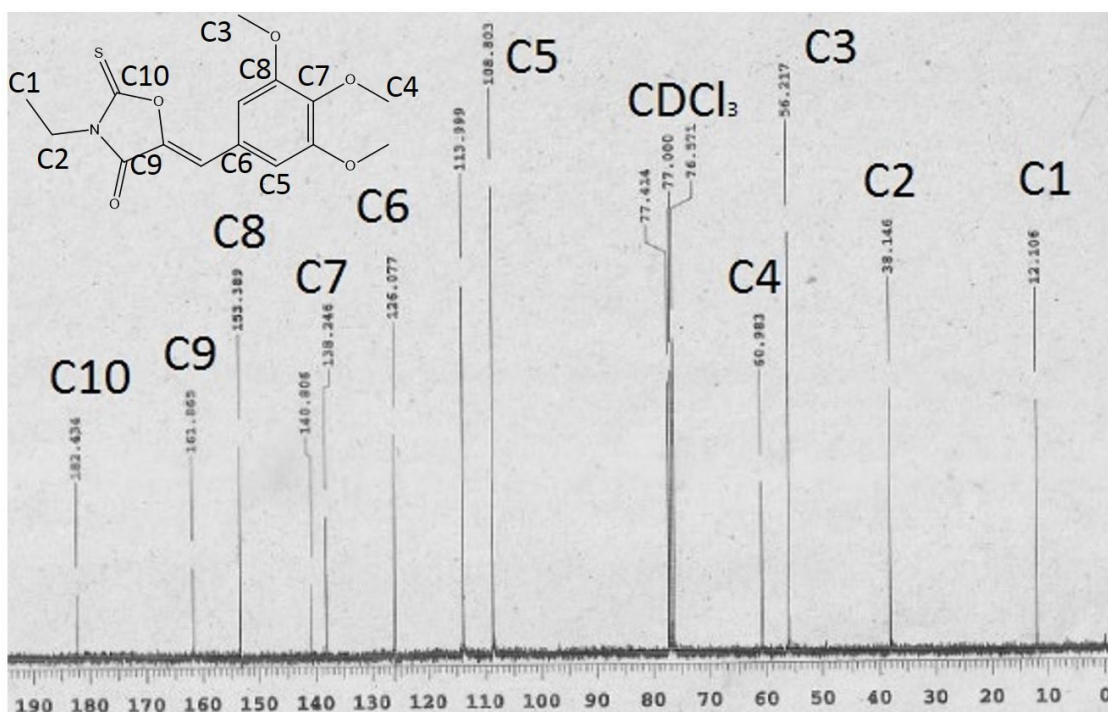
Figura 9- Espectro de ^1H RMN da molécula LPSF/NBM-3 (CDCl_3 , 300 MHz)



Fonte: Autor, 2016.

O espectro de ^{13}C RMN complementou a caracterização do composto devido à observação dos sinais: δ 38.1 ppm (carbono sp^3 do grupamento etila diretamente ligado ao N), δ 60.9 ppm (carbono sp^3 OCH_3), δ 126.07 ppm, δ 138.2 ppm e δ 153.3 ppm todos referentes a carbonos sp^2 localizados na região de aromáticos. Observa-se ainda deslocamentos químicos de valor δ 161.8 ppm e δ 182.4 ppm, os quais são referentes à carbonila ($\text{C}=\text{O}$) e a tiocarbonila ($\text{C}=\text{S}$), respectivamente.

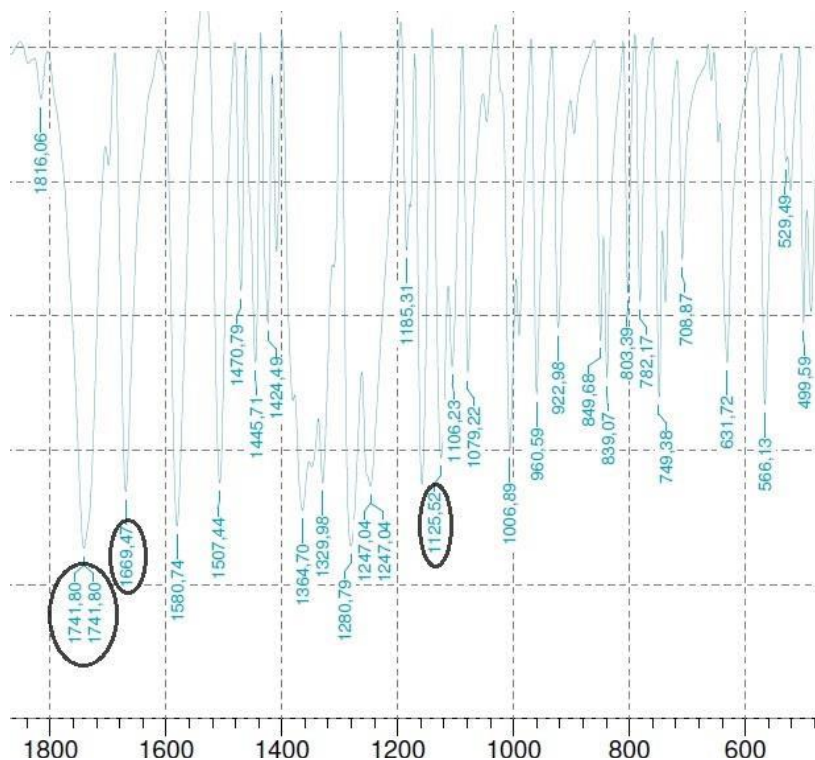
Figura 10- ^{13}C RMN da molécula LPSF/NBM-3 (CDCl_3 , 75 MHz).



Fonte: Autor, 2016.

A técnica de Infravermelho (IV) consiste numa ferramenta auxiliar para a confirmação das estruturas químicas propostas a qual se aplica de maneira qualitativa, analisando presença ou ausência de determinados grupos funcionais. Analisando os espectros de IV (figura 11), observa-se as bandas de absorção em 1741 cm^{-1} referente a presença do grupamento carbonila ($\text{C}=\text{O}$), bem como a presença da banda em 1669 cm^{-1} referente ao estiramento $\text{C}=\text{C}$ as quais conferem absorções características da estrutura em questão. Ademais, observa-se também a presença das bandas de absorção referentes aos aromáticos em 1580 e 1507 cm^{-1} , além da ligação $\text{C}=\text{S}$ em aproximadamente 1100 cm^{-1} (não destacados).

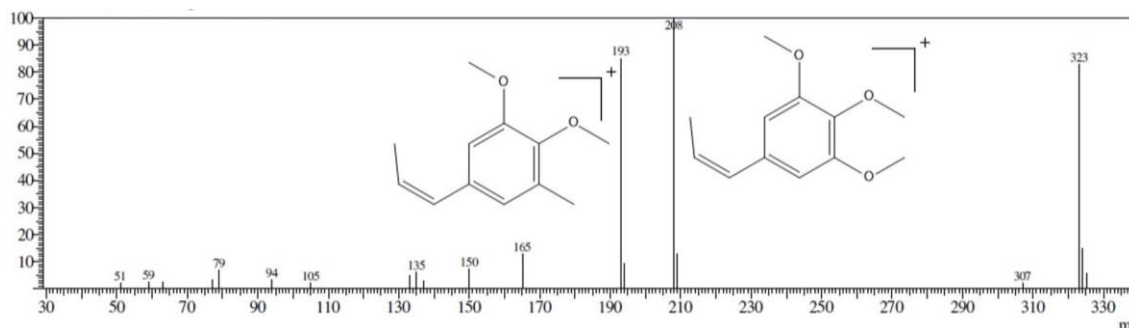
Figura 11- Espectro no infravermelho da molécula LPSF/NBM-3.



Fonte: Autor, 2016.

Em relação à Espectrometria de Massas, utilizou-se a cromatografia gasosa (GC-MS) para identificação dos compostos. Esta técnica nos permite observar com precisão a massa total dos compostos, seus íons fragmentados bem como o padrão de fragmentação molecular, já que trata-se de uma série de moléculas com mesmo grupo farmacofórico, porém contendo diferentes substituintes. Desta forma, o cromatograma disposto na figura 12 nos confirma que a massa do composto LPSF/NBM-3 apresentou-se condizente com sua respectiva estrutura ($m/z = 323$).

Figura 12- Espectrometria de massas (GC-MS) do composto LPSF/NBM-3 com seus íons fragmentados.

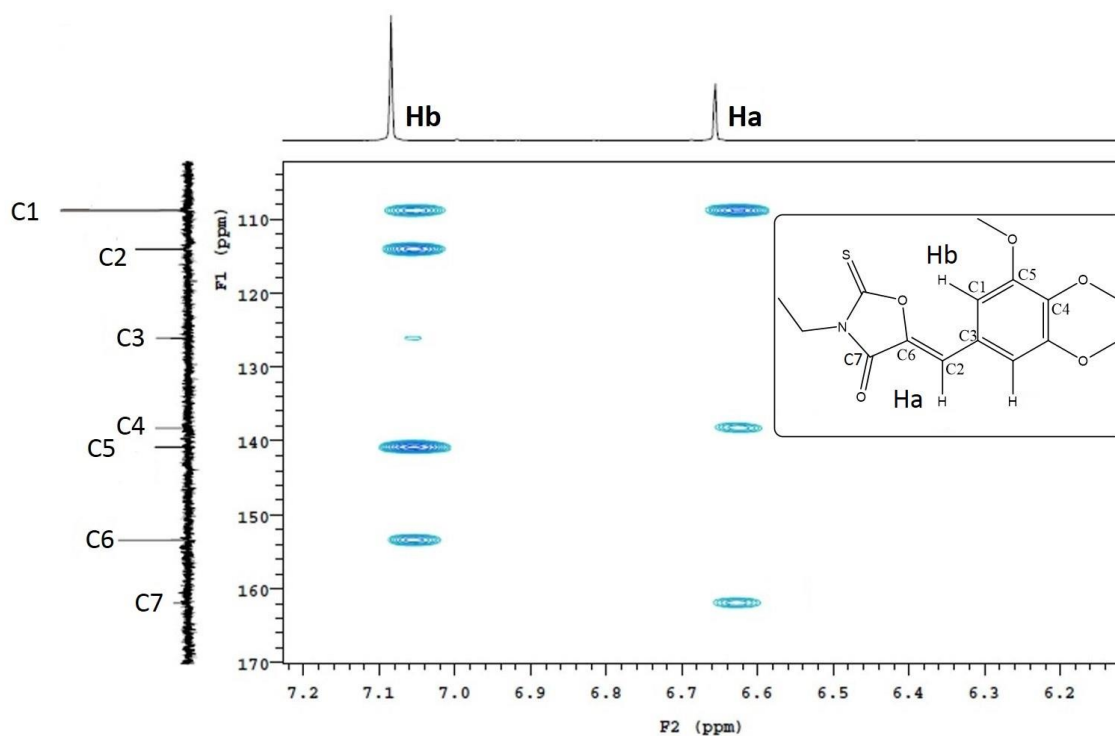


Fonte: Autor, 2016.

Observa-se ainda na imagem, os íons fragmentados com massas $m/z = 208$ e $m/z = 193$ bem como seu padrão de fragmentação, o qual apresenta-se bem característico com a quebra das ligações nos átomos mais eletronegativos (no caso, oxigênio) o que é explicado pelo método de ionização utilizado, que foi o de impacto de elétrons. A comparação entre os fragmentos 208 e 193 ilustra o exemplo.

Ademais, foi realizado um experimento de RMN 2D o qual envolve transições múltiplo-quânticas denominado *Heteronuclear MultipleBond Coherence* (HMBC) cuja finalidade é analisar o acoplamento de longas distâncias entre carbono-próton. Através deste experimento de RMN bidimensional foi possível comprovar a estrutura dos novos derivados oxazolidinônicos através da verificação de acoplamentos específicos entre carbono e hidrogênio localizados na molécula. A figura abaixo demonstra a correlação entre os hidrogênios Ha e Hb com os diferentes carbonos C1, C2, C3, C4, C5 e C6. Observa-se que a intensidade dos sinais (em azul) no espectro 2D é mais intensa quando ocorre a correlação heteronuclear de 3 ligações $^3J_{C,H}$ quando comparada aos sinais representando correlações de 2 ligações $^2J_{C,H}$.

Figura 13- Espectro de RMN 2D da molécula LPSF/NBM-3.



Fonte: Autor, 2016.

A análise dos dados obtidos por ^1H RMN nos permitiu analisar a estereoquímica relativa dos substituintes presentes nos novos derivados oxazolidinônicos. Após a reação de alquilação, é possível que as moléculas dos derivados oxazolidinônicos apresentem diferentes formas configuracionais, E ou Z. Analisando a correlação de acoplamentos a longas distâncias bem como o deslocamento químico do hidrogênio situado no carbono insaturado, podemos inferir que o valor de $\delta = 6.64$ ppm aparece deslocado mais para o campo alto provavelmente pelo efeito anisotrópico exercido pelo grupamento carbonila no ambiente químico do dieno. Desta forma, sugerimos que a estereoquímica relativa dos substituintes dos novos derivados oxazolidinônicos esteja na configuração E, contudo, um estudo envolvendo a técnica de cristalografia fosse mais adequado para confirmar a referida inferência.

4.4 RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE

O estudo sobre a relação estrutura-atividade constitui-se como uma importante ferramenta para a descoberta de novas drogas bioativas, podendo ser aplicada desde o início do planejamento molecular até mesmo promovendo pequenas modificações a fim de alcançar a otimização de alguma propriedade ou atividade molecular em sua fase final. Dentre as alternativas de modificações moleculares propostas pela referida ferramenta, encontram-se a otimização de processos as quais tem por objetivo aumentar a potência, reduzir sua toxicidade e aumentar a biodisponibilidade das drogas candidatas a fármaco. Neste contexto, tomando por base os resultados dos ensaios preliminares de IC₅₀ realizados com os novos derivados oxazolidinônicos, as moléculas LPSF/NBM-1, LPSF/NBM-2, LPSF/NBM-3, LPSF/NBM-11 e LPSF/NBM-19 apresentaram-se como as mais ativas frente às linhagens celulares HI-60, MOLT-4, DU145, K562 e PC3. Os valores de IC₅₀ podem ser visualizados na tabela abaixo.

Tabela 4- Valores de IC₅₀ em μM obtidos através dos novos derivados oxazolidinônicos frente a diferentes linhagens tumorais.

Compostos	Linhagens					
	HI-60	MOLT-4	DU-145	K562	PC-3	PBMC
NBM 1	54,83 $\pm$ 0,586	51,61 $\pm$ 10,89	>100	60,64 $\pm$ 17,60	>100	>100
NBM 2	56,29 $\pm$ 0,232	57,33 $\pm$ 3,37	51,95 $\pm$ 26,82	46,36 $\pm$ 4,04	>100	>100
NBM 3	64,81 $\pm$ 3,010	>100	>100	>100	>100	>100
NBM 4	>100	>100	>100	>100	>100	>100
NBM 8	>100	>100	>100	>100	>100	>100
NBM 9	>100	>100	>100	>100	>100	>100
NBM 10	>100	>100	>100	>100	>100	>100
NBM 11	55,63 $\pm$ 0,144	>100	45,48 $\pm$ 45,20	56,46 $\pm$ 5,89	65,38 $\pm$ 6,17	62,99 $\pm$ 6,87
NBM 17	>100	>100	>100	>100	>100	>100
NBM 19	55,49 $\pm$ 0,117	55,34 $\pm$ 0,05	>100	54,92 $\pm$ 1,53	>100	56,38 $\pm$ 0,70
NBM 20	>100	>100	--	>100	>100	>100

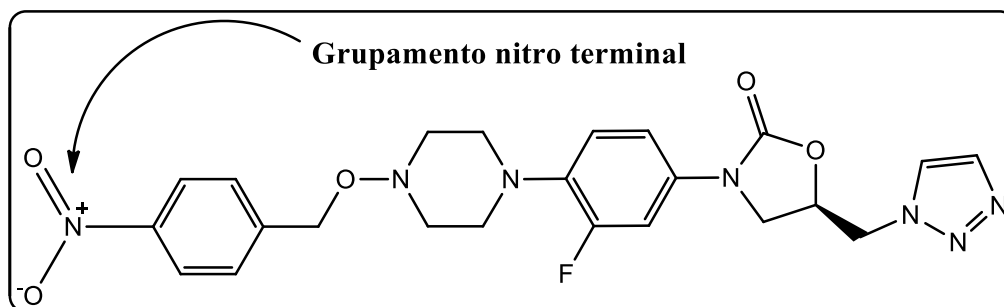
Fonte: Autor, 2017.

Com base nos resultados obtidos na tabela 4, decidiu-se pela exclusão dos compostos LPSF/NBM-11 e LPSF/NBM-19, sob a justificativa de se apresentarem muito citotóxicos

para células saudáveis do sangue periférico. Desta forma, excluiu-se ambos os compostos dos ensaios subsequentes.

O composto LPSF/NBM-11 contendo o substituinte 4-nitrobenzilideno apresentou um IC_{50} de 45,48 μM frente a linhagem de células de câncer de próstata DU145. No que tange a atividade antineoplásica promovida pelo efeito dos substituintes, este resultado encontra-se alinhado com o que propõe Wang e colaboradores (2008), os quais afirmam que grupamentos nitro diretamente ligados ao anel aromático podem ser metabolicamente convertidos em intermediários reativos sendo potencialmente letais para as células. Este tipo de conversão - a qual é mediada por enzimas P450 - foi descrita no grupamento nitro-imidazol presente em um antibiótico denominado nitrofurantoína, onde a atividade antineoplásica foi atribuída ao mesmo. Hedaya e colaboradores (2016) avaliaram a atividade antitumoral de duas diferentes séries de derivados oxazolidinônicos, uma contendo 5-(1*H*-1,2,3-triazolil) e outra, 5-acetamidometil em suas estruturas-base. A sua bioatividade foi testada frente a linhagem de câncer de mama MCF-7. Dentre os principais achados promovidos pelo referido grupo de pesquisa, o único composto capaz de induzir a morte celular de forma eficiente foi o *N*-piperazino-4-nitrobenzoil-5 (1*H*-1,2,3-triazolil) metil (figura 14).

Figura 14- Derivado oxazolidinônico sintetizado por Hedaya e colaboradores apresentando significativa atividade contra células MCF-7.



Fonte: Autor, 2016.

O composto LPSF/NBM-3 contendo o grupamento 3,4,5-trimetoxibenzilideno em sua estrutura também apresentou bioatividade frente a linhagem de células H1-60 e DU145, com valores de IC_{50} de 64,81 μM e 59,85 μM , respectivamente. Santiago-Vazquez e colaboradores avaliaram a citotoxicidade de novas moléculas derivadas de piperidinil contendo diferentes substituintes em linhagens de leucemia e linfoma. Os principais resultados indicam que moléculas contendo os substituintes 4-fluoro, 4-cloro e 3,4,5-trimetoxi apresentaram os

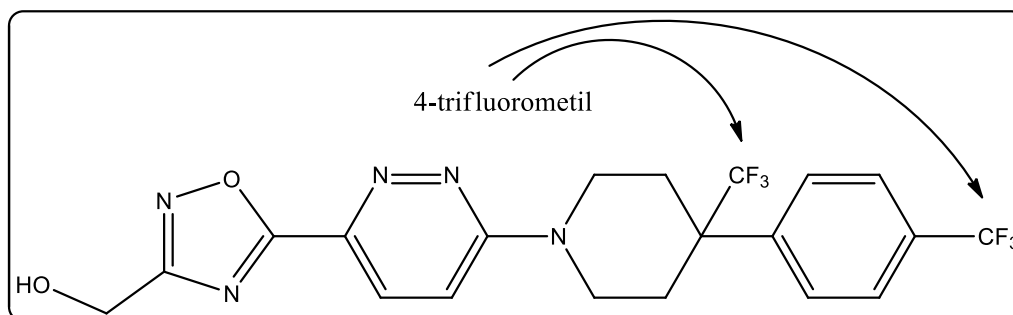
menores valores de IC₅₀ frente a linhagens de leucemia, linfoma e cólon. De acordo com o mesmo estudo, os autores afirmam que a adição de apenas um grupamento metoxi na posição meta do anel aromático em duas moléculas avaliadas já foi suficiente para aumentar significativamente as suas potências. Esta atividade foi ainda mais exacerbada quando comparada a adição dos três grupamentos metoxi no aromático nas posições 3, 4 e 5 o qual foi classificado como um dos três mais potentes do estudo em questão. As referidas moléculas foram ainda comparadas com compostos de referência como mefalano e curcumina, apresentando-se significativamente mais potentes do que elas. Ademais, a presença do grupo 3,4-dimetoxi no anel aromático além de propiciar uma maior toxicidade frente a células cancerosas apresentaram uma baixa citotoxicidade frente a células não-malignas de mama MCF-10A e fibroblastos Hs27, o que poderia ser um relevante fator na escolha de possíveis candidatos a fármacos no futuro (SANTIAGO-VAZQUEZ *et al.*, 2014).

A presença do grupamento metoxi também é observada no derivado oxazolidinônico LPSF/NBM-1, este contendo o referido substituinte na posição 2 do anel aromático, juntamente com um átomo de bromo na posição 5 do aromático. Isto confere à molécula uma atividade moderada frente a linhagens celulares MOLT-4 (51,61 µM), K562 (60,64 µM) e HL-60 (54,83 µM). Contudo, não podemos afirmar com autoridade que a presença do grupamento metoxi em diferentes posições do anel aromático dos novos derivados oxazolidinônicos seja um fator determinante para inferir um perfil citotóxico frente as linhagens tumorais avaliadas no presente estudo, visto que as moléculas LPSF/NBM-4 e LPSF/NBM-8 também apresentam metoxi como substituinte - nas posições -4 e -2, respectivamente - porém parecem não demonstrar significativa atividade antineoplásica em nenhuma das linhagens (IC₅₀ > 100).

Sabe-se que determinadas variações em propriedades eletrônicas, hidrofóbicas e estéricas em substituintes aril podem ativar correlações entre propriedades físico-químicas e citotóxicas. Neste contexto, Imamura e colaboradores (2017) sintetizaram novas moléculas derivadas de piperidina di-substituídas na posição 4, a fim de utilizá-las como inibidores da enzima estearoil-CoA desaturase (SCD), que além de outras funções, encontra-se diretamente ligada a patogênese do câncer e o desenvolvimento da malignidade em tumores (HOLDER *et al.*, 2013; IDE *et al.*, 2013 e ROONGTA *et al.*, 2011). Através da inibição da função desta enzima é possível alterar a composição de ácidos graxos dos lipídios intracelulares, provocando morte celular por lipotoxicidade e estresse de retículo em determinados tipos de câncer (ROEMELING *et al.*, 2013). No presente estudo, os autores propuseram alterações na

posição 4 dos anéis piperidínico e aromático (figura 15) através da introdução de diferentes substituintes em sua porção hidrofóbica da molécula.

Figura 15- Fenil piperidina di-substituída com os grupamentos 4-trifluorometil

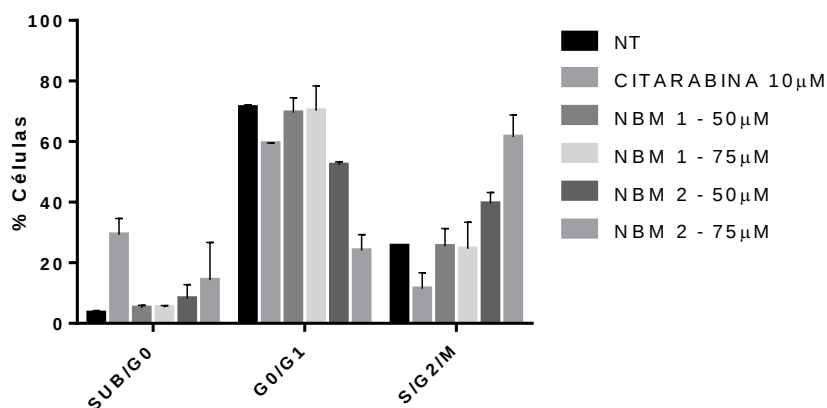


Fonte: Autor, 2017.

4.5 ENSAIO DE CICLO E MORTE CELULAR

Foram realizados ensaios através da técnica de citometria de fluxo a fim de avaliar os possíveis efeitos citostáticos e indutores de morte em células de origem hematopoiética HL-60 e MOLT-4. As células foram expostas a diferentes tempos e concentrações aos compostos LPSF/NBM-1 e LPSF/NBM-2. Nestes experimentos, utilizou-se Citarabina como controle positivo. A Citarabina consiste em um nucleosídeo análogo de pirimidina a qual possui ação na fase S do ciclo celular onde as células se encontram em processo de duplicação do DNA. Em determinadas circunstâncias, a Citarabina pode inibir a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S. Embora seu mecanismo de ação não esteja completamente elucidado, a mesma parece inibir a enzima DNA polimerase e demonstrar atividade intercalante provocando danos cromossômicos, incluindo rupturas cromatídes (MURPHY e YEE, 2017). A seleção dos referidos compostos baseia-se nos ensaios prévios de citotoxicidade onde os mesmos apresentaram as menores concentrações de IC₅₀ no geral. Abaixo encontram-se os gráficos referentes aos ensaios de ciclo e morte celular (figuras 16 e 17).

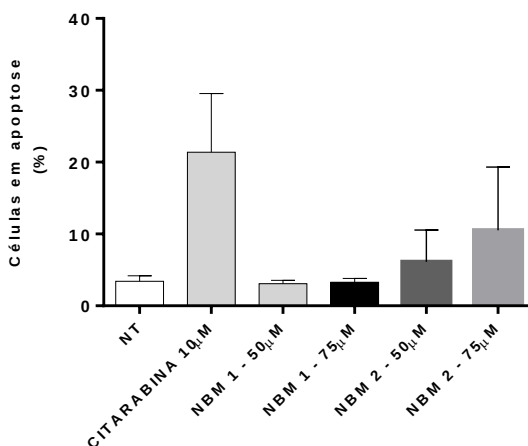
Figura 16- Ensaio de ciclo celular para células MOLT-4 após 48 h de exposição. NT = Não tratado; Citarabina = Controle positivo; Derivados oxazolidinônicos NBM-1 e NBM-2 em diferentes concentrações de 50 e 75 μ M.



Fonte: Autor, 2017.

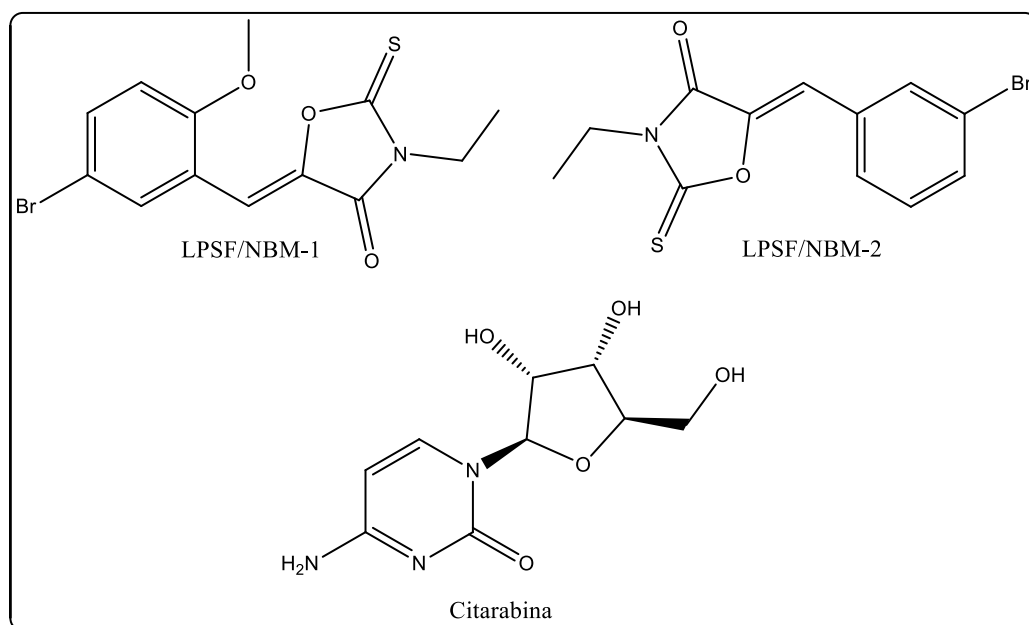
Pode-se observar a média de 61.55 % (última coluna do gráfico acima) referente a atividade do composto NBM-2 na concentração de 75 μ M num tempo de 48 horas de exposição em células de leucemia linfoblástica aguda (MOLT-4), indicando sua possível ação numa fase específica do ciclo celular em G2/M. A referida parada do ciclo celular nesta fase pode indicar uma possível reorganização de alguns processos, tais como regulação da segregação cromossômica bem como tentativas de reparação do DNA (FOSTER, 2008).

Figura 17- Ensaio de morte celular com os novos derivados oxazolidinônicos. NT = Não tratado. Controle positivo: Citarabina. LPSF/NBM-1 e LPSF/NBM-2 a concentrações de 50 e 75 μ M com exposição de 48 h a células MOLT-4.



Fonte: Autor, 2017.

Figura 18- Estruturas moleculares do LPSF/NBM-1, LPSF/NBM-2 e Citarabina



Fonte: Autor, 2017.

Alguns estudos de mecanismos moleculares demonstraram que compostos de origem sintética e natural foram capazes de induzir parada no ciclo celular e indução da apoptose na fase G2/M, indicando que o processo de parada do ciclo celular nesta fase está fortemente relacionado a mecanismos de morte celular (LEE *et al.*, 2010 e LIU *et al.*, 2013). Ademais, o processo de parada do ciclo celular em G2/M como processo central de indução de morte celular pode ser exemplificado pelo uso de nanopartículas de paládio através do seu uso atrelado a extratos de chá branco (*Camellia sinensis*) em linhagem de leucemia humana (MOLT-4) (AZIZI *et al.*, 2017).

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos é possível afirmar que o desenvolvimento de novas metodologias representa um avanço para a síntese de novos derivados oxazolidinônicos. Diferentes estratégias foram adotadas a fim de promover a aplicação de um método sintético rápido e eficaz. A utilização do referido método propiciou a síntese de novos derivados oxazolidinônicos contendo substituintes potencialmente reativos.

- Dentre as 15 novas moléculas da série LPSF/NBM propostas, 11 foram sintetizadas com sucesso obedecendo os critérios de pureza e rendimento aceitáveis para os ensaios biológicos;
- A metodologia em etapa única se mostrou mais eficiente para a síntese dos produtos finais visto que os compostos apresentaram, em geral, pureza e rendimento superiores aos produtos os quais foram sintetizados utilizando duas etapas de reação (condensação de Knoevenagel e adição de Michael, respectivamente) inicialmente propostas no projeto;
- Foram classificados como satisfatórios os compostos que apresentaram ^1H RMN e ^{13}C RMN contendo espectros limpos, legíveis e condizentes com suas respectivas prováveis estruturas. Os compostos que apresentaram picos incompatíveis com sua estrutura ou parâmetro que caracterize presença de impureza na molécula foram excluídos dos subsequentes ensaios de atividade antitumoral. Os critérios de aceitabilidade dos referidos produtos foram ainda submetidos ao crivo da Espectrometria de Massas (GC-MS) e CLAE. Convencionou-se utilizar um limiar mínimo de 97% de pureza na leitura da CLAE. Os produtos que não se encaixaram nos parâmetros citados totalizaram quatro compostos. Foram eles: LPSF/NBM-7, LPSF/NBM-12, LPSF/NBM-16 e LPSF/NBM-18. Estes compostos não foram aplicados à avaliação de atividade antitumoral neste estudo.
- Os novos derivados oxazolidinônicos apresentaram boa seletividade frente a células saudáveis (PBMC);

- Com base nos ensaios citotóxicos realizados pelo método de MTT, os compostos LPSF/NBM-1, LPSF/NBM-2, LPSF/NBM-3, LPSF/NBM-11 e LPSF/NBM-19 parecem ser os mais bioativos ante as linhagens testadas;
- Os compostos LPSF/NBM-1 e LPSF/NBM-2 apresentaram-se mais citotóxicos em linhagens de tumores hematopoiéticos nas células HL-60 e MOLT-4, indicando que os novos derivados oxazolidinônicos sejam propícios a desencadear uma melhor resposta citotóxica em linhagens de tumores hematopoiéticos;
- LPSF/NBM-2 mostrou-se como composto mais eficaz na indução da parada do ciclo celular em G2/M bem como na indução de morte celular em células MOLT-4, quando comparada com células não tratadas. Tal característica poderia indicar futuras aplicações para molécula candidata a terapia adjuvante para o referido tumor.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL et al., In vitro metabolism of a new oxazolidinedione hypoglycemic agent utilizing liver microsomes and recombinant human cytochrome P450 enzymes. **J Pharm Biomed Anal** 37(2), 351-8 2005.
- AZIZI S et al, Green synthesis palladium nanoparticles mediated by white tea (*Camelia sinensis*) extract with antioxidant, antibacterial, and antiproliferative activities toward the human leukemia (MOLT-4) cell line. **Int J Nanomedicine**, 14;(12):8841-8853, 2017.
- BAILEY C.J., DAY C. Thiazolidinediones today. **Br J Diab Vasc Dis.**, v 1:7-13, 2001.
- BARISH GD; NARKAR VA; EVANS RM. PPAR δ : a dagger in the heart of the metabolic syndrome,” **Journal of Clinical Investigation**, vol. 116, no. 3, pp. 590–597, 2006.
- BALKRISHNAN R, et al. Comparisons of rosiglitazone versus pioglitazone monotherapy introduction and associated health care utilization in medicaidenrolled patients with type 2 diabetes mellitus. **Clin Ther**, v 29:1306-15, 2007.
- BEYSEN C. et al. A pilot study of the effects of pioglitazone and rosiglitazone on de novo lipogenesis in type 2 diabetes. **J Lipid Res.**, v 49:2657-63, 2008.
- BLANQUICETT C, ROMAN J, MICHAEL HART C. Thiazolidinediones as anti-cancer agents. **Cancer Ther.**, 6(A):25-34, 2008.
- CHAWLA A. et al., PPAR δ is a very low-density lipoprotein sensor in macrophages, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 100, no. 3, pp. 1268–1273, 2003.
- CHOI, J. et al., 1,3-Diphenyl-1H-pyrazole derivatives as a new series of potent PPAR γ partial agonists. **Bioorg. Med. Chem.**, 18, 8315-8323, 2010.
- DANIEL K. The Glitazones: Proceed with caution. **Western J. Med.**, 173(1), 54-57, 2000
- DAY C. Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. **Diab Med**, 16:179-92, 1999.
- DE VRIES CS, RUSSELL-JONES DL. Rosiglitazone or pioglitazone in type 2 diabetes? **BMJ**, 339:b307, 2009.
- DESVERGNE B.; WAHLI W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. **Endocrine Reviews**, vol. 20, no. 5, pp. 649–688, 1999.
- DRESSEL U. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor β/δ agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. **Molecular Endocrinology**, vol. 17, no. 12, pp. 2477–2493, 2003.

ELROD HA, SUN SY. PPARgamma and apoptosis in cancer. **PPAR Res**, 2008:704165, 2008.

FAJAS L. et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 272, no. 30, pp. 18779–18789, 1997.

FAJAS L.; FRUCHART JC.; AUWERX J. PPAR γ 3 mRNA: a distinct PPAR γ mRNA subtype transcribed from an independent promoter. **FEBS Letters**, vol. 438, no. 1-2, pp. 55–60, 1998.

FORMAN BM.; CHEN J.; EVANS RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 94, no. 9, pp. 4312–4317, 1997.

FOSTER I; Cancer: a cell cycle defect. **Radiography**, vol 14, Issue 2, pp. 144-149, 2008.

FRUCHART JC. Peroxisome proliferator-activated receptor- α activation and high-density lipoprotein metabolism. **The American Journal of Cardiology**, vol. 88, no. 12, supplement 1, pp. 24–29, 2001.

GALLI A, et al., The potential of antidiabetic thiazolidinediones for anticancer therapy. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, 15(9):1040-9, 2006

GERVOIS P. et al. Fibrates increase human REV-ERB α expression in liver via a novel peroxisome proliferator-activated receptor response element. **Molecular Endocrinology**, vol. 13, no. 3, pp. 400–409, 1999.

GRILLIER-VUISSOZ, et al. PPARgamma-independent activity of thiazolidinediones: a promising mechanism of action for new anticancer drugs? **J Carcinogene Mutagene**, S8:1-15, 2012.

GUASCH, L. et al., Identification of PPAR gamma Partial Agonists of Natural Origin (I): Development of a virtual screening procedure and *in vitro* validation. **PLOS One** 7(11), e50816, 2012.

HOLDER AM et al, High stearoyl-CoA desaturase 1 expression is associated with shorter survival breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat**, 137(1);319-327, 2013.

HSU MH et al. A carboxyl-terminal extension of the zinc finger domain contributes to the specificity and polarity of peroxisome proliferator-activated receptor DNA binding. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 273, no. 43, pp. 27988–27997, 1998.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCA/MS) PRÓ-ONCO. Diagnóstico e TratamentoEstadiamento,Disponível:<http://www.inca.org.br/tratamento/estadiamento.html>. (acessado em em 05 de fevereiro de 2016).

ISSEMANN I.; GREEN S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, vol. 347, no. 6294, pp. 645–650, 1990.

JOHNSON J, GALE E. Diabetes, insulin use, and cancer risk: are observational studies part of the solution- or part of the problem? **Diabetes**, v 59:1120-31, 2010.

JOSHI H, PAL T, RAMAA CS. A new dawn for the use of thiazolidinediones in cancer therapy. **Expert Opinion on Investigational Drugs**. Vol. 23, n 4, 501-10, 2014.

KLIEWER SA et al., Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 94, no. 9, pp. 4318–4323, 1997.

KREY G. et al. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. **Molecular Endocrinology**, vol. 11, no. 6, pp. 779–791, 1997.

KUMAR, V; ABBAS, A. K; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran: Patologia -Bases Patológicas das Doenças**. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

LEE YB et al. Synthesis and anticancer activity of new 1-[(5 or 6-substituted 2-alkoxyquinoxalin-3-yl)aminocarbonyl]-4-(hetero)arylpiperazine derivatives. **Bioorg Med Chem**. 15(18) 7966-74, 2010.

LEHMANN JM, et al. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), **Journal of Biological Chemistry**, vol. 270, no. 22, pp. 12953–12956, 1995.

LEHRKE M.; LAZAR MA. The many faces of PPAR γ . **Cell**, vol. 123, no. 6, pp. 993–999, 2005.

LINDSEY A. et al. Global Cancer Statistics. **CA Cancer J Clin**, v 65:87–108 2015.

LIU Y et al, Anti-tumor effect of germacrone on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest and promoting apoptosis. **Eur J Pharmacol**, 698(1-3); pp 95-102, 2013.

MANGELSDORF DJ, et al., The nuclear receptor superfamily: the second decade, **Cell**, vol. 83, no. 6, pp. 835–839, 1995.

MESAIK, M.A. et al., Synthesis and immunomodulatory properties of selected oxazolone derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, 12, 2049-2057, 2004.

MURPHY T e YEE KWL. Cytarabine and daunorubicin for the treatment of acute myeloid leukemia. **Expert Opin Pharmacother**, 18(16);1765-1780, 2017.

OMS. Conferência Internacional sobre Cuidados Primários de Saúde: Declaração de Alma-Ata, 1978. Brasília, DF: **Ministério da Saúde**, 2004.

PANDIT N et al., Current Updates on Oxazolidinone and Its Significance International. Journal of Medicinal Chemistry Volume 2012 (2012)

PAL T, JOSHI H AND RAMAA CS. Design and Development of Oxazol-5-Ones as Potential Partial PPAR- γ Agonist Against Cancer Cell Lines. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, 14, 872-883, 2014.

PERRON, F.M. et al., Novel Bicyclic Oxazolone Derivatives as Anti-Angiogenic Agents. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 12, 1463-1466, 2002.

ROONGTA UV et al. Cancer cell dependence on unsaturated fatty acids implicates Stearoyl-CoA desaturase as a target for cancer therapy. **Mol Cancer Res**, 9;(11)1551-61, 2011.

SAHA, S. et al., Investigation of the role of the thiazolidinedione ring of troglitazone in inducing hepatotoxicity **Toxicol. Lett.**, 192, 141-149, 2010. SHEWACH DS.; KUTCHA RD. **Introduction to Cancer Chemotherapeutics** Volume 109, Number 7, 2009.

SAINIS I. et al. PPARgamma: the portrait of a target ally to cancer chemo preventive agents. **PPAR Res**, 436-89, 2008.

SCHWARTZ, A.V. et al., Thiazolidinedione Use and Bone Loss in Older Diabetic Adults. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 91(9), 3349-3354, 2006

SHIAU CW, et al., Thiazolidinediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions independently of PPARgamma. **Cancer Res**, v 65:1561-9, 2005.

STAELS B et al. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism, **Circulation**, vol. 98, no.19, pp. 2088–2093, 1998.

SUTIN, L. et al., Oxazolones as potent inhibitors of 11 β hydroxysteroid dehydrogenase type 1. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 17, 4837-4840, 2007.

TACHIBANA K et al., The Role of PPARs in Cancer. Hindawi Publishing Corporation Volume 2008, Article ID 102737, 15 pages

TADESSE, C et al. Synoxazolidinone a bicyclic member of the synoxazolidinone family with antibacterial and anticancer activities. **Tetrahedron Letters** 52, 1804-6 2011.

TAN NS. et al. Critical roles of PPAR β/δ in keratinocyte response to inflammation, **Genes & Development**, vol. 15, no. 24, pp. 3263–3277, 2001.

TAKAHASHI S. Peroxisome proliferator-activated receptor δ (PPAR δ), a novel target site for drug discovery in metabolic syndrome, **Pharmacological Research**, vol. 53, no. 6, pp. 501–507, 2006.

TANAKA T. et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor δ induces fatty acid β -oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome, **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 100, no. 26, pp. 15924–15929, 2003.

THURSTON DE. Chemistry and pharmacology of anticancer drugs. **British Journal of Cancer** 97, 1713–1713. 2007

TONTONOZ P. mPPAR γ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer, **Genes & Development**, vol. 8, no. 10, pp. 1224–1234, 1994.

TONTONOZ P.; HU E.; SPIEGELMAN BM, Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor, **Cell**, vol. 79, no. 7, pp. 1147–1156, 1994.

TYAGI S, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor: a family of nuclear receptors role in various diseases. **J Adv Pharm Technol Res**, 2(4):236-40, 2011.

VILLACORTA, L. et al., PPAR gamma and its ligands: Therapeutic implications in cardiovascular disease. **Clin. Sci.** 116, 205-218, 2009.

WANG YX. et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor δ activates fat metabolism to prevent obesity, **Cell**, vol. 113, no. 2, pp. 159–170, 2003.

WILLIAMS D.A.; LEMKE, T.L.; **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**, B.I. Publication Pvt. Ltd, New Delhi, 645, 2005.

WILLSON TM. et al. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 43, no. 4, pp. 527–550, 2000.

APÊNDICE A – Propriedades Físico-químicas dos compostos sintetizados no LPSF

PRODUTO	F.M.	P.M.	RDT. (%)	RF
LPSF IP-13	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O ₄	246,06	85%	0,50 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF IP-16	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂	244,29	63%	0,62 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF IP-19	C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ₂	240,09	45%	0,57 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF IP-23	C ₁₃ H ₁₂ BrNO ₃	309,00	77%	0,60 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF IP-25	C ₁₂ H ₁₀ BrNO ₂	278,99	79%	0,54 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF IP-26	C ₁₅ H ₁₇ NO ₅	291,11	82%	0,68 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF IP-47	C ₁₃ H ₁₂ BrNO ₃	309,00	89%	0,60 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF IP-57	C ₁₃ H ₁₀ F ₃ NO ₂	269,07	70%	0,58 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF IP-58	C ₁₃ H ₁₀ F ₃ NO ₃	285,06	73%	0,56 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF IP-90	C ₁₃ H ₁₃ NO ₂ S	247,07	25%	0,59 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF IP-92	C ₂₀ H ₁₅ NO ₂	301,11	61%	0,71 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF IP-93	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₂	226,07	78%	0,64 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF IP-94	C ₂₀ H ₁₄ ClNO ₂	335,07	80%	0,57 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF IP-95	C ₁₃ H ₁₂ BrNO ₃	309,00	72%	0,60 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF IP-96	C ₁₃ H ₁₀ F ₃ NO ₂ S	301,28	67%	0,53 (n-Hexano/AcOEt 7:3)

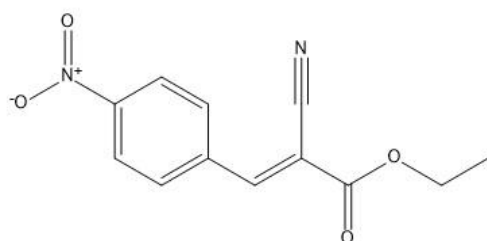
Características físico-químicas dos novos derivados oxazolidinônicos sintetizados no LPSF

PRODUTO	F.M.	P.M.	RD. (%)	P.F. (C°)	RF
LPSF NBM-1	C ₁₃ H ₁₂ BrNO ₃ S	342,21	72%	144,2	0,59 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF NBM-2	C ₁₂ H ₁₀ BrNO ₂	312,18	69%	171,6	0,63 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF NBM-3	C ₁₅ H ₁₇ NO ₅ S	323,36	72%	130,1	0,70 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF NBM-4	C ₁₃ H ₁₂ BrNO ₃ S	342,21	74%	236,4	0,68 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF NBM-7	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄ S	335,42	----	----	0,62 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF NBM-8	C ₁₃ H ₁₂ BrNO ₃ S	342,21	74%	152,8	0,60 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF NBM-9	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂ S	276,35	89%	155,7	0,59 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF NBM-10	C ₁₃ H ₁₃ NO ₂ S ₂	279,38	72%	172,0	0,55 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF NBM-11	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O ₄ S	278,28	70%	155,8	0,63 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF NBM-12	C ₁₃ H ₁₀ F ₃ NO ₃ S	317,28	----	----	0,62 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF NBM-16	C ₂₀ H ₁₅ NO ₂ S	333,40	Imp.	----	0,64 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF NBM-17	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	258,30	67%	157,1	0,56 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF NBM-18	C ₂₀ H ₁₄ ClNO ₂ S	367,85	Imp.	----	0,59 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF NBM-19	C ₁₃ H ₁₀ F ₃ NO ₂ S	301,28	50%	150,9	0,50 (n-Hexano/AcOEt 7:3)
LPSF NBM-20	C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ₂ S	272,32	76%	238,2	0,58 (n-Hexano/AcOEt 7:3)

Legenda: Imp. = Impuro

Abaixo encontram-se a estrutura molecular e algumas características físico-químicas dos ésteres de Cope sintetizados no LPSF:

2-ciano-3-(4-nitro-fenil)-cianoacrilato de etila (LPSF IP-13)



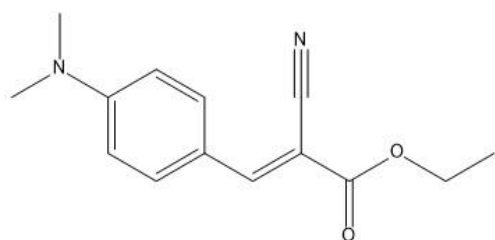
F.M: C₁₂H₁₀N₂O₄

P.M: 246,06

Rdt: 85%

Cor: Pó amarelo claro

2-ciano-3-(4-dimetilamino-fenil)-cianoacrilato de etila (LPSF IP-16)

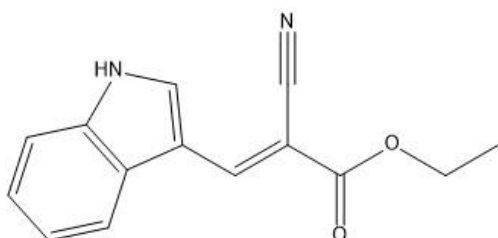
F.M: $C_{14}H_{16}N_2O_2$

P.M: 244,12

Rdt: 63%

Cor: Cristais laranja

2-ciano-3-(1H-indol-3-il)-cianoacrilato etila (LPSF IP-19)

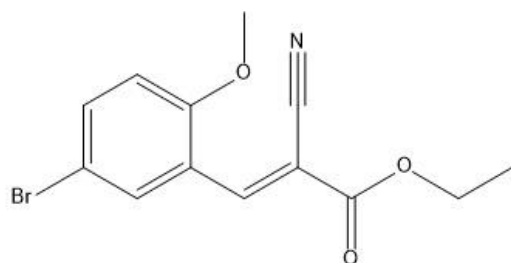
F.M: $C_{14}H_{12}N_2O_2$

P.M: 342,21

Rdt: 45%

Cor: Castanho escuro

3-(5-bromo-2-metoxi-fenil)-2-cianoacrilato de etila (LPSF IP-23)

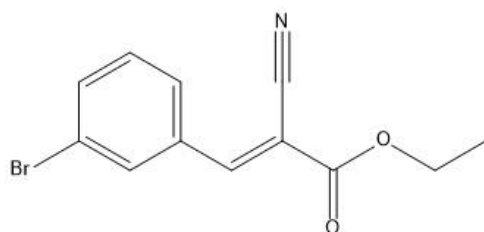
F.M: $C_{13}H_{12}BrNO_3$

P.M: 309

Rdt: 77%

Cor: Cristais amarelos claros

3-(3-bromo-fenil)-2-cianoacrilato de etila (LPSF IP-25)

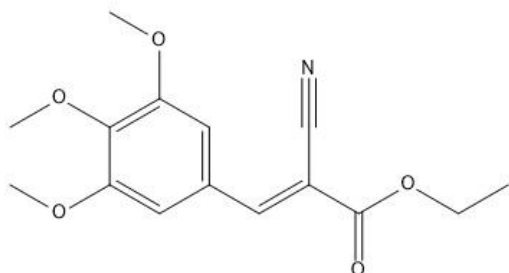
F.M: $C_{12}H_{10}BrNO_2$

P.M: 278,99

Rdt: 79%

Cor: Cristais amarelos

2-ciano-3-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-cianoacrilato de etila (LPSF IP-26)

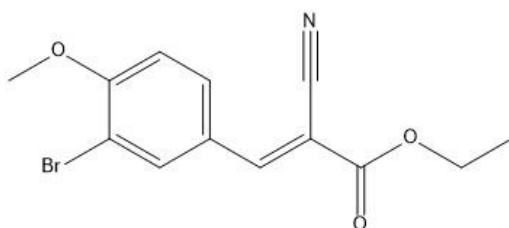
F.M: C₁₅H₁₇NO₅

P.M: 291,11

Rdt: 82%

Cor: Cristais amarelos

3-(3-bromo-4-metoxi-fenil)-2-cianoacrilato de etila (LPSF IP-47)

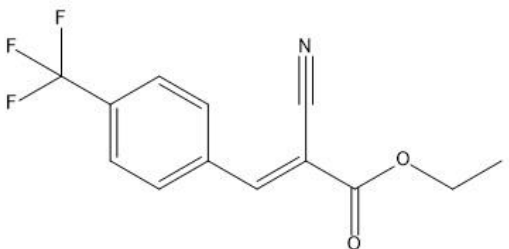
F.M: C₁₃H₁₂BrNO₃

P.M: 309

Rdt: 89%

Cor: Cristais amarelos

3-(4-trifluorometil-fenil)-cianoacrilato de etila (LPSF IP-57)

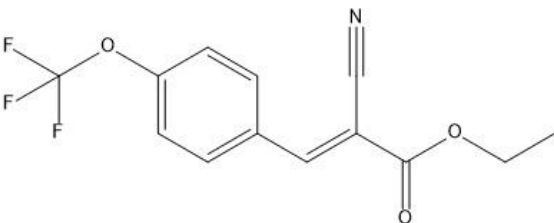
F.M: C₁₃H₁₀F₃NO₂

P.M: 269,07

Rdt: 70%

Cor: Cristais amarelos

3-(4-(trifluorometoxi)fenil) cianoacrilato de etila (LPSF IP-58)

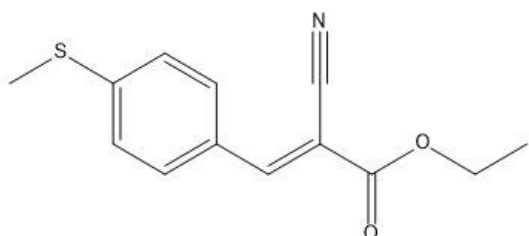
F.M: C₁₃H₁₀F₃NO₃

P.M: 285,06

Rdt: 73%

Cor: Cristais brancos

3-(4-(metiltio)fenil) cianoacrilato de etila (LPSF IP-90)

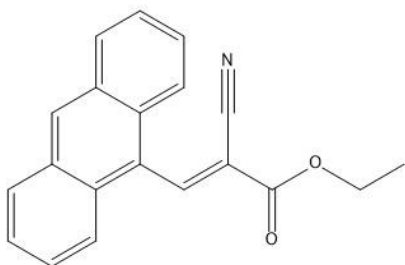
F.M: $C_{13}H_{13}NO_2S$

P.M: 247,07

Rdt: 25%

Cor: Pó branco

3-(antraceno-9-il)-2-cianoacrilato de etila (LPSF IP-92)

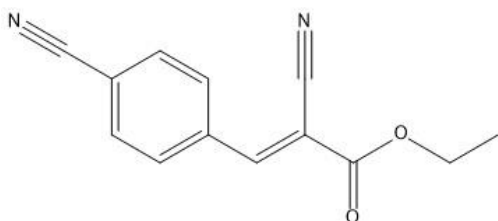
F.M: $C_{20}H_{15}NO_2$

P.M: 301,11

Rdt: 61%

Cor: Pó amarelo

3-(4-cianofenil) acrilato de etila (LPSF IP-93)

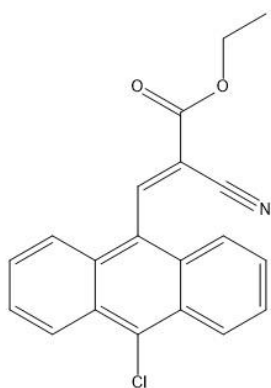
F.M: $C_{13}H_{10}N_2O_2$

P.M: 226,07

Rdt: 78%

Cor: Pó amarelo

3-(10-cloroantraceno-9-il)-2-cianoacrilato de etila (LPSF IP-94)



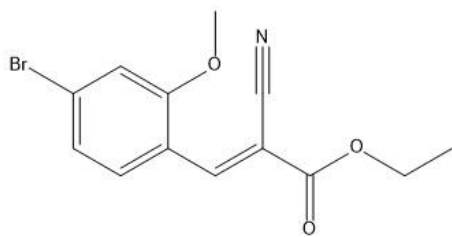
F.M: $C_{20}H_{14}ClNO_2$

P.M: 335,07

Rdt: 80%

Cor: Pó castanho escuro

3-(4-bromo-2-metoxifenil)-2-cianoacrilato de etila (LPSF IP-95)



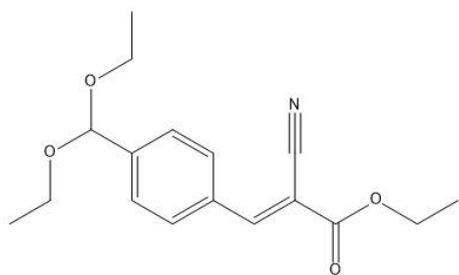
F.M: $C_{13}H_{12}BrNO_3$

P.M: 309

Rdt: 72%

Cor: Pó castanho

3-(4-(diethoximetil)fenil) cianoacrilato de etila (LPSF IP-96)



F.M: $C_{17}H_{21}NO_4$

P.M: 303,15

Rdt: 67%

Cor: Cristais castanhos escuros

APÊNDICE B – Artigo de revisão submetido no periódico *Mini-reviews in medicinal chemistry*

Does the oxazolidinone derivatives constitutes a functional approach for cancer therapeutics?

Ramalho, EAVF^{1,3}; Siqueira-Neto, HB^{1,3}; Pitta, IR^{1,2,3}. Rocha-Pitta, MG^{1,3}

¹Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil;

²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica, Brasil; ³Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Abstract: In the last four decades, emphasis was given on the research of small organic molecules with potential anticancer activity. Linezolid was the first oxazolidinone derivative approved by FDA for MRSA treatment. Despite its major role in antimicrobial activity, these molecules display other properties, serving also as antitumor agent. Oxazolidinone derivatives are able to act through different pathways such as partial agonist of transcription factor PPAR- γ , inhibitor of key enzymes related to hormone-dependent disorders and even on sphingolipid metabolism as well. The purpose of this short review is to discuss the application of oxazolidinone derivatives as antitumor agent by highlighting the most promising molecules studied by many research groups worldwide. It's discussed their main biological activity against several tumor cell lines, including hematopoietic and solid cancer cell lines. In addition, this study intends to report how different types of oxazolidinone derivatives can act as antitumor agent describing its distinct mechanisms of action based on their targets.

Keywords: Oxazolidinone; cancer; PPAR γ ; 17 β -HSD, ceramide.

Introduction

Cancer is responsible for more than 8 million deaths each year worldwide and more people will be affected in the upcoming years [1]. Regarding therapy process there are some methods available, which can be used alone or combined. Treatment is based on tumor type and the most used techniques are surgery, radiotherapy and chemotherapy. Many efforts are being performed in order to develop new anticancer agents due to high cytotoxicity of the conventional drugs in market [2]. In this context, industry and academia are looking forward to explore this field of molecules envisaging effectiveness, safety and very low cytotoxicity rates. The use of oxazolidinone derivatives as antitumor agent dates from late 60's [3]. In 1973, DuPont company synthesized a series of 2-oxazolidinones bearing an alkynoxymethyl side chain in the 5-position. Despite the first studies reported have presented no significant effectiveness on cancer treatment, other approaches took place by oxazolidinone derivatives as promising anticancer agent [4]. Molecules bearing an oxazolidinone ring on its structure have shown anticancer activity against many types of tumor cell lines such as breast [5] and pancreatic cancer [6]. Since then many research groups worldwide have been working on this class of organic molecules, reporting inhibition of different growth factors, enzymes and kinases including telomerase enzyme, histone deacetylase (HDAC), thymidylate synthase (TS), epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and focal adhesion kinase (FAK) [7, 8].

The aim of this review is to approach globally the role of oxazolidinone derivatives on clinical trials as antitumor agent. Several research groups have experimentally displayed interesting data about

the properties of this group of molecules in cancer therapy. Regarding their mechanism of action, different pathways could be highlighted such as: partial agonist of transcription factor PPAR γ , key enzyme and protein interactions, and even on sphingolipid metabolism, the latter consisting in a very effective mechanism to induce apoptosis in healthy cells [9]. Through these actions, oxazolidinone derivatives are able to trigger various cellular events like cell cycle arresting, senescence induction, apoptosis, DNA fragmentation and regulation of hormone-dependent disorders in some types of cancer [10]. In addition, earlier reports have described molecules bearing the oxazolidinone pharmacophore group as a useful alternative for striking cancer cells that are resistant to chemotherapeutics and hypoxia [11]. Thus, oxazolidinone derivatives are present as metabolites of the cyclophosphamide, a well known antitumor agent [12].

In this context, we attempt to summarize the most important findings in the literature about the oxazolidinone derivatives as anticancer agent by exploring their different targets in distinct solid and hematopoietic tumors, its mechanism of action and the role of some important electro donating or withdrawing substituents on its chemical structure, in some cases by triggering an activity enhancement/decrease. According to our literature research, this may be the first review about oxazolidinone derivatives as anticancer agents since this compilation was not done to date.

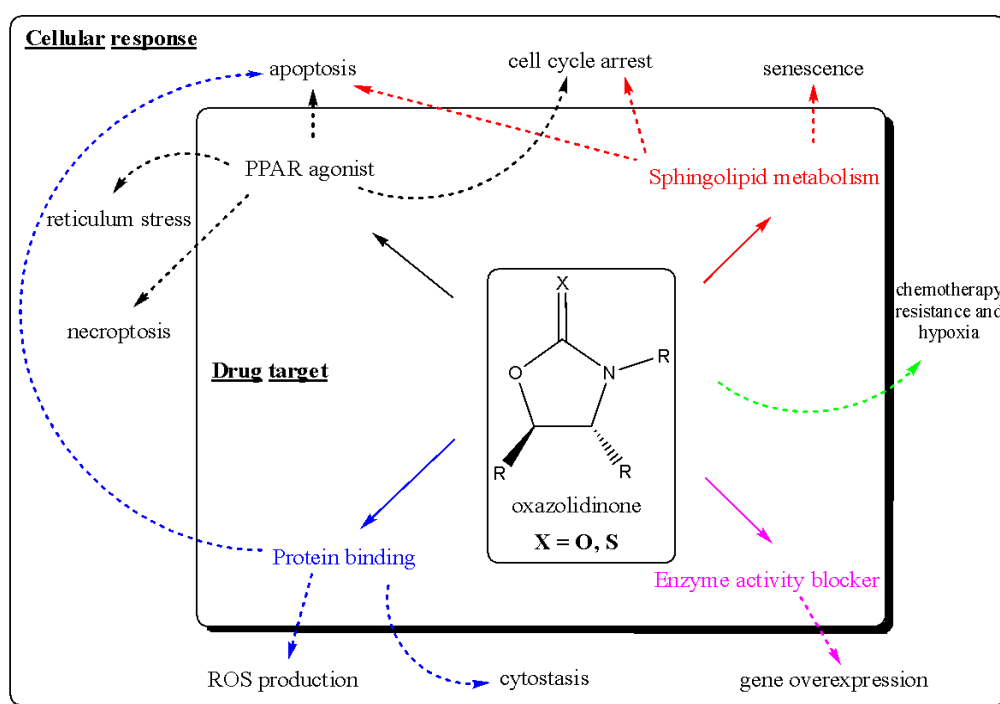


Figure 1. Draft showing some oxazolidinone targets and its major cellular event in cancer.

Oxazolidinones as partial PPAR- γ agonist

The PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors) is classified as a nuclear receptor superfamily of ligand-activated transcription factors and have been associated to a bunch of disorders such as atherosclerosis, inflammation and immunity, aging-related diseases, obesity, good responsiveness to insulin, and recently was included in the group of molecules with chemopreventive properties [13].

Thiazolidinedione (TZDs) is the most known representative of the referred group, being responsible for triggering several effects through different pathways in cancer cell lines like apoptosis, cell differentiation and cell cycle arrest. In the case of apoptosis, TZDs bind with high affinity to the subtype PPAR- γ . Upon activation, by the action of synthetic ligands like TZDs PPAR- γ forms a

heterodimer with the retinoid X receptor (RXR) and binds to PPAR response elements (PPRE) that regulate the transcription of select target genes. It also involves recruitment of coactivators and dissociation of corepressors, which ultimately causes apoptosis by decreasing antiapoptotic proteins such as bcl-2/bcl-x and survivin, while increasing the levels of the pro-apoptotic proteins, p53, BAD, phosphatase and tensin homolog (PTEN) [14]. One of the most interesting ways to suppress cell proliferation consists of cell cycle arresting, as TZD molecule is able to decrease cyclin D1 protein and proliferate cell nuclear antigen levels, pRb and Cdk4. Thus, treatment with TZD is related to increasing cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and p27 inducing cell cycle arrest [15]. There are recent findings about TZDs reporting its property as differentiation-inducing agents for the treatment of several types of tumors [16]. Moreover, TZDs are able to induce cell cycle arrest in G1 by a PPAR- γ independent mechanism involving depletion of intracellular calcium, activation of PKR and phosphorylation of the α subunit of eIF2 α , breaking off translation initiation [17].

Unfortunately, full PPAR- γ agonism has been associated to some undesirable side effects such as hepatotoxicity, fluid retention and cardiovascular toxicity [18]. Its toxicity profile remains unclear, despite data suggesting that TZD ring modifications could be suitable in order to achieve less cytotoxicity [19].

In this context, prospection of partial agonists of PPAR- γ was a good alternative to mitigate adverse effects. They act via helix 12 α independent mechanism, which decreases the extent of transcriptional activity, hence avoiding undesirable side effects [20].

Therefore, Pal and co-workers decided to investigate the role of these partial agonists of PPAR- γ by exploring a chemically similar oxazol-5-one, and check its cytotoxic potential since these molecules are known for display important therapeutic characteristics such as immunomodulator [21], tyrosinase inhibitor [22], anti-angiogenic [23] and anticancer [17].

Authors were concerned about the cytotoxicity of TZD ring, which has been previously reported on literature [24, 25]. They claim that TZD ring provides the formation of four oxidative reactive metabolites *via* ring opening and further action of glutathione. Thus, the sulfur atom in the ring was reported as cytotoxic agent. They have included the oxazol-5-one ring as pharmacophore since the oxygen atom is capable of retaining a similar electronic configuration as that of sulfur, preventing glutathione oxidation and reducing chances of toxic metabolites. This is due to the fact that the phenyl group is flanked by both sides by an atom of oxygen and nitrogen providing more metabolic stability to the oxazolone ring. These findings are in line with structure activity relationship (SAR) studies which affirm that their molecules complies with the pharmacophoric requirement of partial PPAR- γ agonist containing three hydrophobic centres and a hydrogen bond acceptor [17].

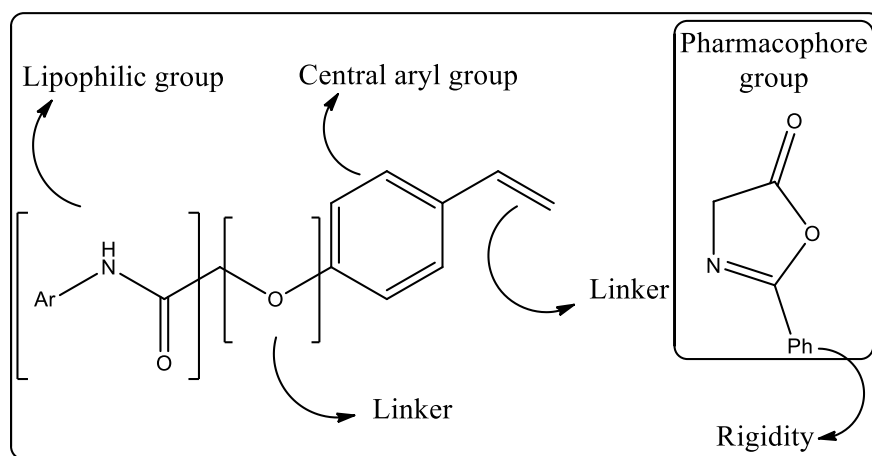


Figure 2. Representation of designed molecules. Partial PPAR γ agonist molecule structure. Adapted

from Pal *et al.*, 2014 [17].

In order to evaluate biological activity of oxazolo-5-ones derivatives, GI_{50} test has been applied whereas compounds presenting $\log_{10} GI_{50}$ value -4.0 and < -4.0 were considered to be active. Solubility in dymethylsulphoxide (DMSO) was considered as parameter. Compound 31 was excluded from anti-cancer evaluation due to poor solubility on this solvent [17].

In this study, sixteen molecules were considered significantly active against breast cancer cell line MCF-7. Two compounds were found to be active against nasopharyngeal cancer cell line (KB). There were good active compounds displaying activity against leukemia cell line (K562), oral cancer (GURAV), ovarian cancer (Ovkar-3) and liver cancer (HepG2) [17].

From this referred evaluation, compound 3g, which bears an oxazolone ring directly linked to a phenyl ring presenting a CF_3 group in 3-position, was highlighted by showing consistent cytotoxic profile among oxazolone derivatives in MCF-7 cell line. According the SAR studies, the main interactions between compound 3g and amino acid residues of its corresponding ligand occurred as follows: 1) carboxyl group of oxazolone ring provides a hydrogen bond with hydroxyl group of Ser342 residue; 2) Benzotrifluoride ring with arene interacts with Arg288 residue. These findings are in line with previous literature data, claiming that interaction of residue Ser342 is crucial in order to distinguish partial agonism and full agonism of PPAR γ [26]. Therefore, this interaction was able to generate an interesting response at partial PPAR γ agonist activity. Consequently, emphasis was given to MCF-7 cancer cell line since it has been reported to express PPAR- γ [27, 28]. Based on these data, authors decided to explore compound 3g, which presented itself as the most highly potent molecule against breast cancer cell line with a proposal of screening its mechanism of action and evaluate 3g as a potential candidate in cancer therapeutic.

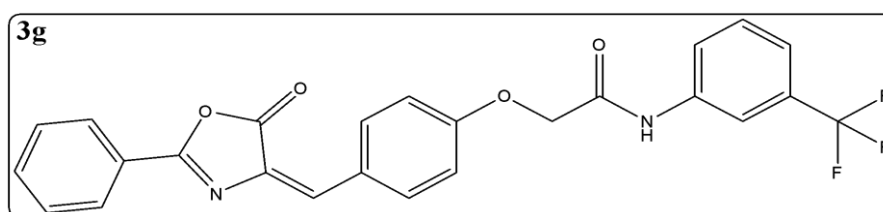


Figure 3: Chemical structure of 3g.

Threshold value was defined as greater than 25% activation. Pioglitazone, a full PPAR- γ was considered as positive control and its activation at $1 \mu M$ concentration was defined as 100%. Among all molecules tested on this study, 3g was the only one that presented a threshold greater than 25%, exhibiting 66% activation. Concerning about EC_{50} concentration values, Pioglitazone had $0.3 \mu M$ whereas 3g displayed $4.4 \mu M$.

Compound 3g showed a significant affinity to PPAR- γ , but as expected, less than pioglitazone. In order to determine the partial PPAR- γ activity of 3g, it was performed a stimulating adipocyte differentiation of murine preadipocyte 3T3-L1 cells test. Dose range of adipogenesis assay was $1 \mu M$ to $1000 \mu M$ since 3g presented anticancer activity at concentration of $0.3 \mu M$. Two compounds appear to show adipogenesis stimulation in the defined dose range. Pioglitazone presented a dose dependent profile whereas 3g presented stimulation only at $1 \mu M$ concentration, exhibiting no dose dependent stimulation at higher concentrations.

This study suggest compound 3g as a therapeutic alternative against MCF-7 breast cancer cell line acting *via* partial agonist of PPAR γ pathway. Hence, 3g was able to stimulate adipogenesis. However, studies involving further modifications on oxazolone structure are necessary to provide more conclusions.

Another research group performed a study displaying similar data about oxazolidinone derivatives as partial agonists of PPAR γ . Campos and co-workers [29] synthesized novel oxazolidinone derivatives in order to evaluate its potential against seven different cancer cell lines. The two more active compounds were named as NB-4 and NB-5. These compounds bears a 4-pyrrolidin-1-yl and bis-benzyloxy-benzylidene substituents on its chemical structure, respectively. The main findings obtained by Campos and co-workers are in line with previous studies with oxazolidinone derivatives, displaying very similar IC₅₀ values against human leukemia (HL-60) and breast cancer (MDA-MB-231). NB-4 was active when tested against Jurkat cells (IC₅₀ = 15.19 μ M) and HL60 (IC₅₀ = 21.19 μ M) (see table 2) and this appears to be due to its substituent effect, since pyrrolidine group is related to various compounds displaying anticancer activity through inhibition of type II α -mannosidases [30]. Regarding to modulation of apoptosis, NB-4 seems to be related to induction of apoptosis via Bid action, which consists of a protein that acts during extrinsic apoptosis and also is responsible for provoking cytochrome *c* release by caspase 8 [31, 32]. Despite the display of increased BID gene expression in HL60 cells by NB-5, this compound seems to induce cell death through a different mechanism such as necroptosis and endoplasmic reticulum (ER) stress.

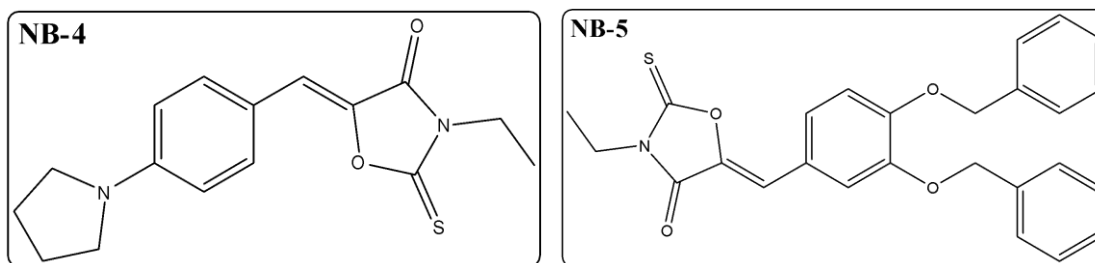
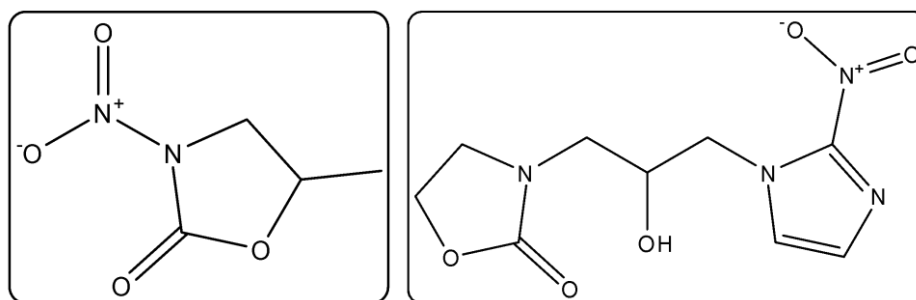


Figure 4a and 4b. Chemical structure of NB-4 and NB-5.

Oxazolidinone protein binding as apoptosis and senescence inducers.

Naresh and co-workers [33] proposed some novel oxazolidinone derivatives, which were based on linezolid chemical structure bearing a *p*-methoxyphenyl group at C-4 position. They have envisaged hybrid structures of linezolid and cytoxazone toward cultured lung (A549), prostate (DU145), HeLa and breast cancer (MCF-7) cell lines in order to perform evaluation of anticancer activity for these compounds. Regarding to chemical section, they have used retrosynthetic analysis to achieve the new hybrid structures. Biological activity presented a wide range of cytotoxicity in MTT assays, going from 10 to 70 μ M across all tested cell lines.



Figures 5a and 5b. Examples of oxazolidinones: 3-nitro-5-methyl-2-oxazolidone and 3-(2-hydroxy-3-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)propyl)-2-oxazolidinone, with anticancer activity tested in early clinical trials.

Posizolid, torezolid, linezolid, cytoxazone and *epi*-cytoxazone, having the basic common oxazolidinone structure, all displayed interesting biological activities. Many research groups have

reported structural changes of Linezolid, by an introduction of heterocyclic moieties replacing all the three rings at Linezolid structure [34]. Cytoxazone is a natural product responsible for inhibition of signaling pathway of Th₂ cells [35], and its C-5-epimer *epi*-cytoxazone is a synthetic product with a good potential activity molecule [36]. A *p*-methoxyphenyl group at C-4 position of the oxazolidinone ring appears to be very important in comparison to other structures. Based on this, Naresh and co-workers proposed two new series of oxazolidinones derivatives based on hybrid structures of Linezolid containing the *p*-methoxyphenyl group at C-4 position of the oxazolidinone ring, which was not reported to date [33]. In addition, a substituent at C-4 position creates a new stereo centre, which allows the possibility of erythro and threo oxazolidinones helping in its therapeutic action and stereochemistry.

Concerning organic synthesis, they have made retrosynthetic analysis for their new hybrid structures, erythro I and threo II. The basic core structures of erythro and threo can be achieved by N-arylation of some oxazolidinones with iodo derivatives.

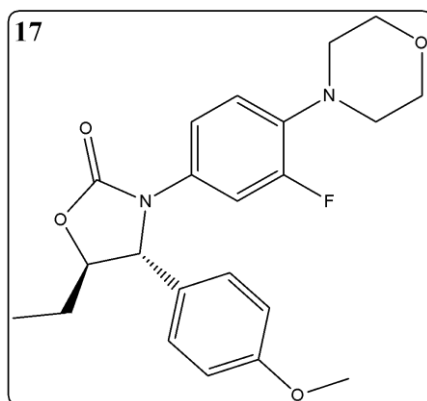


Figure 6. Chemical structure of 17.

Regarding biological activity of the new compounds, a random screening was performed against selected cell lines to determine their anticancer potential. Method of evaluation was comparison of IC₅₀ values. Among all compounds, only two displayed greater cytotoxic effect against DU145 (prostate cancer cell line) by showing a single-digit value of 9.47 (standard deviation of ± 0.18) and 8.69 (std. deviation of ± 0.38) μ M. In addition, the effects of these two compounds in prostatic cancer cells led the researchers to perform a deeper investigation about its mechanism of action.

Compound 17 was found to be cytotoxic against DU145 cell line, causing changes in cell morphology and even detachment from surface when exposed to higher concentrations. Further investigation about this compound was performed in order to evaluate its long-term effect on the anchorage-independent proliferative capacity of the DU145 cell line, proving that 17 has a good capacity of inhibit colony formation of proliferating cancer cells. Thus, authors have performed flow cytometry tests in order to confirm whether cell death occurred by induction of 17, by analyzing cell cycle and cell death. Growth arrest was observed in sub G1 phase confirming cell death by exposure to compound 17 [33].

In this study, authors have reported also activation of caspase-3 and caspase-9 suggesting that compound 17 has apoptosis induction capacity. Activation of these two key caspases is a prerequisite for induction of apoptosis, which was achieved by treating DU145 cells with compound 17 for 48 h with no interruption. Doxorubicin was used as positive control for reference to caspase activation. Compiling all this information together, they concluded compound 17 was able to induce cell death through mitochondrial intrinsic pathway [33].

It is known that some small molecules possess the ability of inducing senescence in healthy cells [37].

In order to check whether 17 had a similar effect on prostatic cancer cells DU145, senescence SA- β gal assay was performed. This assay is not active on healthy or quiescent cells, which makes SA- β gal a good biomarker for senescent cells. In this context, results have confirmed that compound 17 is responsible for inducing senescence of DU145 cells.

Compound 17 has presented an interesting activity against prostatic cancer cell lines DU145 by effectively inducing cell cycle arrest and senescence. The strategy of using cytoazone-linezolid hybrids containing acryl or ethyl substituents may constitute a promising alternative for cancer therapy in the future [33].

Oxazolidin-2-ones at sphingolipids metabolism

Sphingolipids are very important at cell regulation for their roles at proliferation, differentiation, survival, migration and cell-death, all of these closely linked to metabolic pathways [38, 39]. Ceramides are among the most important molecules characterized as secondary messenger of sphingolipid signaling pathway [39]. Regarding to its structure, ceramides are constituted basically of a long alkyl chain with 2-amino-1,3-diols, a C4,5-*trans*-olefin as the backbone and an *N*-acyl group [9]. It is well known that the dynamic balance of the sphingolipid metabolites is crucial to generate relevant cell responses such as proliferation and apoptosis [40]. Ceramide is important for stimulating apoptosis when hydrolyzed by ceramidase to sphingosine, followed by activation of kinase to generate sphingosine-1-phosphatase during cell growth [9].

Various analytical methods show ceramide accumulation during the initiation stage of apoptosis [41]. In addition, ceramides has presented selective toxicity against malignant cells, preserving healthy cells [42]. Being the central molecule in the sphingolipid metabolism, ceramide is known to induce apoptosis, senescence [43] and growth arrest [44] in many human cancers. Based on the increasing of research in this field, sphingosines were isolated from natural sources and then organic synthesis were proceeded in order to yield sphingosine analogs, bearing structural modifications based on the natural molecule for the purpose of evaluating its biological activity against various cancer cell lines.

Exogenous ceramide is responsible for apoptotic programmed cell death induction. In particular, ceramide bearing a short acyl group such as C2-Cer and C8-Cer inhibit cell growth and induce apoptosis in leukemia cell lines [45]. Ceramides containing longer alkyl chain than C8-Cer are too lipophilic to go through cell membrane. Allylic alcohol seems to play an important role at biological activity when combined with ceramide compounds. In this context, Singh and co-workers envisaged to prepare and evaluate several synthetic and natural ceramides analogs with backbone modifications by changing hydroxyl and amine functional groups. Considering previous studies with acyclic ceramide analogs bearing a primary alcohol on its backbone, it seems like these compounds can perturb or at least have a chance to interfere on metabolic pathways due to its possible involvement in several biological reactions [9]. In a previous study, these authors reported a short communication [46] about synthesis and biological activity of new constrained ceramides analogs with very similar conformational and electronic properties of ceramide, using oxazolidin-2-one ring as model. Analog bearing an oxazolidin-2-one ring presented the primary alcohol at C-1 position, amide nitrogen at C-2 of ceramide and a carbonyl group. This sort of conformation conserves the allylic alcohol system, considered very important to keep biological activity with generation of reactive oxygen species (ROS) [47, 48]. Furthermore, in this analog the free primary hydroxyl group was bounded to oxazolidin-2-one ring, which may prevent undesirable metabolic perturbation at the hydroxyl group of C-1 of the sphingoid backbone [9].

Singh and co-workers synthesized 13 molecules using designed compounds from commercially available (2S)-aziridine-2-carboxylate in order to evaluate its potential antileukemic role against

human leukemia HL-60 cells, using C2-Cer as positive control and C2-DHCer as negative control. Method chosen was MTT assay, HL-60 cells were treated with 20 μ M of ceramide oxazolidin-2-one analogs with references for 16 h. Interestingly, they have reported all tested compounds (5a – 5m) showed activities with drastic difference by the N-acyl substituents of the oxazolin-2-one ring. Some compounds have shown weak or no activity against HL-60 cells. On the other hand, compound 5f bearing a cyclopropanyl ring at R1 has improved the activity drastically, displaying the best activity among all tested compounds bearing alkyl substituents.

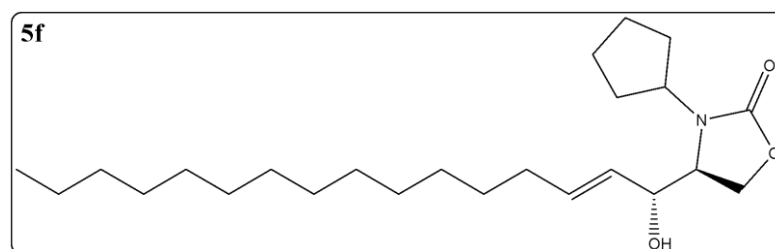


Figure 7. Chemical structure of 5f.

Other molecules bearing a benzoyl group, which may present a good potential as antileukemic agent, also showed good activity against HL-60 cells. In this study, authors claim that good activity of certain molecules was due to its substituent dependence of the phenyl ring, in this case *p*-nitrophenyl, which has presented a very potent activity. Compounds bearing benzoyl groups have presented good activity as well. Furthermore, they reinforce the difference in activity among all tested compounds is speculated not from the simply physical properties such as lipophilicity or polarity, but from the unique structural features of each one of them [9].

In this context, authors have decided to find out whether the cytotoxicity induced by these analogs or the reduction of HL60 cells was triggered by the apoptosis. The characteristics of cell death were verified by analyzing DNA-fragmentation induced by these molecules. DNA laddering of fragments was observed after 15 h of incubation of HL-60 cells with 20 μ M of C2-Cer, C2-DHCer and oxazolidin-2-ones (5a, 5b, 5c, 5d, 5f, 5i and 5k). Their findings suggest that there was a clear correlation between anticancer activity and DNA fragmentation. In addition, active compounds bearing R1 as ethyl and phenyl appear to cause similar or even more DNA fragmentation when compared to positive control (C2-Cer) and other inactive compounds (R1 = methyl and pentadecyl). Furthermore, all active compounds (R1 = *i*-propyl, cyclopentyl, phenyl and *p*-nitrophenyl) also provoked DNA fragmentation. This strong correlation between DNA fragmentation and HL-60 cells death reinforces that cytotoxicity of the ceramide is originated from apoptosis [9].

Oxazolidin-2-one ceramide analogs did not inhibit the ceramide metabolic enzymes to accumulate the cellular concentration of ceramide. Instead, these molecules were capable of inducing apoptosis through caspase cascade with induction of nuclear factor κ B (NF- κ B) DNA binding and caspase-3 activation, as exogenous C-2 and C-6-ceramides do [49].

All compounds tested in this study are bearing the 1-hydroxyhexadec-2-ene at C-4 position of oxazolidin-2-one ring [50], and this particular feature makes these molecules constituted by the same structure of eighteen carbons as the sphingoids. Compounds bearing less than twelve carbons on its backbone were almost inactive. On the other hand, a single compound bearing fifteen carbons have shown a reasonable activity. These findings strongly suggest that the hydrophobic binding site of the receptor, which induces anticancer activity, is able to accommodate certain carbon chains but it is too narrow to get the cyclic compounds. Singh and co-workers [9] assert that this was the first study based on structure-activity relationship (SAR) concerning pro apoptotic process with multiple oxazolidin-2-ones as constrained ceramide analogs.

Oxazolidinones role as enzyme activity blocker for hormones

The human prostate is a hormone-sensitive organ that depends on androgens for growth and development. Also regulation of androgen biosynthesis or its action on the androgen receptor is central to the management of prostate cancer [51]. Production of androgens is controlled at two levels within the central nervous system. In addition, it is controlled locally in peripheral organs that are targeted by these hormones. The 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD) family mediates the activation and deactivation of sex steroids involving redox reactions centered on the C17 area of the steroid backbone [52]. This family of enzymes has a direct impact on diseases that have been shown to be hormone-dependent, such as prostate and breast cancer. More specifically, both diseases depend on the long-term exposure to potent androgens and estrogens, which are biosynthesized as result of the action of different types of 17 β -HSD enzymes. 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 3 (17 β -HSD3) catalyzes the final step in the steroidogenesis of the potent androgen testosterone (T) by selectively reducing the C17 ketone of 4-androstene-3,17-dione (D4-dione) with NADPH as a cofactor, located in testis and prostate tissue [53]. 17 β -HSD3 is almost exclusively located in testis, suggesting its potential involvement in gonadal T biosynthesis. In addition, the expression of 17 β -HSD3 mRNA in cancerous prostate biopsies was found to be 30-fold higher than in normal tissue [54]. Therefore, the role of 17 β -HSD3 in T biosynthesis makes this enzyme an attractive molecular target of a small-molecule inhibitor for the treatment of prostate cancer [55].

Harada and co-workers [10] claimed about the discovery of new rhodanine and oxazolidinones (confirming plural) as novel series of 17 β -HSD3 inhibitors based on an in-house screening compound. *In silico* data has shown that structure-activity relationship (SAR) presented some features about pharmacokinetic properties in these compounds, which led to a discovery of potent 17 β -HSD3 inhibitors.

The authors reported structure-activity relationship (SAR) in order to develop novel rhodanine and oxazolidinone analogs. The organic synthesis was achieved by using commercially available amines (RNH₂) as building blocks to prepare a series of 3,5-disubstituted rhodanine derivatives in a two-step process, combining Holmberg method followed by Knoevenagel condensation with a benzaldehyde [56, 57]. The Biaryl-substituted oxazolidinone series was prepared by treatment of arylamines with dithiocarbamate, followed by intramolecular cyclization with acetic anhydride. This process was followed by generation of its correspondent carbamates by using glycolate ester to treat arylamines/arylisocyanates. Then, addition of sodium methoxide in toluene was proceeded, followed by azeotropic removal of the generated alcohol under reflux, yielding the 3-substituted 2,4-oxazolidinones. Lastly, they used Knoevenagel condensation of the oxazolidinones with aryl aldehydes to generate its corresponding 5-arylidene derivatives [10].

Some tests trying to incorporate other heteroatoms such as oxygen and nitrogen at the 4-position of the cyclohexyl group were found to decrease the potency. Original compound (R = 4-MeO-Ph) presented nanomolar potency of 14. Introduction of sterically bulky and hydrophobic moieties at rhodanine 3-position appears to be more effective for enzymatic inhibitory activity and this could be explained because of the hydrophobic bind pocket in the enzyme, which is important to the interaction with this compound [10].

Six compounds presented a single-digit nanomolar concentration (N-phenyl 2b, 2c, 2f, 2g, 2h and 2i) bearing a halogen, an alkyl and a haloalkyl substituent at C-4 position of the aromatic ring. In order to investigate electrostatic properties of the aromatic ring, they compared the unsubstituted phenyl and a 4-position electro-withdrawing substituent (CN), and the outcome suggests that aromatic ring electronic configuration have no effect against the activity.

Replacement of the 2-thioxo group by a 2-oxo group in the reference compound 2a appears to

maintain similar activity. This substitution was important also for the aqueous solubility and bioavailability, since the 2-oxo group showed better physicochemical features than the 2-thioxo group. Oxazolidinones derivatives bearing substituents such as ester, amides, alkylamino, retro-amides and thioether have presented favorable biological activity. On the other hand, changing substituents like carbonyl and methylsulfonyl groups appeared not to be tolerated. Thus, groups with acidic functionalities such as a carboxyl and a sulfamoyl resulted in a complete loss of enzyme inhibition.

Finally, the experiments performed by these researchers had focused on the optimization of phenol portion of the oxazolidinone derivatives. Concerning substitution at C-3 and C-5 position, the main results are listed on table 1. Compounds with mono- or di-halo substituents on the aromatic ring were observed to present an improvement of activity, specially the 3-chloro-5-fluoro-4-hydroxyphenyl derivative (11a), which presented the best nanomolar activity against 17 β -HSD3, with an IC₅₀ value of 1 nM. On the other hand, substituents like cyano, carboxyl and (N,N-dimethylamino)methyl were not tolerated, provoking loss of activity. Based on these findings, authors suspect that factors such as optimal size and lipophilic effect of substituents may cause influence in enzyme inhibition and intramolecular H-bonding between 4-hydroxyl and 3-substituent prevented interaction with a key amino acid residue in the pore region of enzyme, causing loss of activity.

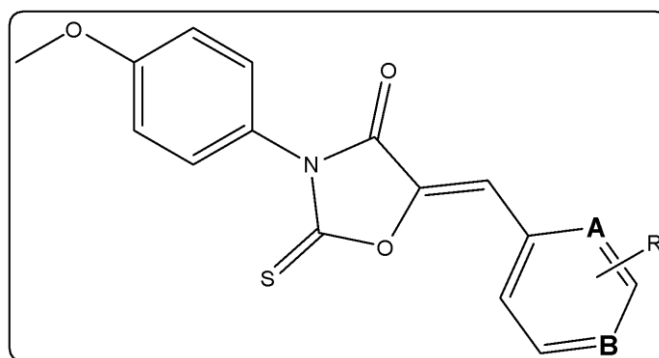


Figure 8. Chemical structure of the base-molecule designed for prostate cancer treatment.

IC ₅₀ (nM)	B	A	R	Compound
2	C	CH	3-F, 4-OH	11d
4	C	CH	3-Cl, 4-OH	11e
5	C	CH	2-Cl, 4-OH	11f
5	CH	C	3,5-DiF, 4-OH	11h
1	C	CH	3-Cl, 5-F, 4-OH	11i

Table 1: Oxazolidinone derivatives demonstrate a single-digit nanomolar concentration in HeLa cell transfected with 17 β -HSD3.

In general, these compounds did not show any undesired inhibition of the oxidative isoenzyme 17 β -HSD type 2 or 17 β -HSD type 1, which converts the less potent estrogen estrone (E1) into the biologically active estradiol (E2). In terms of selectivity over nuclear receptors such as androgen receptor (AR), estrogen receptor alpha (ER α), and glucocorticoid receptor (GR), intersection with the nuclear receptors was also not observed for these compounds. These chemotypes showed excellent selectivity over 17 β -HSD isoenzymes and nuclear receptors [58].

17 β -HSD3 enzyme is considered a promising biological target for inhibition to prevent and treat hormone-dependent disorders such as prostate cancer. The SAR studies have proposed several oxazolidinones derivatives that presented potent and selective inhibition with reduced androgenic effects [55]. Authors have developed a very effective synthetic route, which have resulted in various oxazolidinone analogs. Among them, 5-(3-chloro-5-fluoro-4-hydroxybenzylidene)-3-(4-

methoxyphenyl)-2-thioxo-1,3-oxazolidin-4-one (11i) is one of the most potent 17 β -HSD3 inhibitors reported so far, with an IC₅₀ value of 1.0 nM (human cell-based assay). Despite such remarkable advances, further studies are necessary to provide better alternatives for prostate cancer therapy.

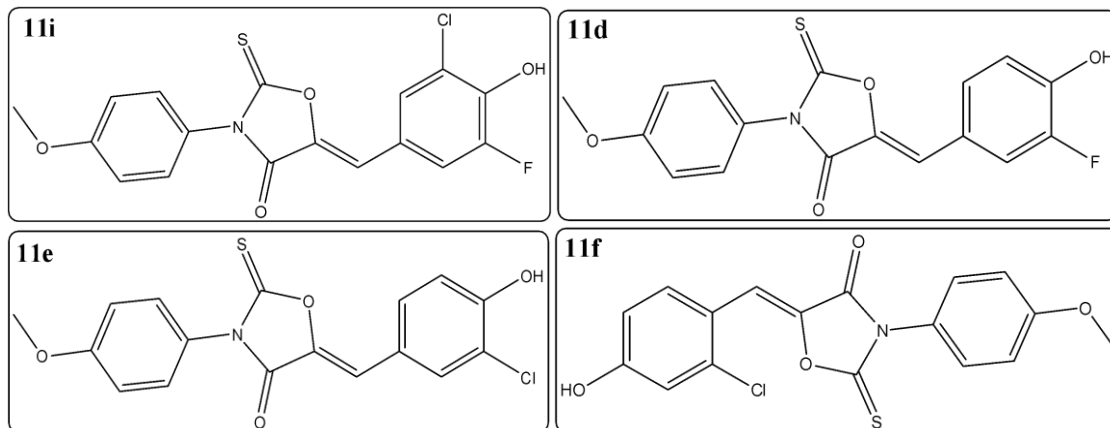


Figure 9. Chemical structures of the more effective molecules designed by Harada and coworkers (2012).

Oxazolines as alternative to chemotherapeutics resistance and hypoxia.

Patenaude and coworkers [11] have developed a new class of antimitotics named as *N*-phenyl-*N'*-2-(chloroethyl)ureas (CEU). These molecules are able fight some types of cancer by displaying important remarks such as growth inhibition [59, 60, 61, 62, 63], interruption of cancer cell migration *in vitro* and display of antitumor and antiangiogenic characteristics *in vivo* [62, 64]. CEU are soft alkylating agents that are unreactive to most cellular nucleophiles, such as DNA and glutathione [60, 65]. Previous clinical trials suggests that CEU are able to covalently bind to a limited number of proteins, especially to β -tubulin isoform-2, which implies in microtubule network disrupting, blocking cell division at G₂/M phase [66]. This study has focused on reporting the identification of a subset of cytotoxic CEU and their corresponding oxazolines (CEU bioisosteres), which is not β -tubulin alkylating (N- β TAC). N- β TACs displays an increased cytotoxicity on hypoxia-resistant fibrosarcoma HT1080 cells by mitochondrial DNA depletion [11]. In this context, the aim of this work was to investigate the mechanism about cytotoxic and growth inhibition properties of β TAC and the newly discovered subset of CEUs and its bioisosteres oxazolines named as N- β TAC, on cells resistant to chemotherapeutics and hypoxia.

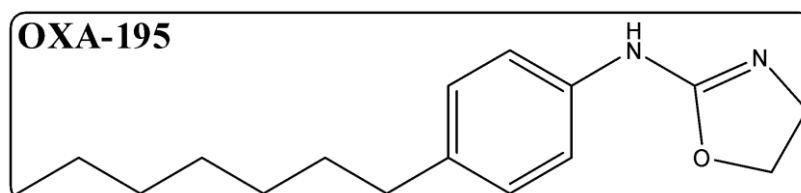


Figure 10. Chemical structure of OXA-195.

The main outcome achieved by the authors consists on the ability of oxazolines to trigger apoptosis in HT1080 cells by activating caspase-3, -8 and -9 through intrinsic and extrinsic pathways in response to OXA-195 (CEU-027 bioisostere) which can be activated by both β TAC and N- β TAC [11]. Hence, authors observed cytochrome *c* release from mitochondria by exposure to OXA-195 in HT1080 and MDA-MB-231 cells.

Authors have found some interesting data about the action of these molecules at mitochondrial level. It

is well known that ROS production and collapse of mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) occur in the initial stages of apoptosis [67]. According to data obtained from flow cytometry technique, HT1080 cells exposed to OXA-195 displayed an increased percentage of cell population showing time-dependent $\Delta\Psi_m$ loss and increased ROS production. However, other β TAC and N- β TAC did also induce $\Delta\Psi_m$. When performing a deeper investigation, they found that CEU and oxazolines were able to modulate different ROS production by damaging the mitochondrial respiratory chain (MRC), suggesting that cell death cascade are induced by OXA-195 and CEU. In this context, the cytotoxicity of N- β TAC was increased in cells HT1080 who were depleted of mitochondrial DNA when compared with wild type HT1080 cells. Depletion of mitochondrial DNA is reported as cancer resistance factor to chemotherapeutic drugs [68], despite its mechanism is not fully understood. It is possible that depletion of mitochondrial DNA appears to be involved on the etiology of cancer by upregulating gene expression linked to glycolysis, apoptosis blocking and enhancement of the invasive capacity of cancer cells [69]. These referred events seem to play a pivotal role in the survival of tumors exposed to hypoxic environment.

Moreover, Patenaude and co-workers have found that OXA-195 was able to trigger a quick swelling of rat liver mitochondria through an atypical mechanism, suggesting that OXA-195 can induce an unusual PTP-dependent apoptosis process [11]. VDAC-1 is a protein channel located on the outer membrane of mitochondria. In this work authors has shown VDAC-1 as a potential target to N- β TAC. This protein channel is capable of allowing metabolites passage between cytosol and internal compartments of mitochondria [70]. VDAC-1 is proposed to allow cytochrome *c* passage [71], which is determinant to stimulate membrane permeability transition.

Patenaude and co-workers identified a new class of soft alkylating agents (N- β TAC) which are capable of induce apoptosis and microtubule depolymerization of cancer cells. This study has proposed an alternative therapeutic choice by using N-BTAC molecules as backbone of new antitumor agents in order to fight chemoresistant/hypoxia-resistant cancer cells. More studies are necessary to investigate the understanding of signaling pathways involved in such resistance mechanisms [11].

TABLE 2

Table legend: Main oxazolidinone derivatives cancer research outcomes in pre-clinical state reported to date.

Conclusion

Oxazolidinones are versatile molecules widely used on clinical trials at several important fields. Besides antimicrobial activity [72], there are reports about their effects on monoamine oxidase playing a crucial role at neurodegenerative diseases therapeutics [73], and an antiviral anti-HIV role as well [74]. Linezolid was the first oxazolidinone derivative approved by FDA for MRSA treatment [75]. Regarding oxazolidinone derivatives as antitumor agent, the main pathways observed in literature so far consist of these small organic molecules acting as partial agonist of PPAR γ , 17 β -HSD enzyme inhibitor, sphingolipid signaling pathway and even on ceramide metabolism. These referred mechanisms of action trigger different and effective cell responses such as apoptosis, cell cycle arrest, senescence, DNA fragmentation and hormone biosynthesis regulation, in case of hormone-dependent cancer development. In this context, studies involving clinical trials revealed significant importance about its anticancer properties against lots of different cell lines, including solid and hematopoietic cancer. Among all selected cancer cell lines present in this review, breast cancer (MCF-7) appears to be very sensitive to oxazolidinone derivatives effects. In addition, sixteen different molecules displayed significant activity in this cancer cell type in the same study [17]. Compound OXA-195 was able to trigger apoptosis in MDA-MB-231 cancer cells by generating cytochrome *c* release in breast cancer cells. In the same work, the research group suspects that OXA-195 is able to induce an unusual PTP-dependent apoptosis process [11].

Prostate cancer has also displayed interesting sensitivity against oxazolidinone derivatives. One report about cytoazone-linezolid hybrids bearing acryl or ethyl groups showed they were able to target directly cell cycle progression inducing cellular senescence and apoptosis in DU145 cancer cell line [33]. These findings are in line with Harada and co-workers, who reported the use of oxazolidinones to an attractive biological target by inhibition of 17 β -HSD enzyme for treatment and prevention of hormone-dependent disorders, such as prostate cancer [10].

Structure activity relationship (SAR) is a very useful tool in order to predict molecular interactions between drug and its ligand. Harada et al [10] and Pal et al [17] have reported that previous SAR studies seem to be crucial to understand these interactions, propitiating the discovery of more potent molecules before organic synthesis step. For instance, researchers were able to achieve very effective molecules displaying a single-digit nanomolar concentration when performing pertinent biological assays [10].

Concerning structural modifications among oxazolidinone derivatives reported on this review, emphasis was given for those bearing a phenyl ring on its structure. It was observed that molecules bearing a phenyl ring displayed good cytotoxic profile on anticancer biological assays. This can be explained by the great variety of possible substituents that can be placed at different positions of this ring. These modifications may contain specific electron donating or withdrawing characteristic atoms. Moreover, substituted oxazolidinone derivatives displayed a certain pattern concerning its biological activity when evaluated against several cancer cell lines. For instance, hydroxyl group at 4-position appears to be very effective at 17 β -HSD enzyme inhibition when combined with some halogens linked to a phenyl ring. This referred molecule displayed 1 nM concentration being considered the most potent 17 β -HSD enzyme inhibitor so far. In the same study [10], other molecules bearing a 4-position hydroxyl group and fluoro/chlorine group have presented a single-digit nanomolar concentration for enzyme inhibition as well. These data have shown the antineoplastic role of oxazolidinone derivatives, and despite some mechanisms are still unclear, they provide new perspectives about how these molecules could be used in the future for cancer therapy.

Conflict of interest

The author(s) confirm that this article has no conflict of interest.

Acknowledgements

Declared none.

References

1. Globocan IARC, 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx Accessed in 26/03/2017;
2. Introduction to cancer chemotherapeutics. **Chemical Reviews** 109; 7 2009;
3. Robert B. Fugitt, Raymond W. (1978). Luckenbaugh. 5-halomethyl-3-phenyl-2 oxazolidinones. **U.S. patent**, 4 (128), 654;
4. R. B. Fugitt and L. C. Martinelli. Synthesis and Anticancer Activity of 5-(Propargyloxy-methy-1)-2-oxazolidinones. **Journ Pharm. Scien.** V. 62, 6, 1973;
5. Braun, Marie-Gabrielle; Richard Elliot; Emily Hanan; Heald, Robert Andrew; Calum Macleod; Staben, Stevens T. Benzoxazepin oxazolidinone compounds and methods of use. US Patent 2017 WO2017001645 A1.

6. Liu Z, Li D, Zhao W, Zheng X, Wang J, et al. (2012). A Potent Lead Induces Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells. *PLoS ONE* 7(6)
7. Bajaj S; Asati V; Singh J; Roy PP. 1,3,4-Oxadiazoles: An emerging scaffold to target growth factors, enzymes and kinases as anticancer agents. *Eur J Med Chem.* 2015 Jun 5;97:124-41
8. X.M. Zhang, M. Qiu, J. Sun, Y.B. Zhang, Y.S. Yang, X.L. Wang, H.L. Zhu, Synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies of 1,3,4-oxadiazole derivatives possessing 1,4-benzodioxan moiety as potential anticancer agents, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 6518-6524
9. Singh, A.; Hyun-Joon Ha, Jungchan Park, Jun Hee Kim, Won Koo Lee. 3,4-Disubstituted oxazolidin-2-ones as constrained ceramide analogs with anticancer activities. *Bioorganic and Med. Chem.* 19 6174-6181 (2011).
10. Harada K, Hideki Kubo, Jun Abe, Mari Haneta, Arnel Conception, Shinichi Inoue, Satoshi Okada, Kazuhiko Nishioka. Discovery of potent and orally bioavailable 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 inhibitors. *Bioorganic and Med. Chem.* 20 3242-3254 2012.
11. Patenaude A., Re´na G. Deschesnes, Jean L.C. Rousseau, E´ric Petitclerc, Jacques Lacroix, Marie-France Coˆte´, and Rene´ C.-Gaudreault. New Soft Alkylating Agents with Enhanced Cytotoxicity against Cancer Cells Resistant to Chemotherapeutics and Hypoxia. *Cancer Res.* 5, 67 2007
12. Kenneth K. Chan, Phillip S. Hong, Kendra Tutsch, and Donald L. Trump. Clinical Pharmacokinetics of Cyclophosphamide and Metabolites with and without SR-2508. *Cancer Research* 54, 6421-6429, December 15, 1994
13. Koeffler, H.P. Peroxisome Proliferator-activated receptor γ and cancers. *Clin. Cancer Res.*, 2003, 9, 1-9.
14. Li, J.; Simpson, L.; Takahashi, M.; Miliareis, C.; Myers, M.P.; Tonks, N.; Parsons, R. The PTEN/MMAC1 tumor suppressor induces cell death that is rescued by the AKT/protein kinase B. oncogene. *Can. Res.*, 1998, 58, 5667-5672
15. Yang, F.G.; Zhang, Z.W.; Xin, D.Q.; Shi, C.J.; Wu, J.P.; Guo, Y.L.; Guan, Y.F. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands induce cell cycle arrest and apoptosis in human renal carcinoma cell lines. *Acta Pharmac. Sin.*, 2005, 26, 753-761.
16. Tontonoz, P.; Singer, S.; Forman, B.M.; Sarraf, P.; Fletcher, J.A.; Fletcher, C.D.; Brun, R.P.; Mueller, E.; Altok, S.; Oppenheim, H.; Evans, R.M.; Spiegelman, B.M. Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferatoractivated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1997, 94, 237-241.
17. Tanushree Pal, Hardik Joshi and C.S.Ramaa Design and Development of Oxazol-5-Ones as Potential Partial PPAR- γ Agonist Against Cancer Cell Lines *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2014, 14, 872-883
18. Daniel, K. The Glitazones: Proceed with caution. *Western J. Med.* **2000**, 173(1), 54-57.
19. Williams, D.A.; Lemke, T.L.; *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. B.I. Publication Pvt. Ltd, New Delhi. 645, **2005**
20. Guasch, L.; Sala, E.; Castell-Auvi, A.; Cedo, L.; Lied, K.R.; Wolber, G.; Muehlbacher, M.; Mulero, M.; Pinent, M.; Arde, A.; Valls, C.; Pujadas, G.; Garcia-Vallve, S. Identification of PPAR

gamma Partial Agonists of Natural Origin (I): Development of a virtual screening procedure and *in vitro* validation. *PLOS One*, **2012**, 7(11), e50816.

21. Mesaik, M.A.; Rahat, S.; Khan, K.M.; Zia, U.; Choudhary, M.I.; Murad, S.; Ismail, Z.; Rahman, A.; Ahmad, A. Synthesis and immunomodulatory properties of selected oxazolone derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 2049-2057.

22. Khan, K.M.; Mughal, U.R.; Khan, M.T.; Zia, Ullah.; Perveen, S.; Choudhary, M.I. Oxazolones: New tyrosinase inhibitors; synthesis and their structure-activity relationships. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, 14, 6027-6033.

23. Perron, F.M.; Pierré, A.; Burbridge, M.; Guilbaud, N. Novel Bicyclic Oxazolone Derivatives as Anti-Angiogenic Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, 12, 1463-1466.

24. Villacorta, L.; Schopfer, F.J.; Zhang, J.; Freeman, B.A.; Chen, Y.E. PPAR gamma and its ligands: Therapeutic implications in cardiovascular disease. *Clin. Sci.*, **2009**, 116, 205-218.

25. Schwartz, A.V.; Sellmeyer, D.E.; Vittinghoff, E.; Palermo, L.; Lecka, C.B.; Feingold, K.R.; Strotmeyer, E.S.; Resnick, H.E.; Carbone, L.; Beamer, B.A.; Park, S.W.; Lane, N.E.; Harris, T.B.; Cummings, S.R. Thiazolidinedione Use and Bone Loss in Older Diabetic Adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2006**, 91(9), 3349-3354.

26. Guasch, L.; Sala, E.; Valls, C.; Blay, M.; Mulero, M.; Arola, L.; Pujadas, G.; Garcia-Vallve, S. Structural insights for the design of new PPARgamma partial agonists with high binding affinity and low transactivation activity. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **2011**, 25, 717-728.

27. Zou, G.; Gao, Z.; Wang, J.; Zhang, Y.; Ding, H.; Huang, J.; Chen, L.; Guo, Y.; Jiang, H.; Shen, X. Deoxyelephantopin inhibits cancer cell proliferation and functions as a selective partial agonist against PPAR γ . *Biochem. Pharmacol.*, **2008**, 75, 1381- 1392.

28 Yin, Y.; Russell, R.G.; Dettin, L.E.; Bai, R.; Wei, Z.L.; Kozikowski, A.P.; Kopelovich, L.; Glazer, R.I. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and δ Agonists Differentially Alter Tumor Differentiation and Progression during Mammary Carcinogenesis. *Can. Res.*, **2005**, 65(9), 3950-3957.

29. Campos J.F.; Pereira, M.C.; Sena, W.L.B.; Martins, C.G.B.; Oliveira, J.F.; Amorim, C.A.C.; Rego, M.J.B.M.; Pitta, M.G.R.; Lima, M.C.A.; Pitta, M.G.R.; Pitta, I.R.; Synthesis and *in vitro* anticancer activity of new 2-thioxo-oxazolidin-4-one derivatives. **Pharmacological Reports** xxx (2017) xxx-xxx

30. H. Fiaux, D.A. Kuntz, D. Hoffman, R.C. Janzer, S. Gerber-Lemaire, D.R. Rose, et al., Functionalized pyrrolidine inhibitors of human type II alpha-mannosidases as anti-cancer agents: optimizing the fit to the active site, *Bioorg Med Chem.* 16 (August (15)) (2008) 7337–7346.

31. Z. Schug, F. Gonzalez, R. Houtkooper, F. Vaz, E. Gottlieb, BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane, *Cell Death Differ* 18 (3) (2011) 538–548.

32 C. Garcia-Perez, S. Roy, S. Naghdi, X. Lin, E. Davies, G. Hajnoczky, Bid-induced mitochondrial membrane permeabilization waves propagated by local reactive oxygen species (ROS) signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109 (12) (2012) 4497–4502.

33. Naresh, A; Maddimsetti Venkateswara Rao, Sudha Sravanti Kotapalli, Ramesh Ummanni, Batchu Venkateswara Rao. Oxazolidinone derivatives: Cytosaxone-Linezolid hybrids induces apoptosis and senescence in DU145 prostate cancer cells. *Eur. Journ. Med. Chem.* 80 295-307. 2014

34. A.P. Piccionello, R. Musumeci, C. Cocuzza, C.G. Fortuna, A. Guarcello, P. Pierro, A. Pace, *European Journal of Medicinal Chemistry* 50 (2012) 441 e 448;
35. H. Kakeya, M. Morishita, H. Koshino, T. Morita, K. Kobayashi, H. Osada, *The Journal of Organic Chemistry* 64 (1999) 1052e1053.
36. P.H. Carter, J.R. LaPorte, P.A. Scherle, C.P. Decicco, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13 (2003) 1237e1239
37. R. Ummanni, E. Jost, M. Braig, F. Lohmann, F. Mundt, C. Barett, T. Schlomm, G. Sauter, T. Senff, C. Bokemeyer, H. Sultmann, C. Meyer-Schwesinger, T.H. Brummendorf, S. Balabanov, *Molecular Cancer* 10 (2011) 129.
38. (a) Kolter, T.; Sandhoff, K. *Chem. Soc. Rev.* 1996, 25, 371; (b) Dickson, R. C. *Ann. Rev. Biochem.* 1998, 67, 27; (c) Kolter, T.; Sandhoff, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* 1999, 38, 1532; (d) Brodeser, S.; Sawatzki, P.; Kolter, T. *Eur. J. Org. Chem.* 2003, 2021; (e) Liao, J.; Tao, J.; Lin, G.; Liu, D. *Tetrahedron* 2005, 61, 4715; (f) Ogretmen, B.; Hannun, Y. A. *Nat. Rev. Cancer* 2004, 4, 604; (g) Pyne, N. J.; Pyne, S. *Nat. Rev. Cancer* 2010, 10, 489.
39. (a) Pettus, B. J.; Chalfant, C. E.; Hannun, Y. A. *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1585, 114; (b) Radin, N. S. *Bioorg. Med. Chem.* 2003, 11, 2123; (d) Hannun, Y. A.; Obeid, L. M. *Nat. Rev. Cell Biol.* 2008, 9, 139; (e) Saddoughi, S. A.; Song, P.; Ogretmen, B. *Subcell. Biochem.* 2008, 49, 413; (f) Schiffmann, S.; Sandner, J.; Birod, K.; Wobst, I.; Angioni, C.; Ruckhaberle, E.; Kaufmann, M.; Ackermann, H.; Lotsch, J.; Schmidt, H.; Geisslinger, G.; Grosch, S. *Carcinogenesis* 2009, 30, 745.
40. Kinloch, R. A.; Treherne, J. M.; Furness, L. M.; Hajimohamadreza, I. *Trends Pharmacol. Sci.* 1999, 20, 35.
41. (a) Hannun, Y. A. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 3125; (b) Hannun, Y. A. *Science* 1996, 274, 1855; (c) Sawai, H.; Hannun, Y. A. *Chem. Phys. Lipids* 1999, 102, 141
42. Wang, C. Y.; Cusack, J. C., Jr.; Liu, R.; Baldwin, A. S., Jr. *Nat. Med.* 1999, 5, 412; (b) Burow, M. E.; Weldon, C. B.; Tang, Y.; Navar, G. L.; Krajewski, S.; Reed, J. C.; Hammond, T. G.; Clejan, S.; Beckman, B. S. *Cancer Res.* 1998, 58, 4940.
43. (a) Webb, L. M.; Arnholt, A. T.; Venable, M. E. *Mol. Cell. Biochem.* 2010, 337, 153; (b) Modrak, D. E.; Leon, E.; Gold, D. V. *Mol. Cancer Res.* 2009, 7, 890.
44. Bourbon, N. A.; Sandirasegarane, L.; Kester, M. J. *Biol. Chem.* 2002, 277, 3286.
45. (a) Selzner, M.; Bielawska, A.; Morse, M. A.; Rudiger, H. A.; Sindram, D.; Hannun, Y. A.; Clavien, P. A. *Cancer Res.* 2001, 61, 1233; (b) Fillet, M.; Bentires-Alj, M.; Deregowski, V.; Greimers, R.; Gielen, J.; Piette, J.; Bours, V.; Merville, M.-P. *Biochem. Pharmacol.* 2003, 65, 1633.
46. Ha, H.-J.; Hong, M. C.; Ko, S. W.; Kim, Y. W.; Lee, W. K.; Park, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, 16, 1880.
47. Reynolds, C. P.; Maurer, B. J.; Kolesnick, R. N. *Cancer Lett.* 2004, 206, 169;
48. Jarvis, W. D.; Fornari, F. A., Jr.; Traylor, R. S.; Martin, H. A.; Kramer, L. B.; Erukulla, R. K.; Bittman, R.; Grant, S. J. *Biol. Chem.* 1996, 271, 8275;
49. Fillet, M.; Bentires-Alj, M.; Deregowski, V.; Greimers, R.; Gielen, J.; Piette, J.; Bours, V.; Merville, M.-P. *Biochem. Pharmacol.* 2003, 65, 1633.

50. Singh, A.; Kim, B.; Lee, W. K.; Ha, H.-J. *Org. Biomol. Chem.* 2011, 9, 1372
51. van Bokhoven, A.; Varella-Garcia, M.; Korch, C.; Johannes, W. U.; Smith, E. E.; Miller, H. L.; Nordeen, S. K.; Miller, G. J.; Lucia, M. S. *Prostate* 2003, 57, 205.
52. Poirier, D. *Curr. Med. Chem.* 2003, 10, 453.
53. Adamski, J.; Jakob, F. J. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2001, 171, 1.
54. Koh, E.; Noda, T.; Namiki, M. *Prostate* 2002, 53, 154.
55. (a) Guzi, T. J.; Liu, Yi-Tsung; Doll, R. J.; Saksena, A.; Girjavallabhan, V. M.; Pachter, J. A. U.S. Patent 20040138226, 2004.; (b) Maltais, R.; Luu-The, V.; Poirier, D. J. *Med. Chem.* 2002, 45, 640; (c) Fink, B. E.; Gavai, A. V.; Tokarski, J. S.; Goyal, B.; Misra, R.; Xiao, H. Y.; Kimball, S. D.; Han, W. C.; Norris, D.; Spires, T. E.; You, D.; Gottardis, M. M.; Lorenzi, M. V.; Vite, G. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, 16, 1532; (d) Vicker, N.; Sharland, C. M.; Heaton, W. B.; Gonzalez, A. M. R.; Bailey, H. V.; Smith, A.; Springall, J. S.; Day, J. M.; Tutill, H. J.; Reed, M. J.; Purohit, A.; Potter, B. V. L. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2009, 301, 259.
56. Radi, M.; Botta, L.; Casaluce, G.; Bernardini, M.; Botta, M. J. *Comb. Chem.* 2010, 12, 200; Holmberg, B. J. *Prakt. Chem.* 1910, 81, 451.
57. Jones, G. *Org. React.* 1967, 15, 204.
58. Harada, K.; Kubo, H.; Tanaka, A.; Kazuhiko, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, 22, 504.
59. Bechard P, Lacroix J, Poyet P, C.-Gaudreault R. Synthesis and cytotoxic activity of new alkyl-[3-(chloroethyl)ureido] benzene derivatives. *Eur J Med Chem* 1994;29:963–6.
60. Lacroix J, Gaudreault RC, Page M, Joly LP. In vitro and in vivo activity of 1-aryl-3-(2-chloroethyl) urea derivatives as new antineoplastic agents. *Anticancer Res* 1988; 8:595–8.
61. Gaudreault RC, Lacroix J, Page M, Joly LP. 1-Aryl-3-(2-chloroethyl) ureas: synthesis and in vitro assay as potential anticancer agents. *J PharmSci* 1988;77:185–7.
62. Petitclerc E, Deschesnes RG, Cote MF, et al. Antiangiogenic and antitumoral activity of phenyl-3-(2-chloroethyl)ureas: a class of soft alkylating agents disrupting microtubules that are unaffected by cell adhesion-mediated drug resistance. *Cancer Res* 2004;64: 4654–63.
63. Gaudreault RC, Alaui-Jamali MA, Batist G, Bechard P, Lacroix J, Poyet P. Lack of cross-resistance to a new cytotoxic arylchloroethyl urea in various drug-resistant tumor cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 1994;33:489–92.
64. Miot-Noirault E, Legault J, Cachin F, et al. Antineoplastic potency of arylchloroethylurea derivatives in murine colon carcinoma. *Invest New Drugs* 2004;22: 369–78.
65. Mounetou E, Legault J, Lacroix J, C.-Gaudreault R. Antimitotic antitumor agents: synthesis, structureactivity relationships, and biological characterization of N-aryl-N-(2-chloroethyl)ureas as new selective alkylating agents. *J Med Chem* 2001;44:694–702.
66. Legault J, Gaulin JF, Mounetou E, et al. Microtubule disruption induced in vivo by alkylation of h-

tubulin by 1-aryl-3-(2-chloroethyl)ureas, a novel class of soft alkylating agents. *Cancer Res* 2000;60:985–92.

67. Fleury C, Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 2002;84:131–41.

68. Singh KK, Russell J, Sigala B, Zhang Y, Williams J, Keshav KF. Mitochondrial DNA determines the cellular response to cancer therapeutic agents. *Oncogene* 1999; 18:6641–6.

69. Lee HC, Yin PH, Lin JC, et al. Mitochondrial Genome Instability And mtDNA depletion in human cancers. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1042:109–22.

70. Lemasters JJ, Holmuhamedov E. Voltage-dependent anion channel (VDAC) as mitochondrial governor thinking outside the box. *BiochimBiophys Acta* 2006; 1762:181–90.

71. Tsujimoto Y, Shimizu S. The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis. *Biochimie* 2002;84:187–93.

72. M. Rami, R. Macherla, Patent Number. 7879892, 2008.

73. (a) S.J. Brickner, *Current Pharmaceutical Design* 2 (1996) 175e194; (b) T.A. Mukhtar, G.D. Wright, *Chemical Reviews* 105 (2005) 529e542; (c) K. Michalska, I. Karpiuk, M. Król, S. Tyski, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21 (2013) 577e591.

74. Akbar Ali, G. S. Kiran Kumar Reddy, Madhavi N. L. Nalam, Saima Ghafoor Anjum, Hong Cao, Celia A. Schiffer and Tariq M. Rana. Structure-Based Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationship Studies of HIV-1 Protease Inhibitors Incorporating Phenyloxazolidinones. *J. Med. Chem.* 53, 7699-7708 2010

75. (a) M.R. Barbachyn, C.W. Ford, *Angewandte Chemie International Edition* 42 (2003) 2010e2023; (b) P. Kloss, L. Xiong, D.L. Shinabarger, A.S. Mankin, *Journal of Molecular Biology* 294 (1999) 93e101; (c) S.J. Brickner, M.R. Barbachyn, D.K. Hutchinson, P.R. Manninen, *Journal of Medicinal Chemistry* 51 (2008) 1981e1990.

TABLE 2. Main oxazolidinone derivatives cancer research outcomes in pre-clinical state reported to date.

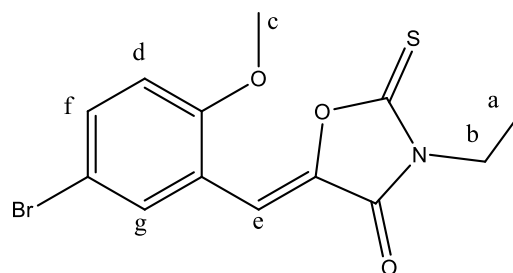
Author/year	Substituent	Biological activity evaluation (Method/concentration)	Molecule Target	Cellular Response	Cancer cell line type
Campos <i>et al.</i> , 2017	4-pyrrolidin-1-yl-benzylidene	IC ₅₀ = 15.19 μ M	Partial agonist of PPAR- γ	Apoptosis, RE and necroptosis	Jurkat cell line
Campos <i>et al.</i> , 2017	3,4-bisbenzyloxy-benzylidene	IC ₅₀ = 16.44 μ M	Partial agonist of PPAR- γ	Apoptosis, RE and necroptosis	HL-60 (human leukemia)
Pal <i>et al.</i> , 2014	3-Trifluoro methyl-phenyl	GI ₅₀ = -6.43 μ M	Partial agonist of PPAR- γ	Apoptosis	MCF-7 (Breast cancer)
Naresh <i>et al.</i> , 2014	3-fluoro-4-morpholinophenyl/ 5-Propylacrylate	IC ₅₀ = 8.69 μ M	Mitochondria membrane (cytochrome <i>c</i> releasing)	Cell cycle arrest and senescence induction	DU145 (Prostate)
Naresh <i>et al.</i> , 2014	3-fluoro-4-morpholinophenyl/ 4-MeO-phenyl	IC ₅₀ = 9.47 μ M	Mitochondria membrane (cytochrome <i>c</i> releasing)	Cell cycle arrest and senescence induction	DU145 (Prostate)
Harada <i>et al.</i> , 2012	3-Cl, 5-F, 4-OH	IC ₅₀ = 1 nM	Inhibitor of 17 β -HSD3*	Testosterone biosynthesis	Transfected HeLa cells
Harada <i>et al.</i> , 2012	3-F, 4-OH	IC ₅₀ = 2 nM	Inhibitor of 17 β -HSD3*	Testosterone biosynthesis	Transfected HeLa cells
Harada <i>et al.</i> , 2012	3-Cl, 4-OH	IC ₅₀ = 4 nM	Inhibitor of 17 β -HSD3*	Testosterone biosynthesis	Transfected HeLa cells
Harada <i>et al.</i> , 2012	2-Cl, 4-OH	IC ₅₀ = 5 nM	Inhibitor of 17 β -HSD3*	Testosterone biosynthesis	Transfected HeLa cells
Singh <i>et al.</i> , 2011	Ph-Propionyl	20 μ M**	Ceramide metabolism	Apoptosis / DNA fragmentation	HL-60 (human leukemia)
Singh <i>et al.</i> , 2011	Ph-Cyclopentanoyl	20 μ M**	Ceramide metabolism	Apoptosis / DNA fragmentation	HL-60 (human leukemia)
Singh <i>et al.</i> , 2011	<i>p</i> -nitrobenzoyl	20 μ M**	Ceramide metabolism	Apoptosis / DNA fragmentation	HL-60 (human leukemia)

*Oxazolidinone derivatives designed for treating hormone-dependent disorders. In this case, prostate cancer.

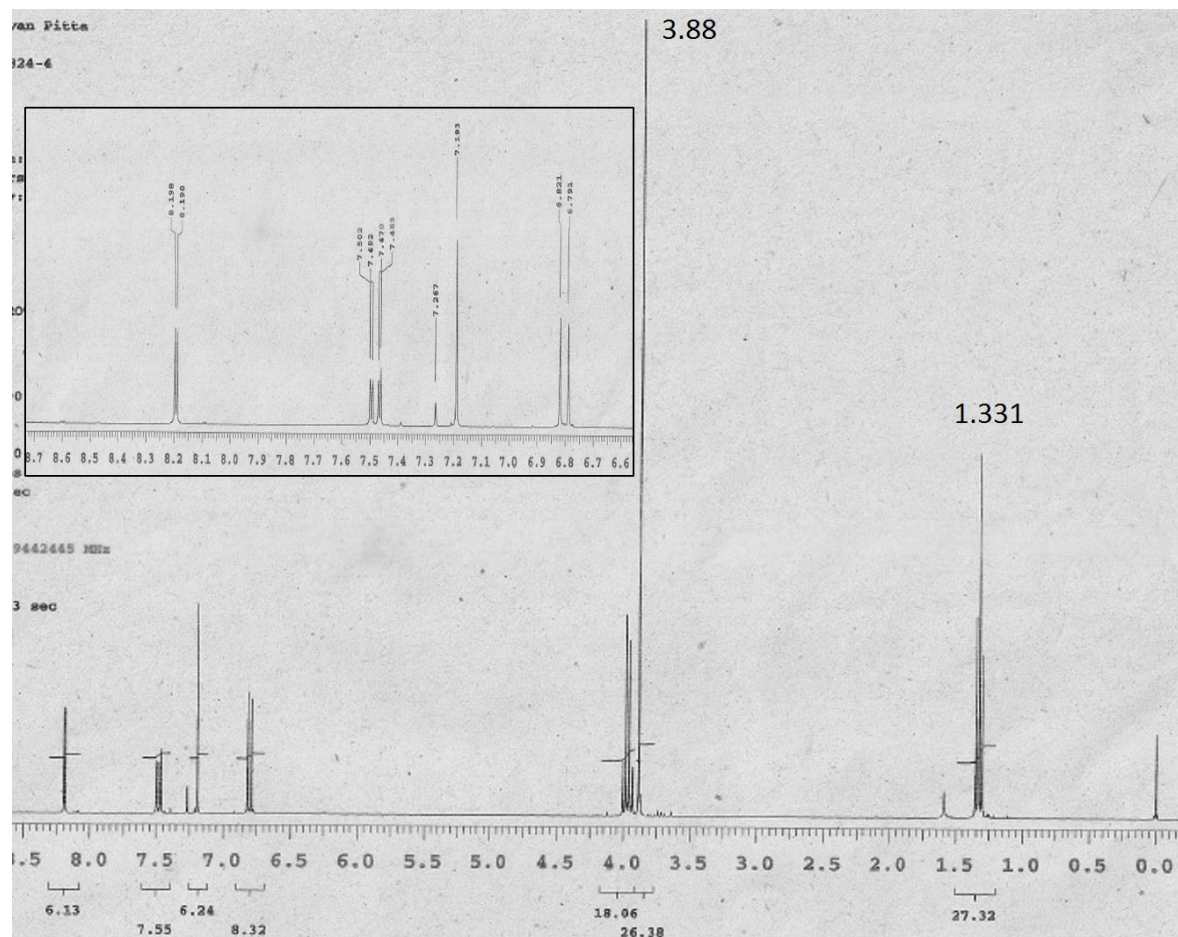
**In this work cells were treated with 20 μ M of each compound.

ANEXO A – Espectros de Ressonância Magnética Nuclear

(Z)-5-(5-bromo-2-metoxibenzilideno)-3-etil-2-tioxooxazolidin-4-ona (LPSF NBM-1)

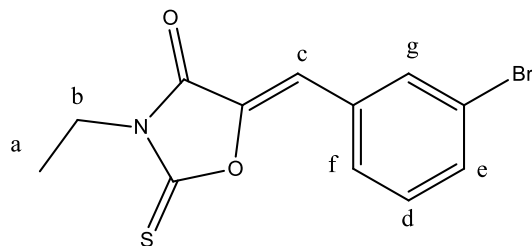


^1H RMN [300 MHz] δ , ppm, CDCl_3 : a 1.331 (t, 3H, $J = 15,7$ Hz, $j = 6,9$ Hz), b 3.88 (s; 1H), c 3.98 (m; 2H; $J = 21,6$; $j = 6,9$ Hz), d 6.81 (d; ArH), e 7.19 (s; etileno), f 7.4 (dd; ArH), g 8.19 (dd; ArH)

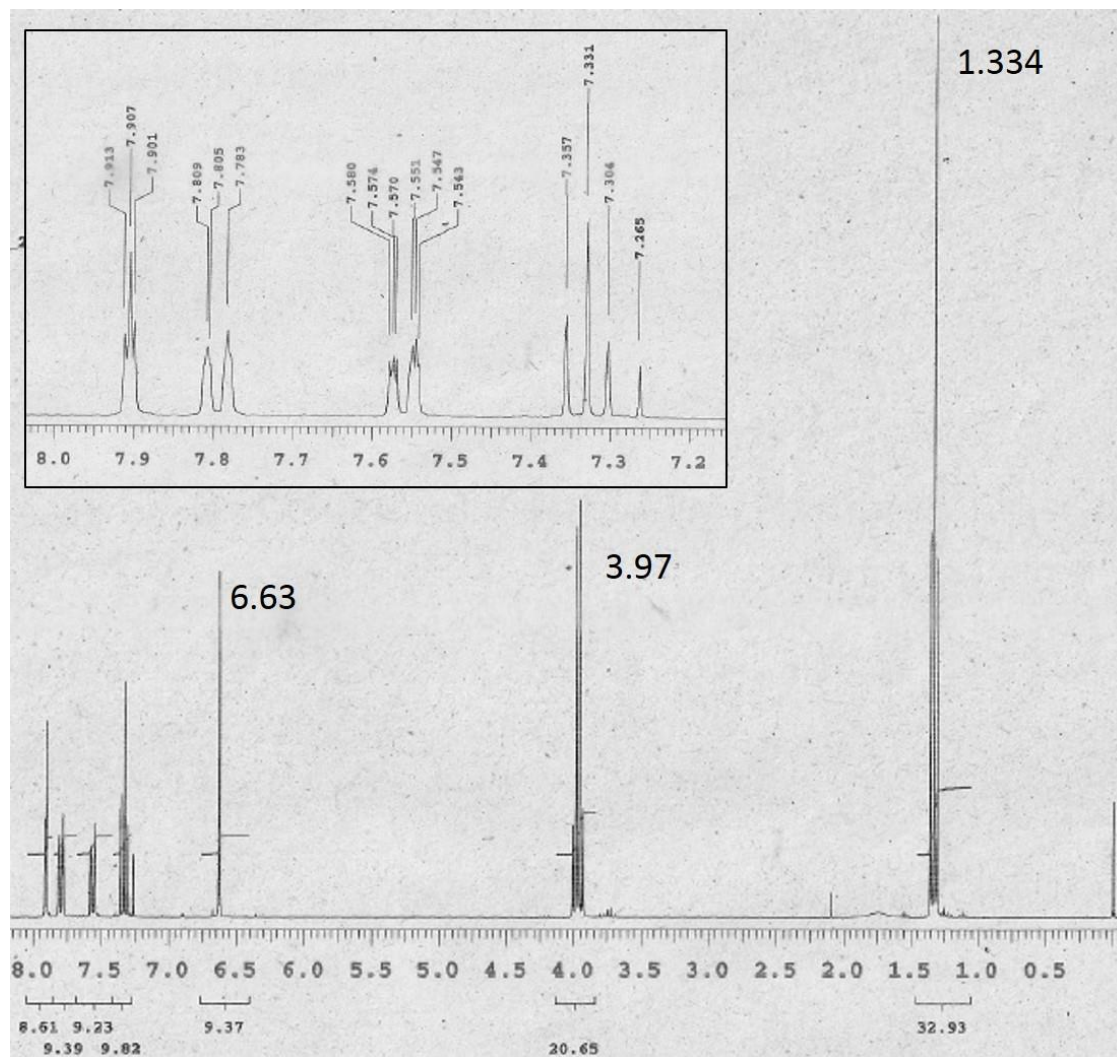


Espectro de ^1H RMN da molécula LPSF/NBM-1 (CDCl_3 , 300 MHz).

(Z)-5-(3-bromobenzilideno)-3-etil-2-tioxooxazolidin-4-ona (LPSF/NBM-2)

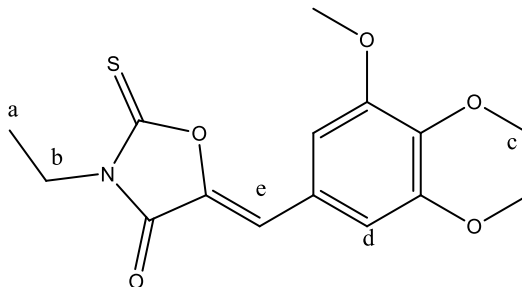


^1H RMN [300 MHz] δ , ppm, CDCl_3 : a 1.334 (t; 3H; $J = 14,1$ Hz; $j = 7,2$ Hz); b 3.97 (q; 2H; $J = 21$ Hz; $j = 6,9$ Hz); c 6.63 (s; 1H), d 7.33 (s; ArH), e 7.54 (t; ArH), f 7.57 (t; ArH)

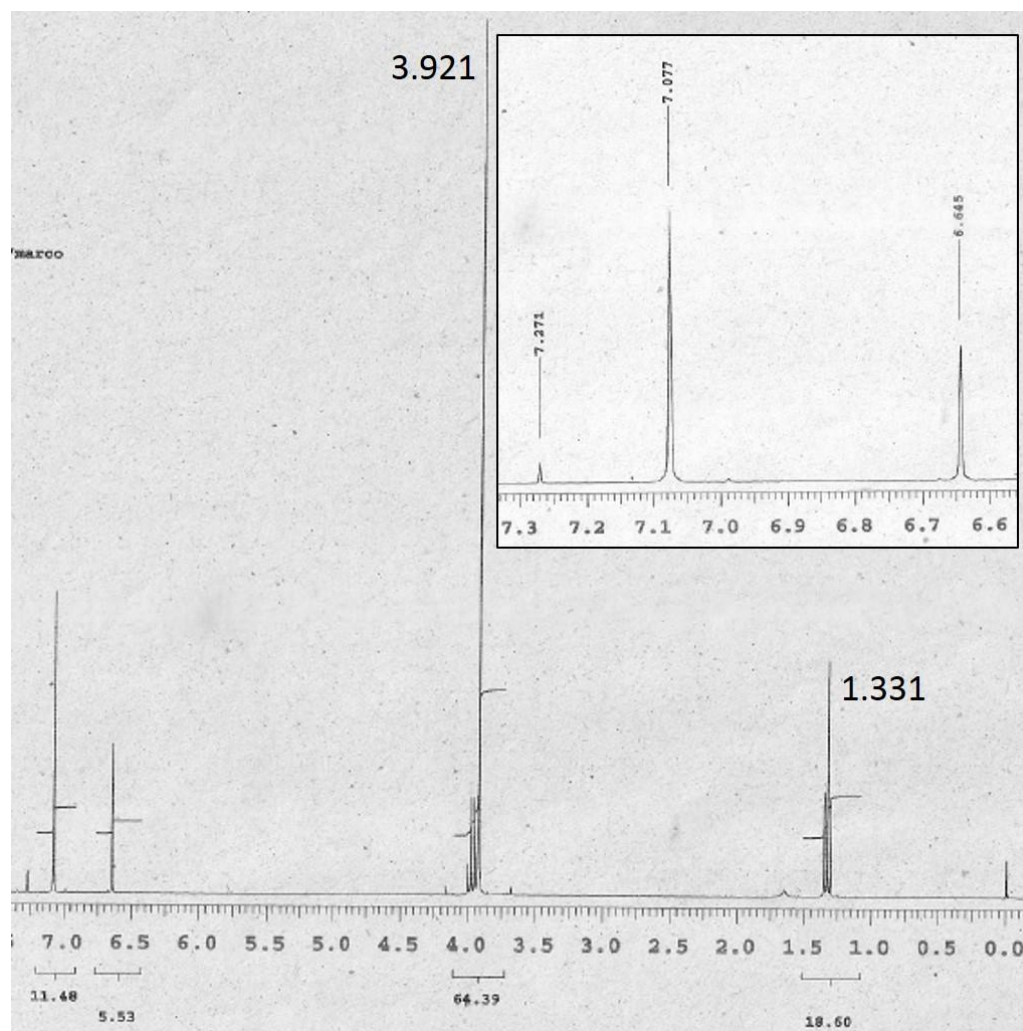


Espectro de ^1H RMN da molécula LPSF/NBM-2 (CDCl_3 , 300 MHz).

(Z)-3-etil-2-tioxo-5-(3,4,5-trimetoxibenzilideno)oxazolidin-4-ona (LPSF/NBM-3)

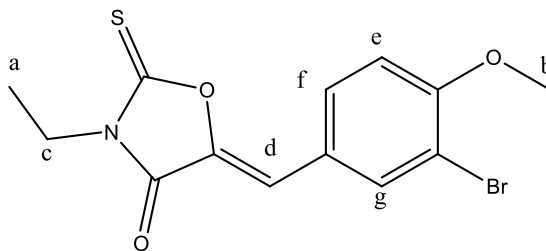


^1H RMN [300 MHz] δ , ppm, CDCl_3 : a 1.331 (t; 3H; $J = 14,1$ Hz; $j = 6,9$ Hz), b 3.921 (s; 3H), c 3.97 (q; 2H; $J = 28,2$ Hz; $j = 6,9$ Hz), d 6,64 (s; 1H), e 7.07 (s; 1H)

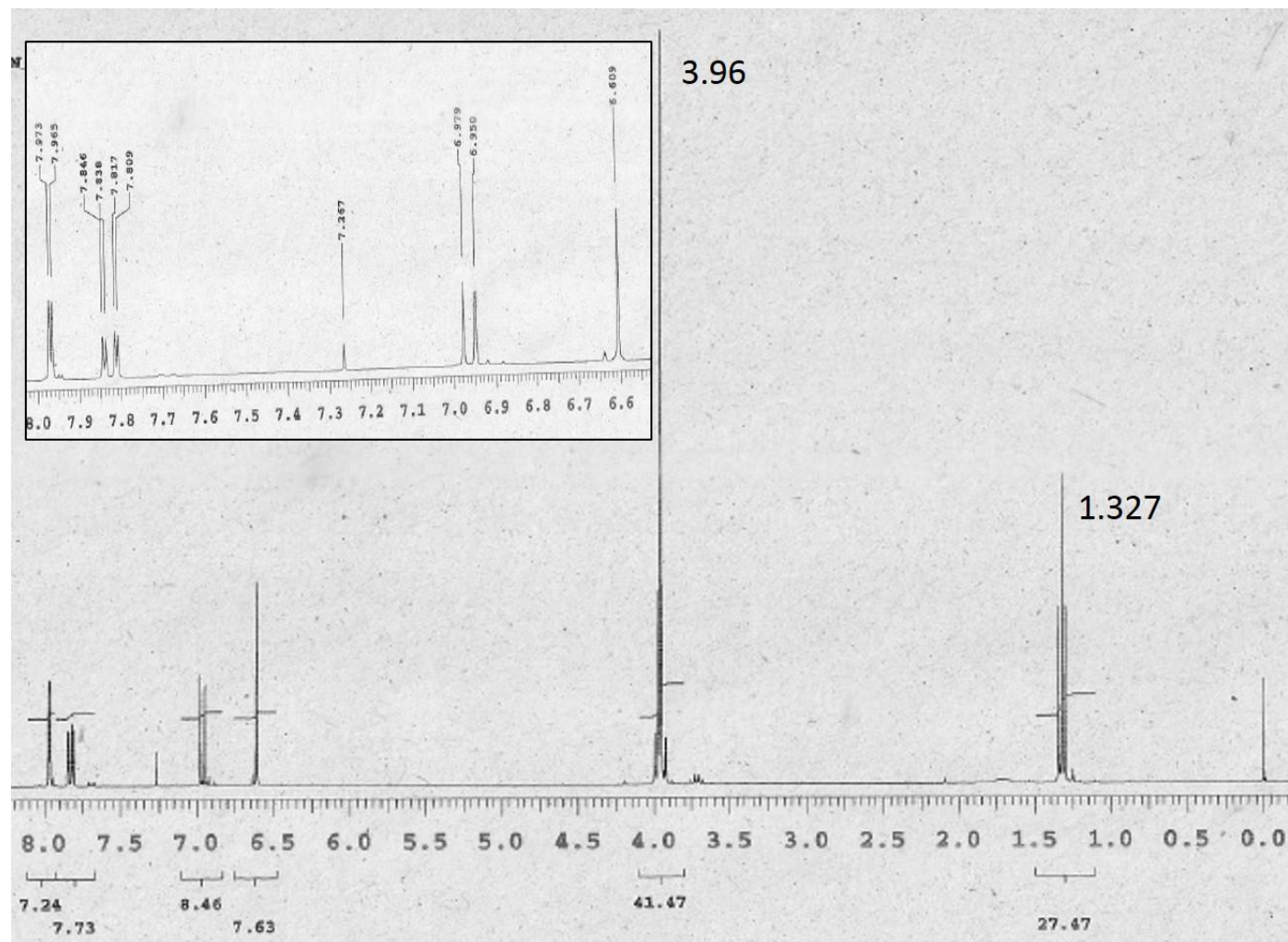


Espectro de ^1H RMN da molécula LPSF/NBM-3 (CDCl_3 , 300 MHz).

(Z)-5-(3-bromo-4-metoxibenzilideno)-3-etil-2-tioxooxazolidin-4-ona (LPSF/NBM-4)

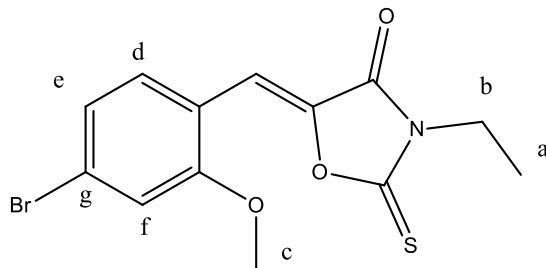


^1H RMN [300 MHz] δ , ppm, CDCl_3 : a 1.327 (t; 3H; $J = 14,7$; $j = 7,5$ Hz), b 3.96 (s; 1H), c 3.97 (q; 2H; $J = 21$ Hz; $j = 6,9$ Hz), d 6.60 (s; 1H), e 7.81 (dd; ArH), f 7.84 (dd; ArH), g 7.97 (dd; ArH)

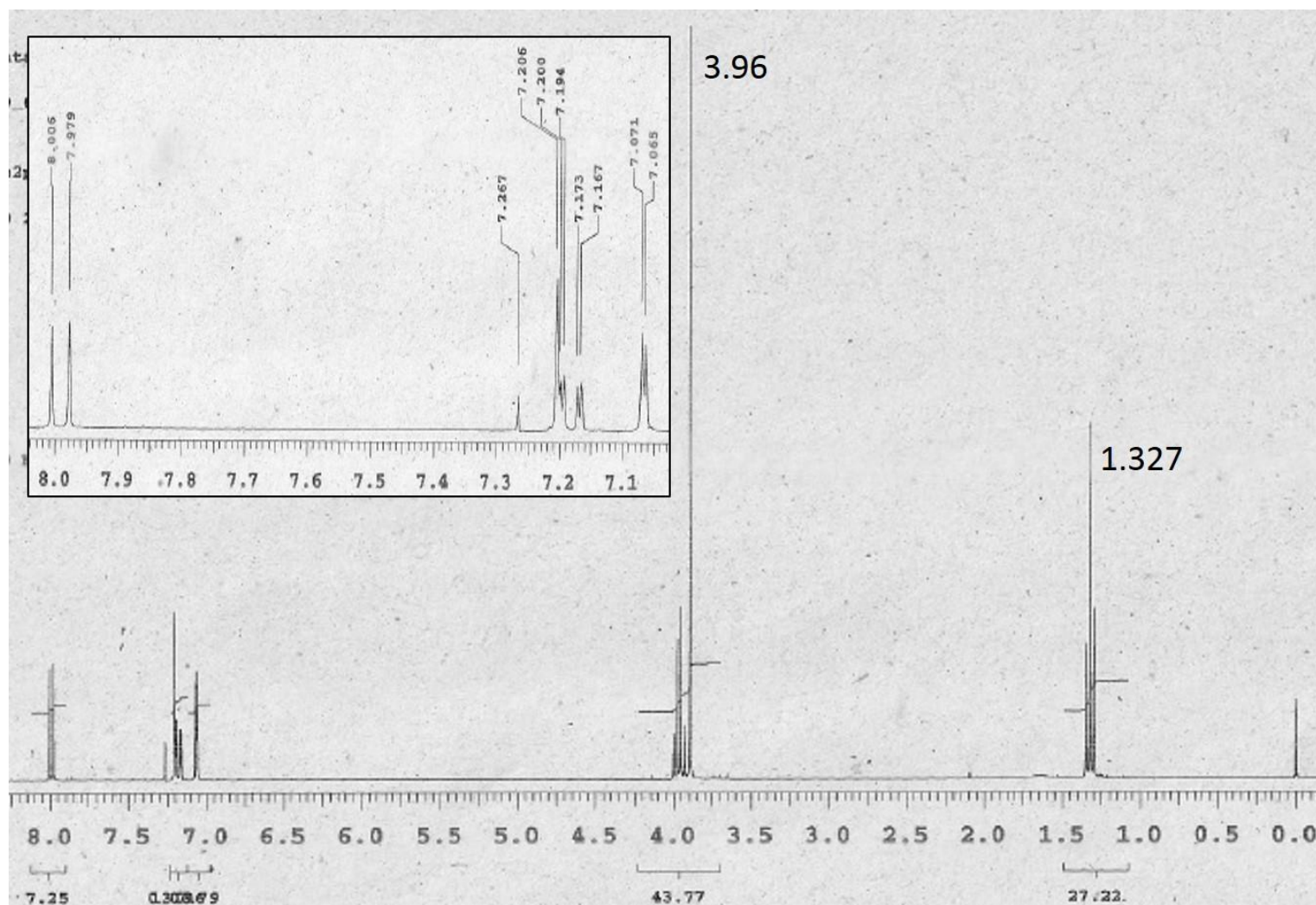


Espectro de ^1H RMN da molécula LPSF/NBM-4 (CDCl_3 , 300 MHz).

(Z)-5-(4-bromo-2-metoxibenzilideno)-3-etil-2-tioxooxazolidon-4-ona (LPSF/NBM-8)

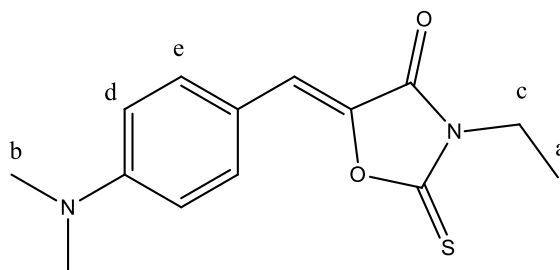


^1H RMN [300 MHz] δ , ppm, CDCl_3 : a 1.327 (t; 3H; $J = 14,1$ Hz; $j = 6,9$ Hz), b 3.96 (q; 2H; $J = 21,6$ Hz; $j = 14,7$ Hz), c 3.900 (s; 3H), d 7.068 (d; 1H; ArH), e 7.16 (d; 1H; ArH), f 7.20 (d; 1H; ArH), g 8.006 (s; 1H)

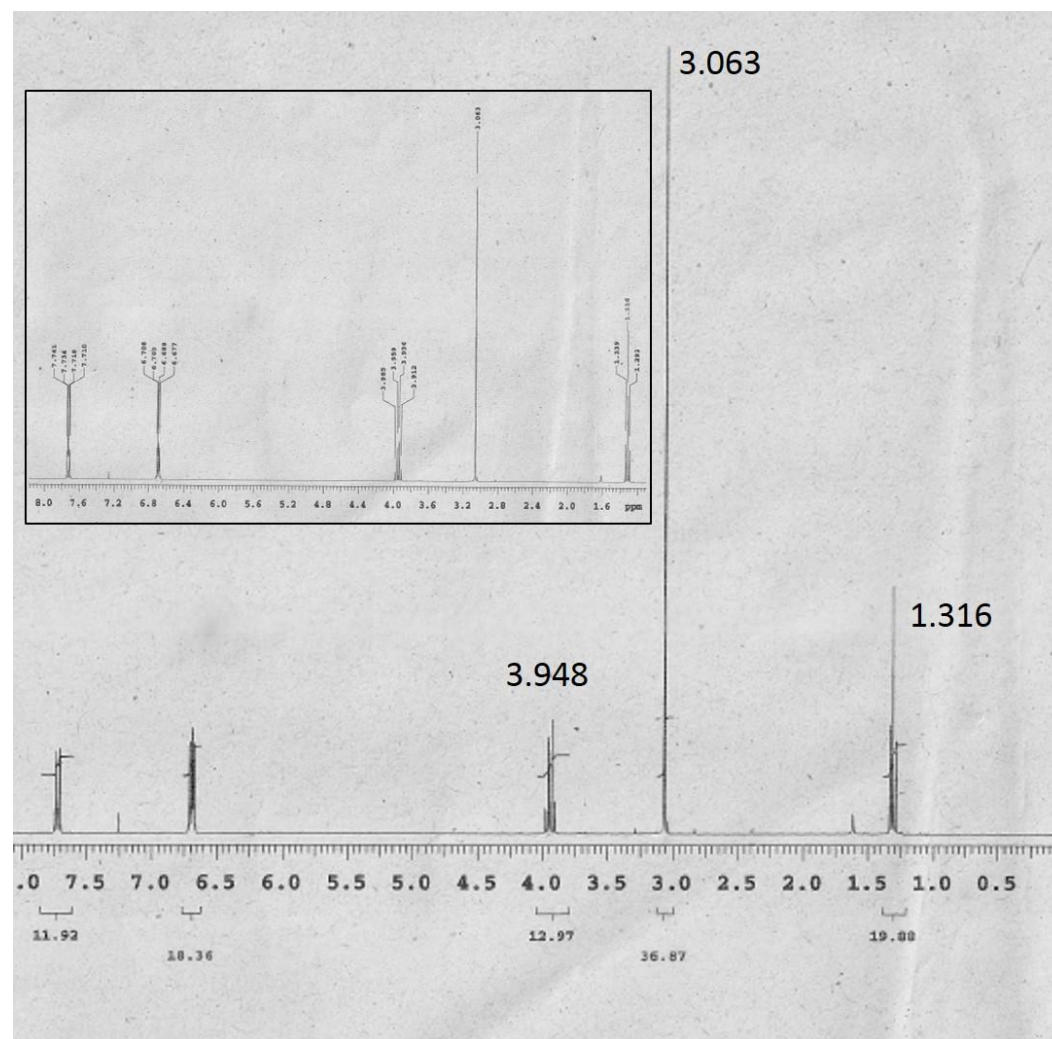


Espectro de ^1H RMN da molécula LPSF/NBM-1 (CDCl_3 , 300 MHz).

(Z)-5-(4-(dimetilamino)benzilideno)-3-etil-2-tioxooxazolidin-4-ona (LPSF/NBM-9)

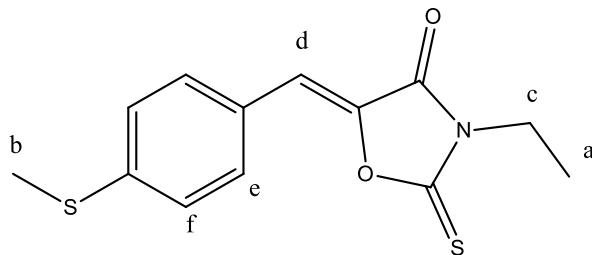


^1H RMN [300 MHz] δ , ppm, CDCl_3 : a 1.316 (t; 3H; $J = 14,1$ Hz; $j = 6,9$ Hz), b 3.063 (s; 6H), c 3.948 (q, 2H, $J = 21,9$ Hz; $j = 7,8$ Hz), d 6.693 (dd; 1H; ArH; $J = 9,3$ Hz; $j = 2,4$ Hz), e 7.72 (dd; 1H; ArH, $J = 9,3$ Hz; $j = 2,1$ Hz)

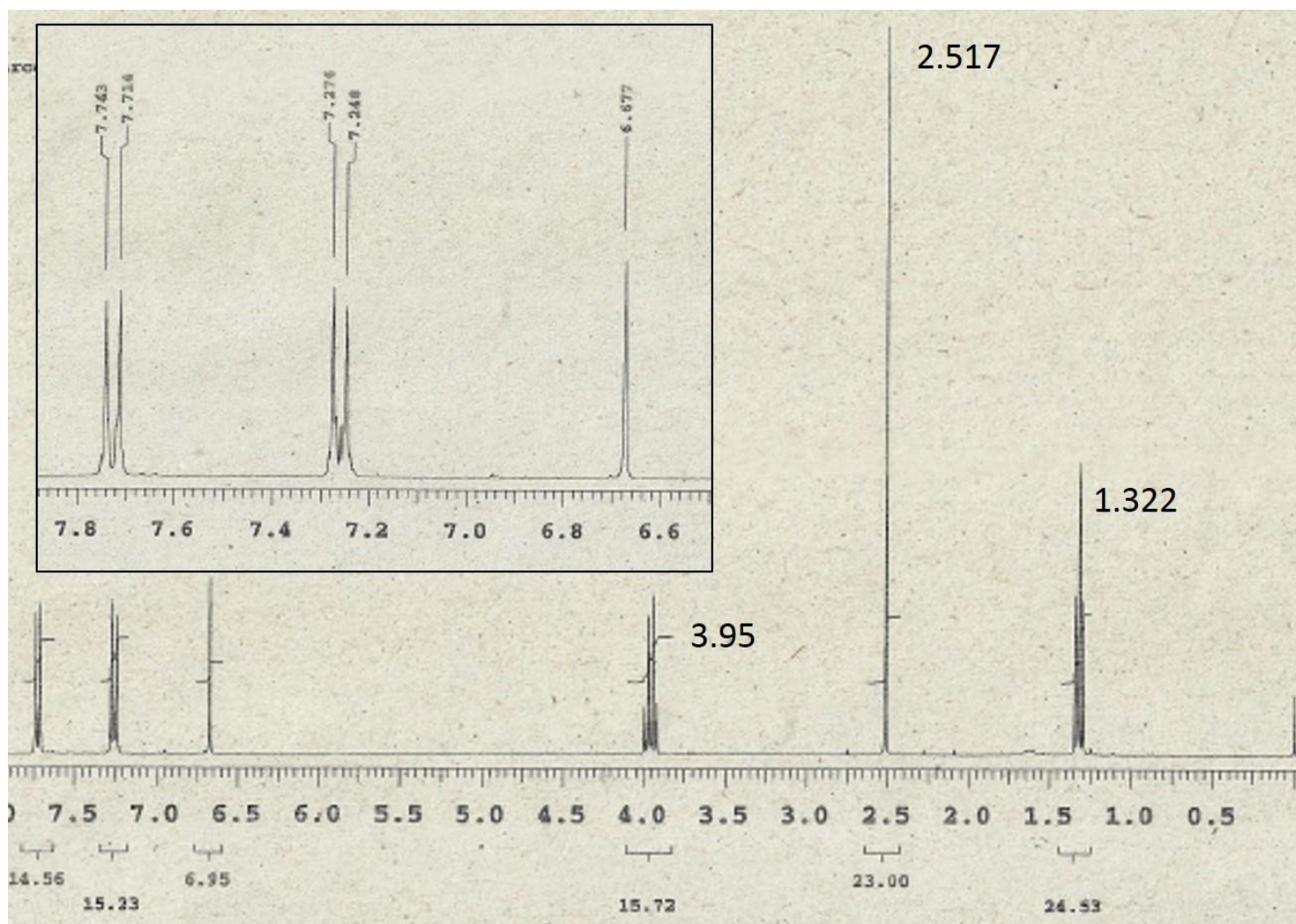


Espectro de ^1H RMN da molécula LPSF/NBM-9 (CDCl_3 , 300 MHz).

(Z)-3-etil-5-(4-metiltio)benzilideno-2-tioxooxazolidin-4-ona (LPSF/NBM-10)

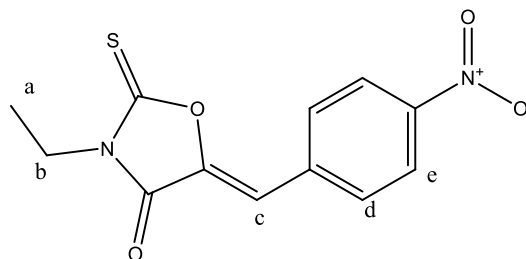


^1H RMN [300 MHz] δ , ppm, CDCl_3 : a 1.322 (t; 3H; $J = 14,7$ Hz; $j = 7,5$ Hz), b 2.517 (s; 1H), c 3.950 (q; 2H; $J = 21,6$ Hz; $j = 7,5$ Hz), d 6.677 (s; 1H), e 7.262 (d; ArH; $j = 8,4$ Hz), f 7.728 (d; ArH; $j = 8,7$ Hz)

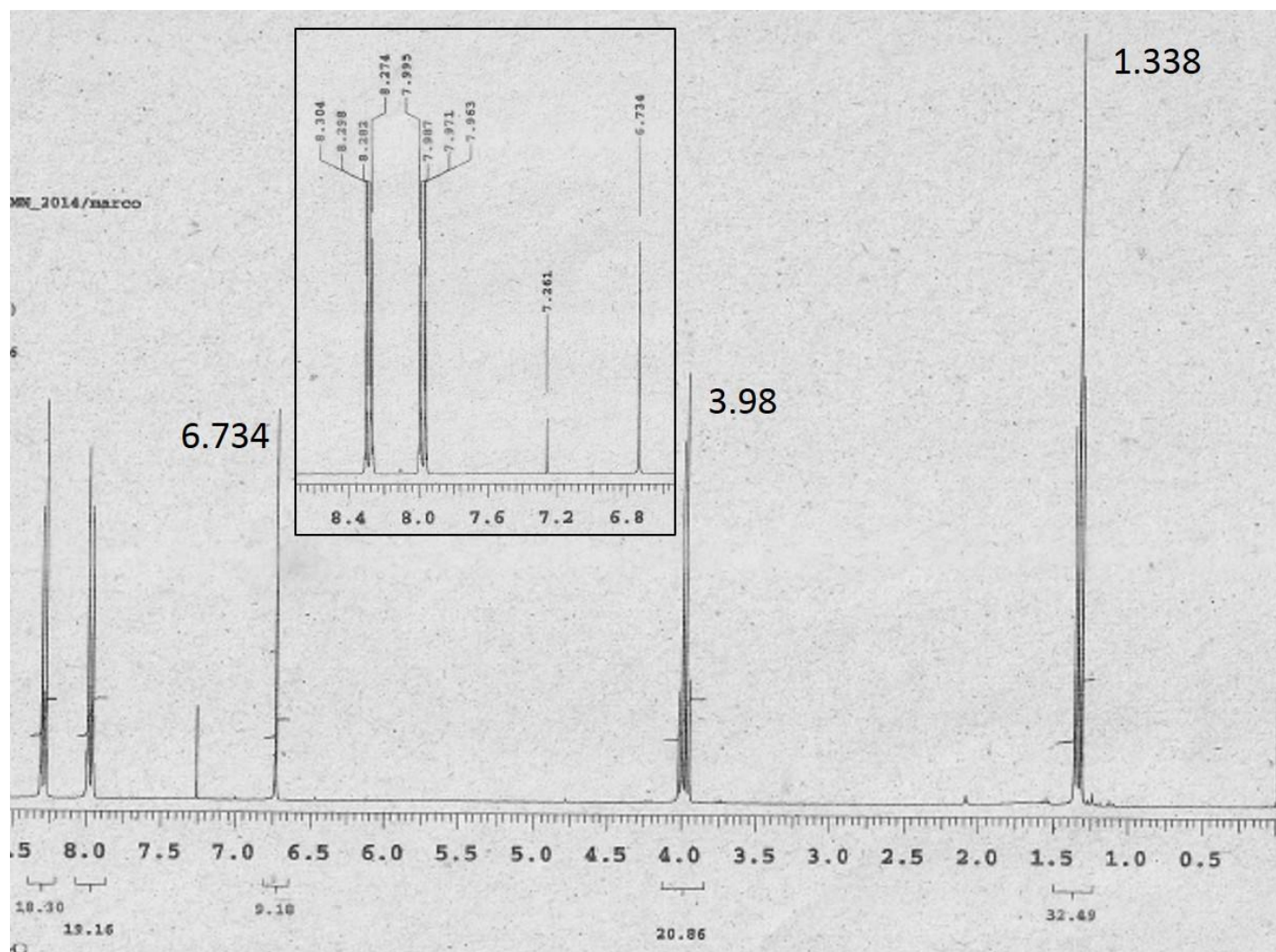


Espectro de ^1H RMN da molécula LPSF/NBM-10 (CDCl_3 , 300 MHz).

(Z)-3-etil-5-(4-nitrobenzilideno)-2-tioxooxazolidin-4-ona (LPSF/NBM-11)

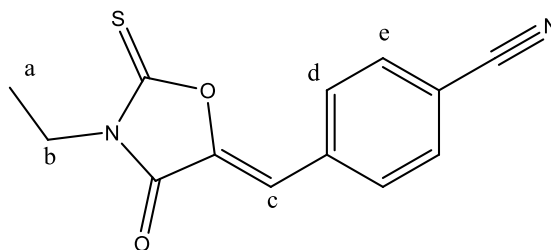


^1H RMN [300 MHz] δ , ppm, CDCl_3 : a 1.338 (t; 3H; $J = 14,7$ Hz; $j = 7,8$ Hz), b 3.986 (q; 2H; $J = 21,9$; $j = 7,8$ Hz), c 6.734 (s; 1H), d 7.979 (d; ArH; $j = 7,2$ Hz), e 8.289 (d; ArH; $j = 6,9$ Hz)

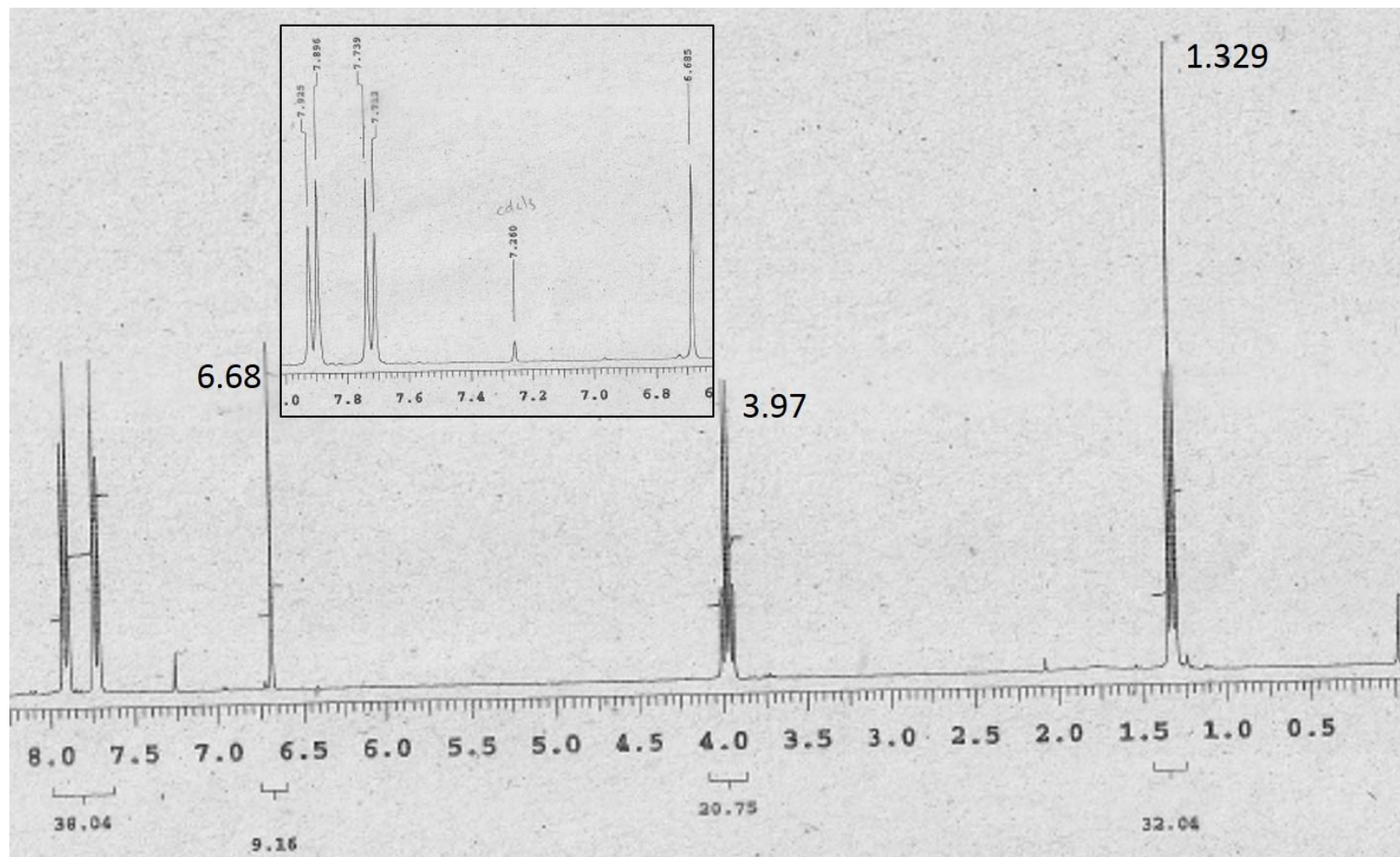


Espectro de ^1H RMN da molécula LPSF/NBM-11 (CDCl_3 , 300 MHz).

(Z)-4-((3-etil-4-oxo-2-tioxooxazolidin-5-ilidene)metil)benzonitrila (LPSF/NBM-17)

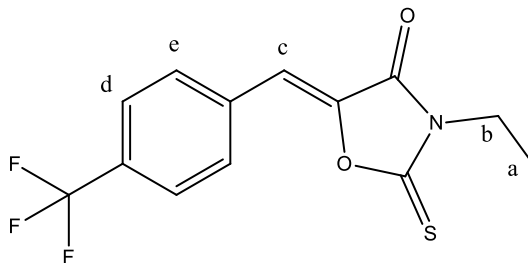


^1H RMN [300 MHz] δ , ppm, CDCl_3 : a 1.329 (t; 3H; $J = 14,7$ Hz; $j = 7,8$ Hz), b 3.97 (q; 2H; $J = 21$ Hz; $j = 6,9$ Hz), c 6.685 (s; 1H), d 7.725 (d; ArH; $j = 8,1$ Hz), e 7.910 (d; ArH, $j=8.7$ Hz)

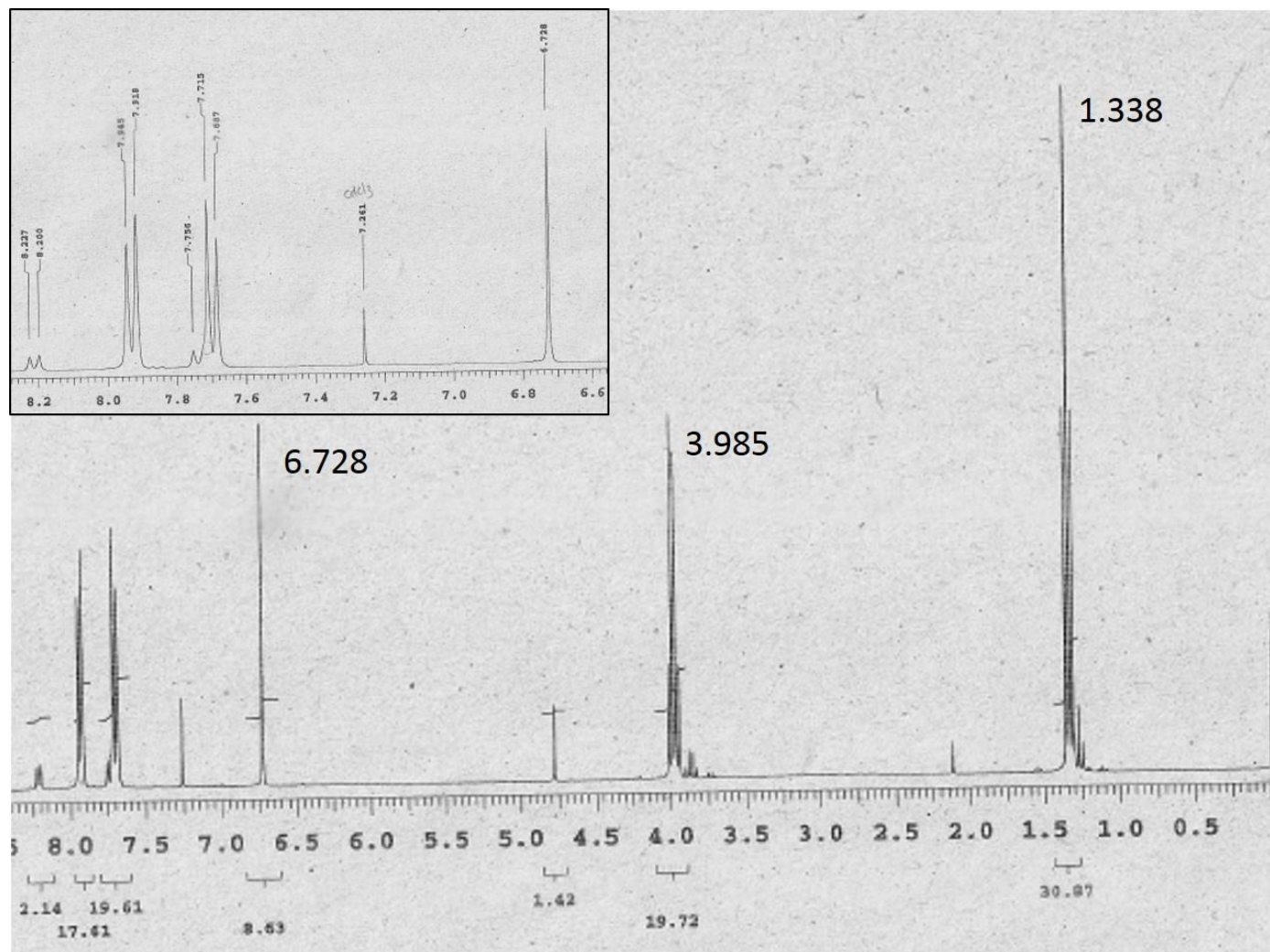


Espectro de ^1H RMN da molécula LPSF/NBM-17 (CDCl_3 , 300 MHz).

(Z)-3-etil-2-tioxo-5-(4-trifluorometil)benzilideno)oxazolidin-4-ona (LPSF/NBM-19)

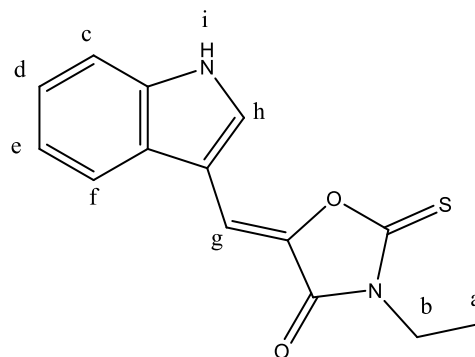


^1H RMN [300 MHz] δ , ppm, CDCl_3 : a 1.338 (t; 3H; $J=14,7$ Hz; $j=7,5$ Hz), b 3.985 (q; 2H; $J=21,9$ Hz; $j=7,2$ Hz), c 6.728 (s; 1H), d, e 7.715 (dd; 2H; $j=8,4$ Hz), f 7.931 (d; ArH; $j=8,1$ Hz), g 8.213 (d; ArH; $j=8,1$ Hz)

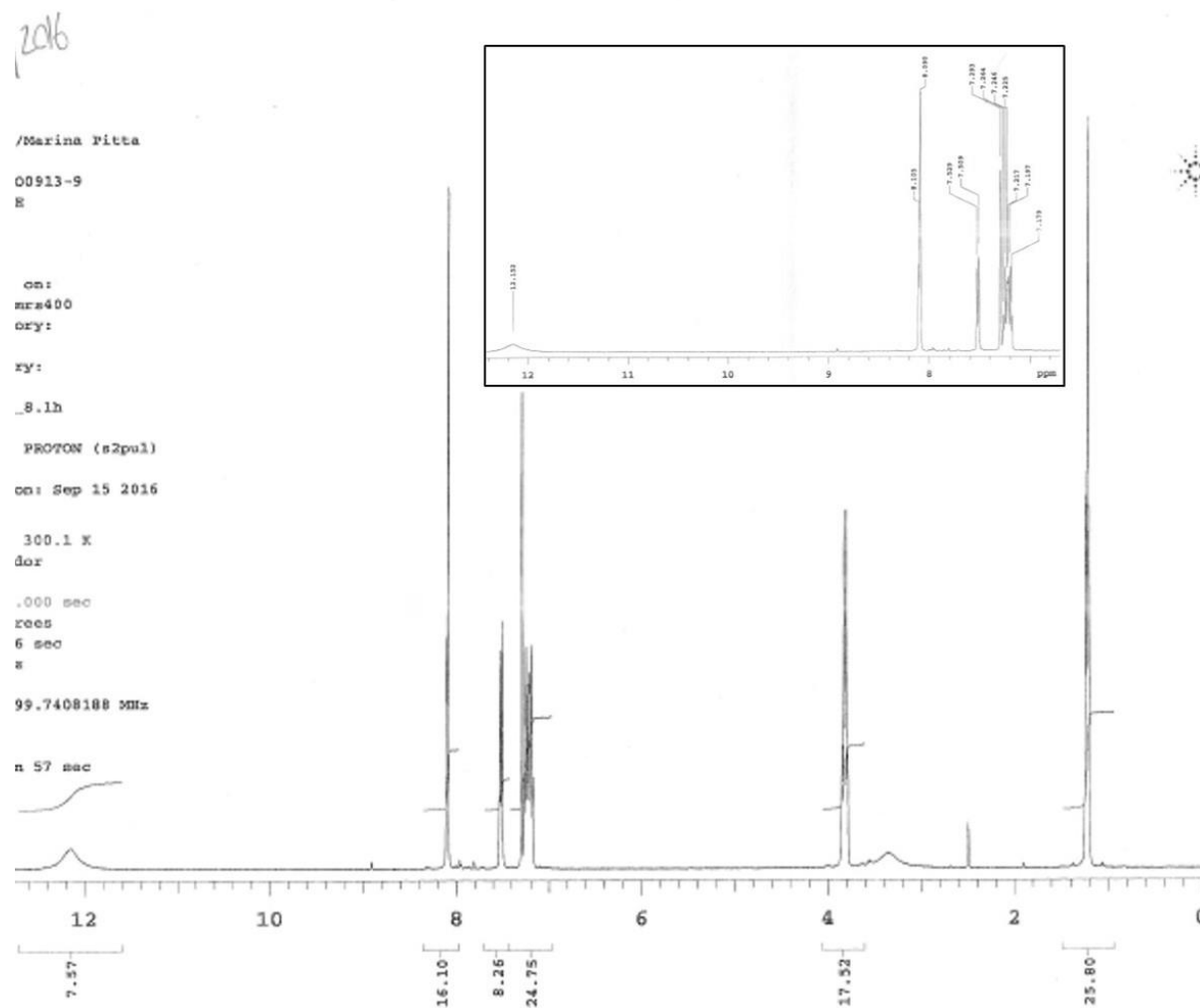


Espectro de ^1H RMN da molécula LPSF/NBM-19 (CDCl_3 , 300 MHz).

(Z)-5-((1H-indol-3-il)metileno)-3-etil-2-tioxooxazolidin-4-ona (LPSF/NBM-20)



^1H -RMN [400 MHz, δ , ppm, CDCl_3]: a 1.224 (t; 3H; $J = 14$ Hz; $j = 6,8$ Hz), b 3,82 (q; 2H; $J = 21,1$ Hz; $j = 7,2$ Hz), c,d,e 7.231 (m; 3H), f 7.52 (d; 1H; $J = 8$ Hz), g 8.10 (s; 1H), h 8.09 (s; 1H; indol), i 12.15 (s; 1H; -NH)

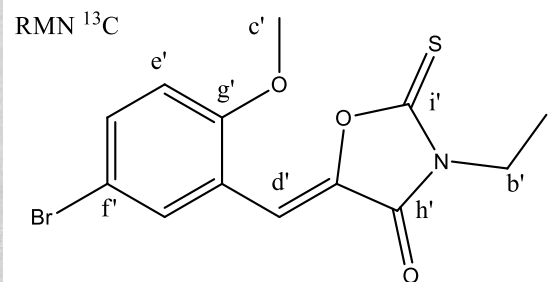
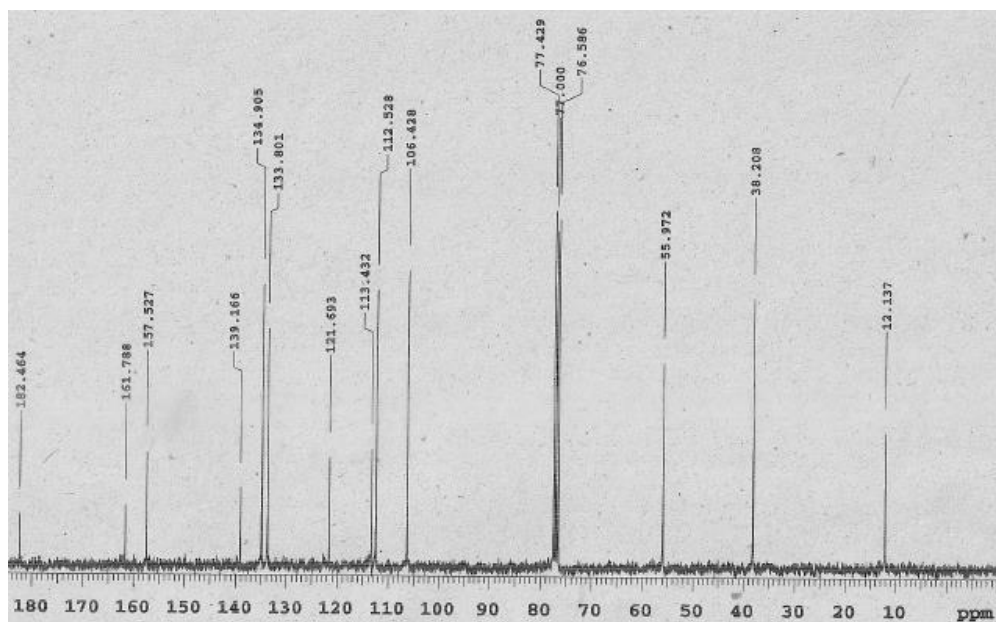


Espectro de ^1H RMN da molécula LPSF/NBM-1 (CDCl_3 , 300 MHz).

ANEXO B – Demais caracterizações estruturais realizadas

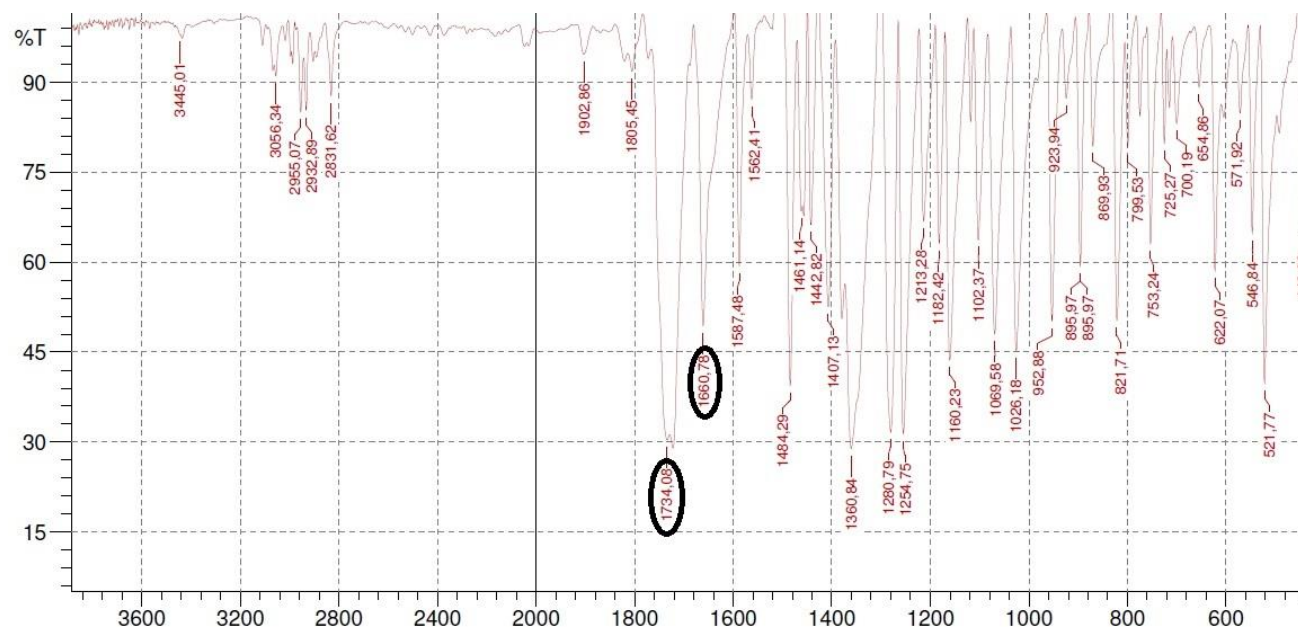
Ressonância Magnética Nuclear de Carbono, Espectrometria de Massas Gasosa, Infravermelho e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

LPSF NBM-1 ^{13}C RMN

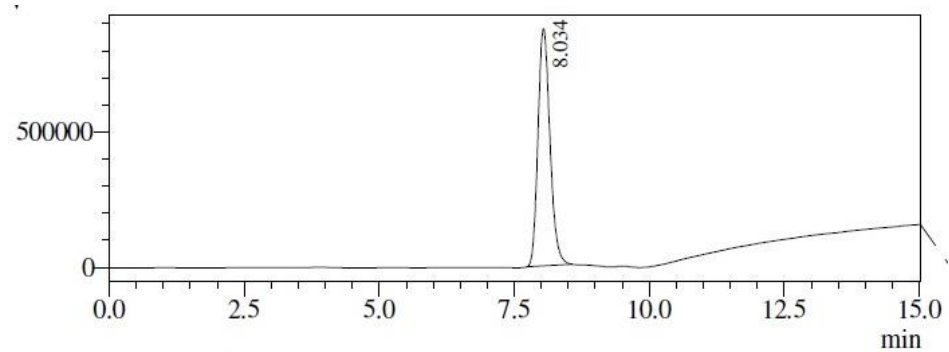


^{13}C RMN [75 MHz] CDCl_3 : a' 12.13 (alif.), b' 38.20, c' 55.97, d' 106.42, e' 112.52, f' 113.43, g' 157.52, h' 161.78 (C=O), i' 182.46 (C=S)

IV



CLAE



Número do(s) pico(s)	Tempo de Retenção	Área (%)
-------------------------	-------------------	----------

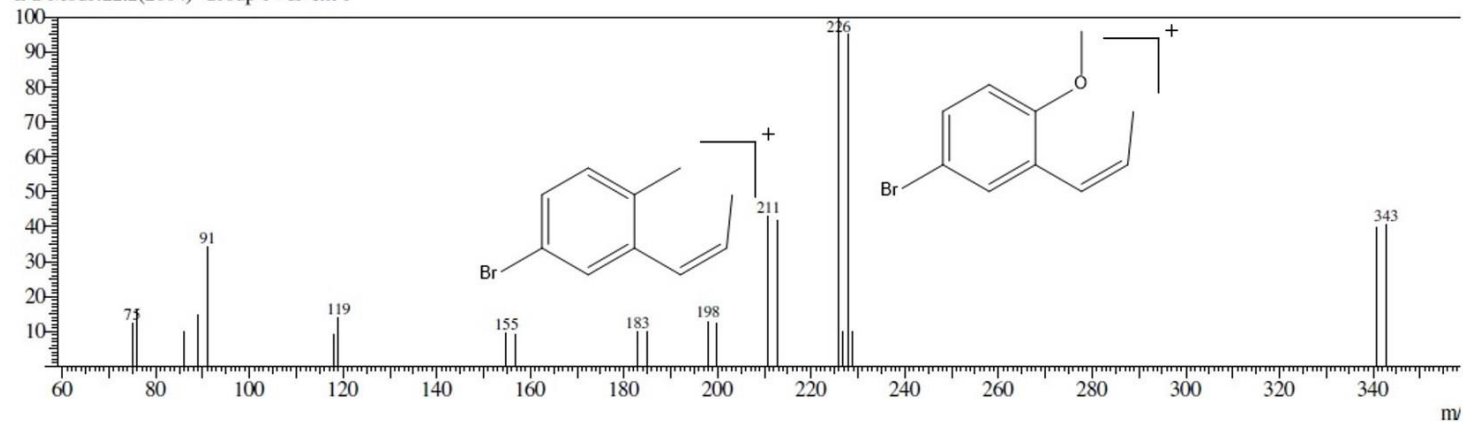
1	8,034 min	100
---	-----------	-----

GC-MS

Line#:3 R.Time:20.0(Scan#:1739)

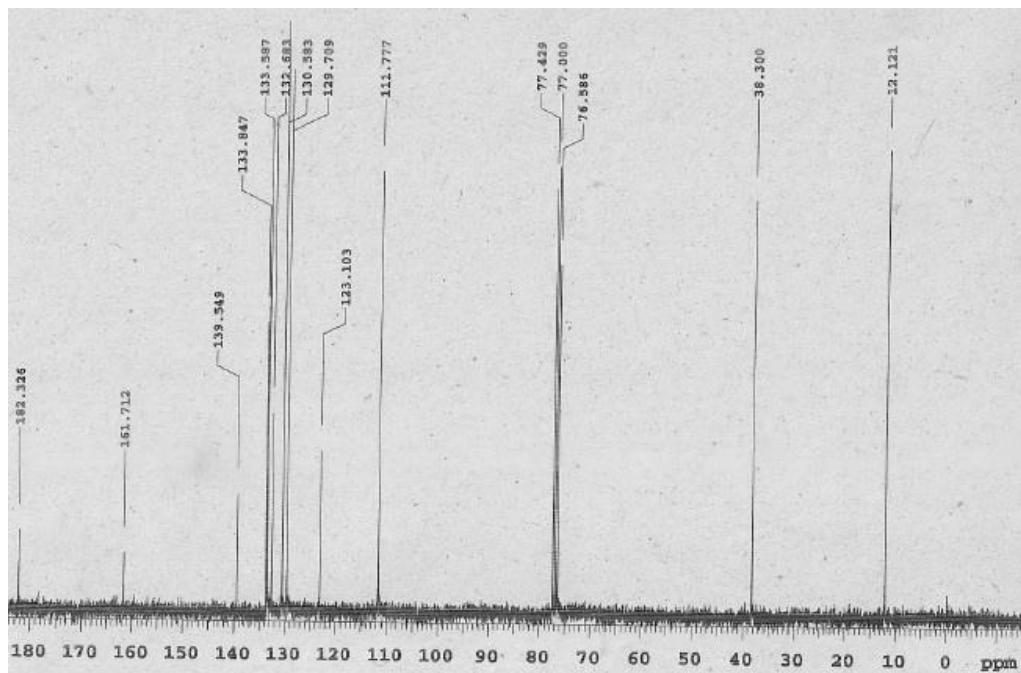
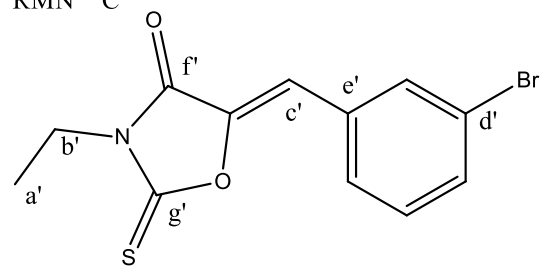
RawMode:Single 20.0(1739) BasePeak:226(583015)

BG Mode:22.2(2004) Group 1 - Event 1



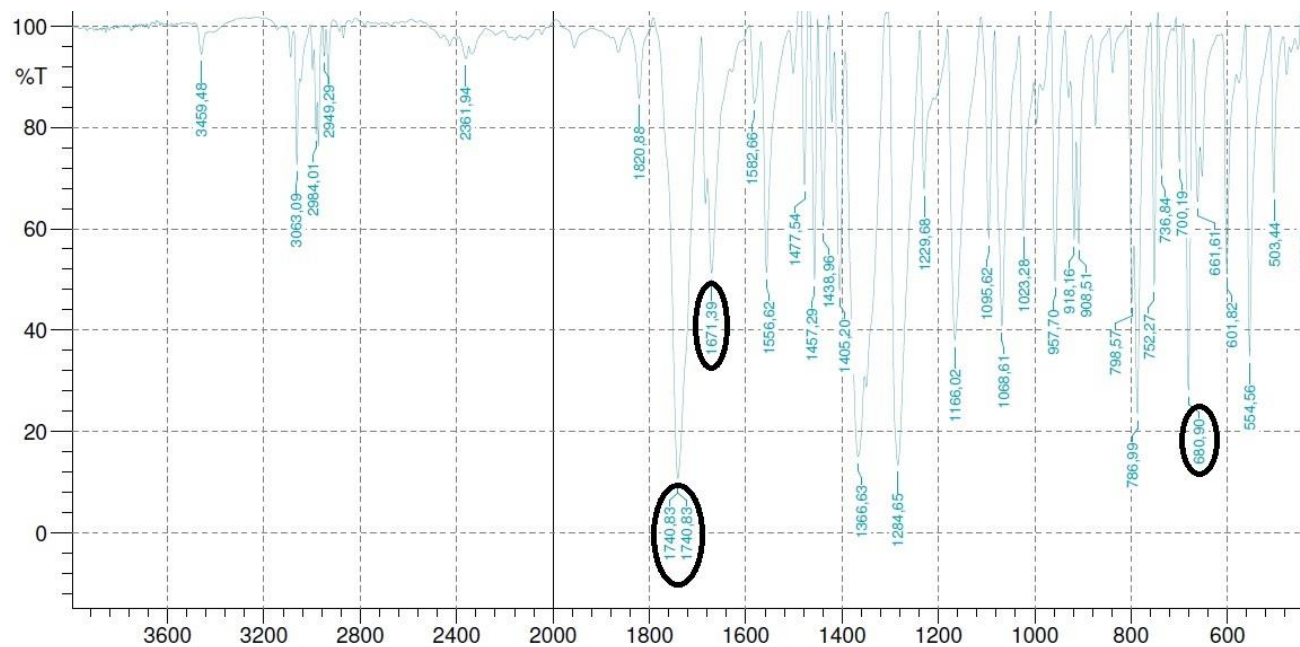
LPSF NBM-1: Tempo de retenção de 20 minutos. Perfil de fragmentação apresentando pico-base de 226. Massa molecular do composto: 343

MS m/z (%) EI: 343; 226; 211.

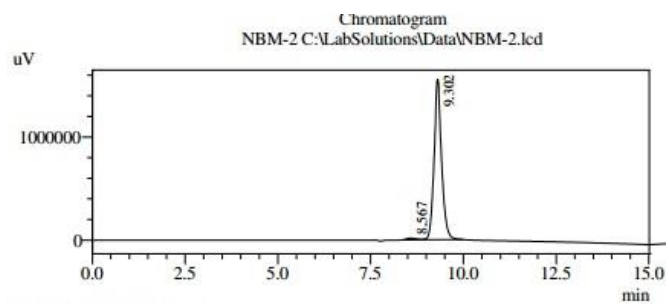
LPSF NBM-2 ^{13}C RMNRMN ^{13}C 

^{13}C RMN [75 MHz] CDCl_3 : a' 12.12 (alif.), b' 38.300 (alif.), c' 117,77 (etileno), d' 123.10 (C-Br), e' 139.54 (Ar), f' 161.71 (C=O), g' 182, 32 (C=S)

IV



CLAE



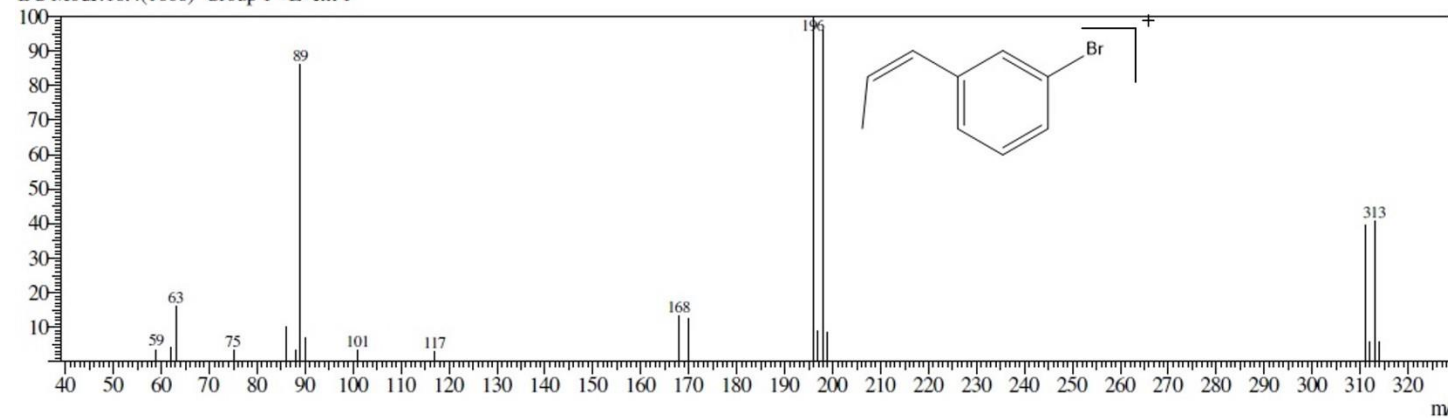
Número do(s) Pico(s)	Tempo de retenção (min)	Área (%)
1	8,56	1,072
2	9,302	98,928

GC-MS

Line#:2 R.Time:17.8(Scan#:1537)

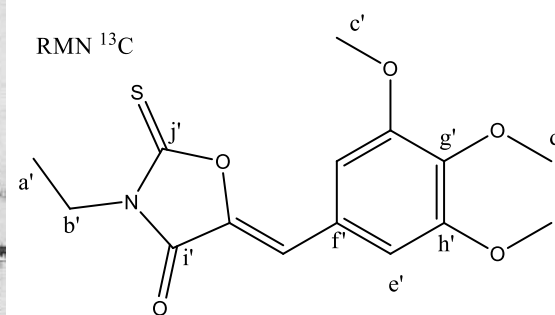
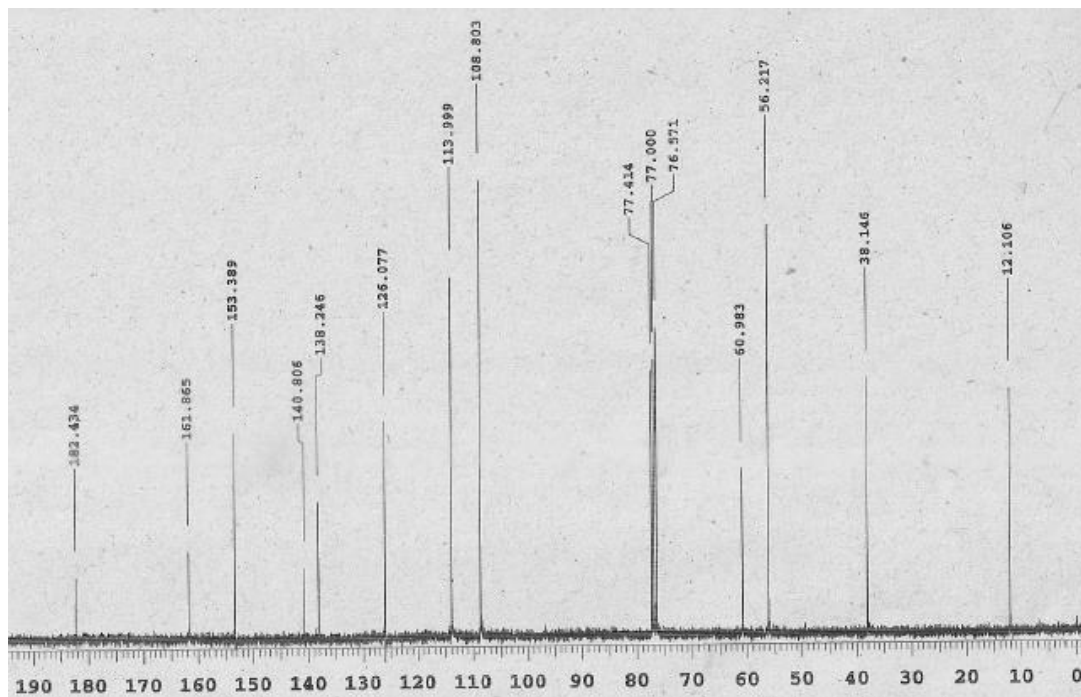
RawMode:Single 17.8(1537) BasePeak:196(1590158)

BG Mode:18.4(1608) Group 1 - Event 1



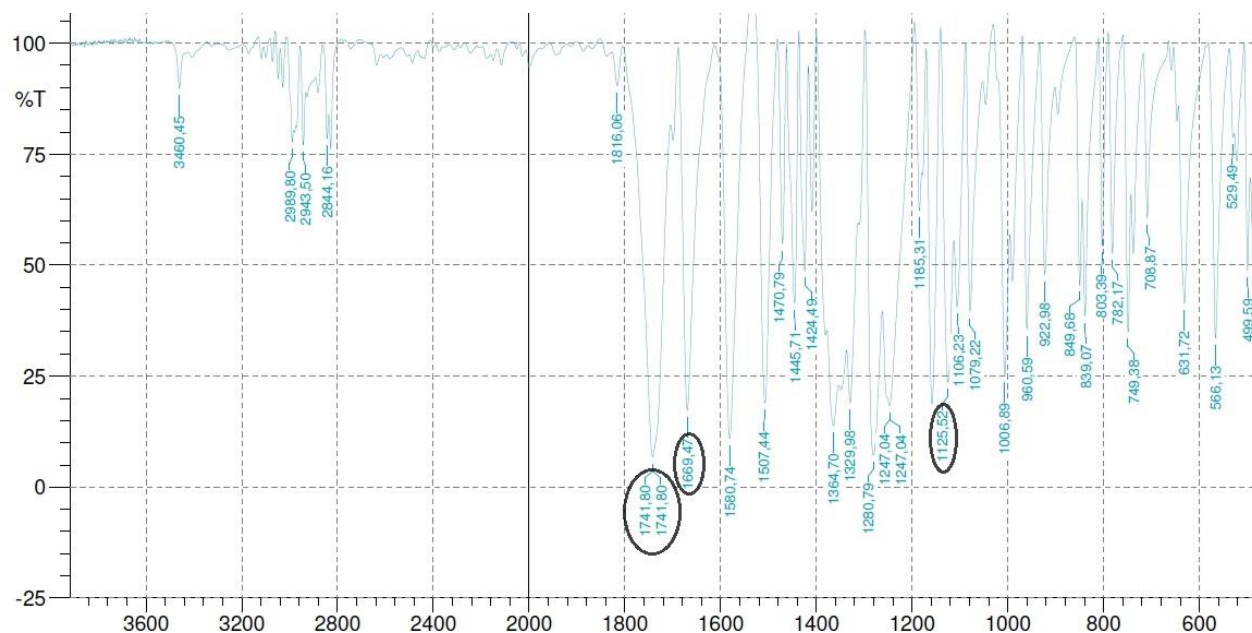
LPSF NBM-2: Tempo de retenção de 17.8 minutos. Perfil de fragmentação apresentando pico-base de 196. Massa molecular do composto: 313

MS m/z (%) EI: 313; 196;

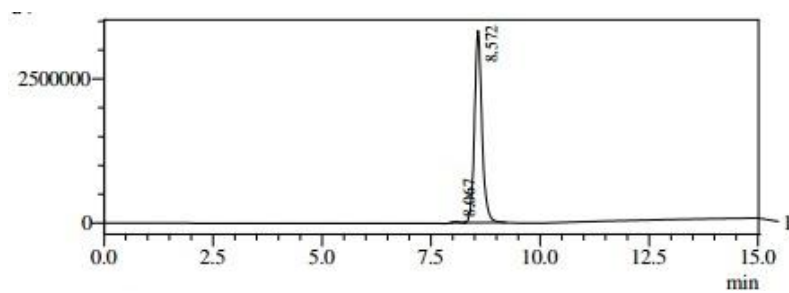
LPSF NBM-3 ^{13}C RMN

^{13}C RMN [75 MHz] CDCl_3 : a' 12.10 (alif.), b' 38.14 (alif.), c' 56.21, d' 60.98, e' 108.80, f' 126.07, g' 138.24, h' 153.38, i' 161.86 (C=O), j' 182.43 (C=S)

IV



CLAE



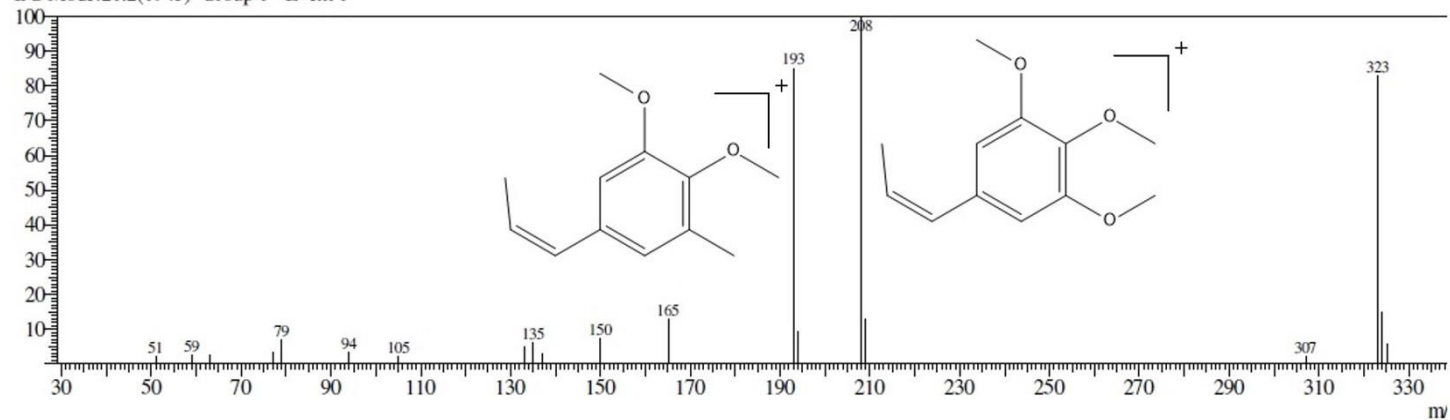
Número do(s) pico(s)	Tempo de retenção (min)	Área (%)
1	8,57	99,46

GC-MS

Line#:2 R.Time:20.3(Scan#:1842)

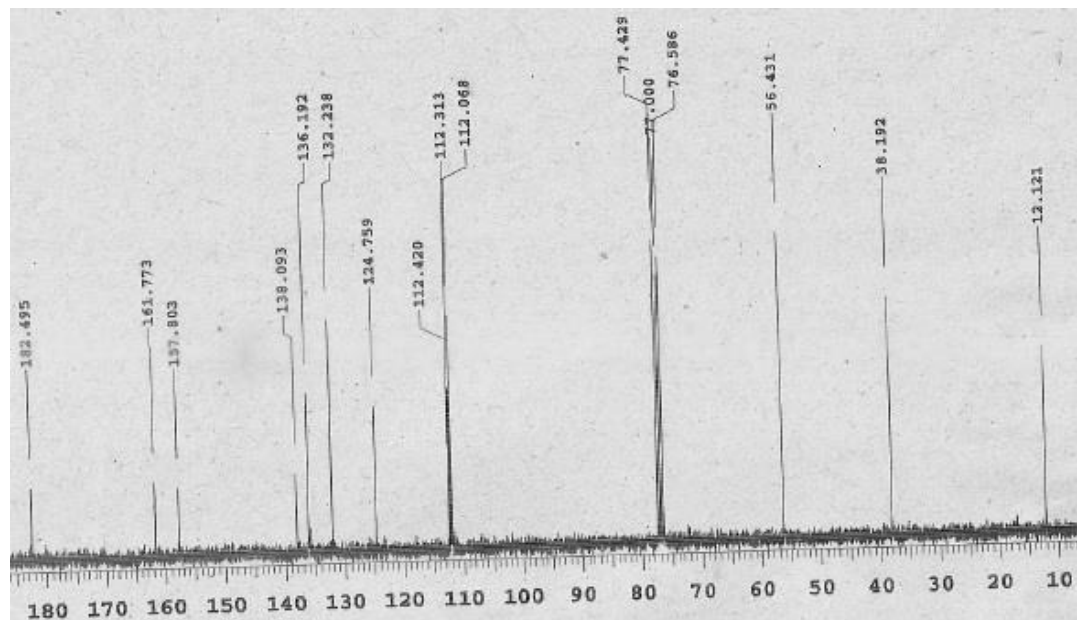
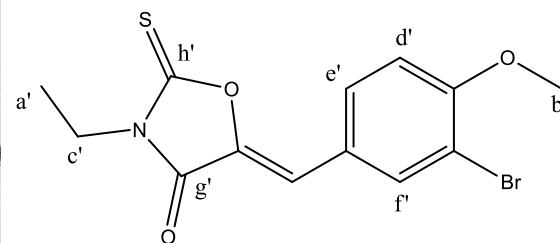
RawMode:Single 20.3(1842) BasePeak:208(2257554)

BG Mode:21.2(1943) Group 1 - Event 1



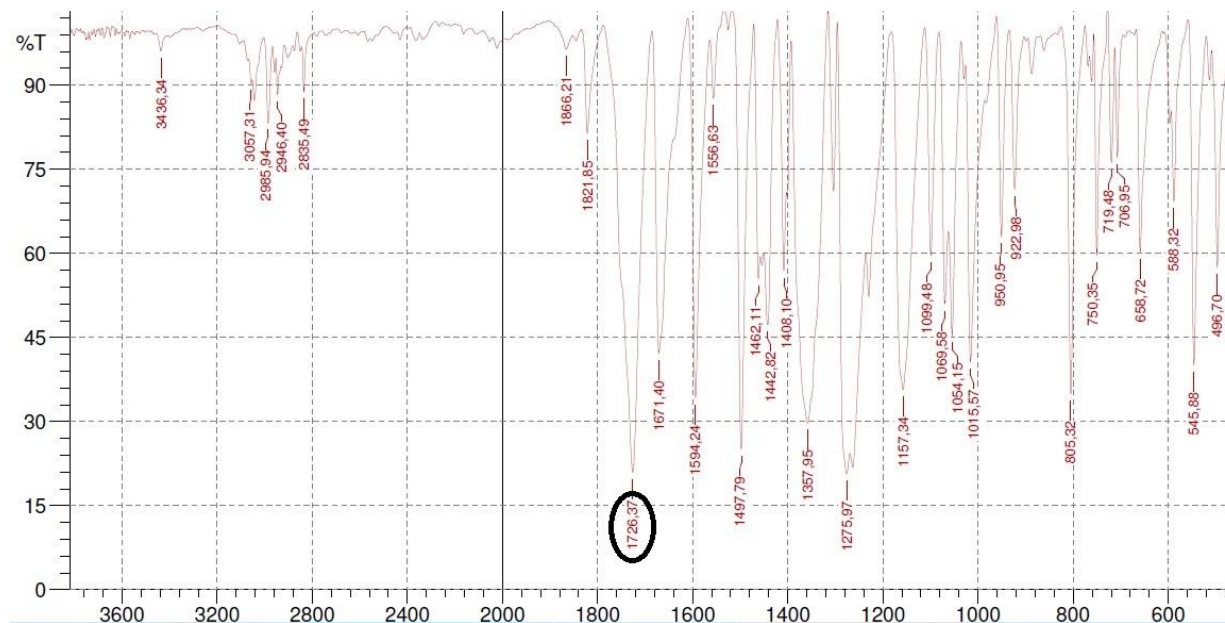
LPSF NBM-3: Tempo de retenção de 20.3 minutos. Perfil de fragmentação apresentando pico-base de 208. Massa molecular do composto: 323

MS m/z (%) EI: 323; 208; 193.

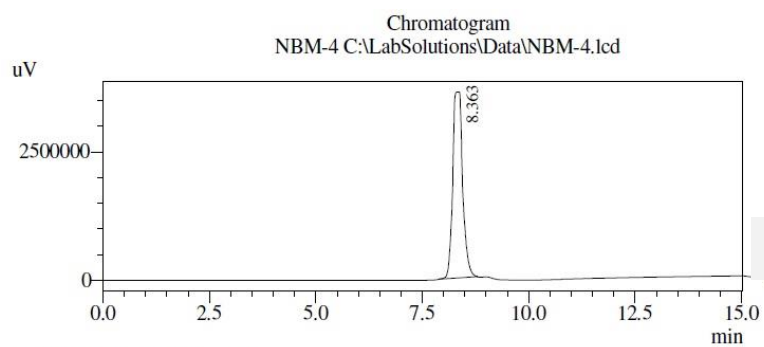
LPSF NBM-4 ^{13}C RMNRMN ^{13}C 

^{13}C RMN [75 MHz] CDCl_3 : a' 12.12 (alif.), b' 38.19 (alif), c' 56.43, d' 112.31, e' 112.42, f' 157.80, g' 161.77 (C=O), h' 182.49 (C=S)

IV



CLAE

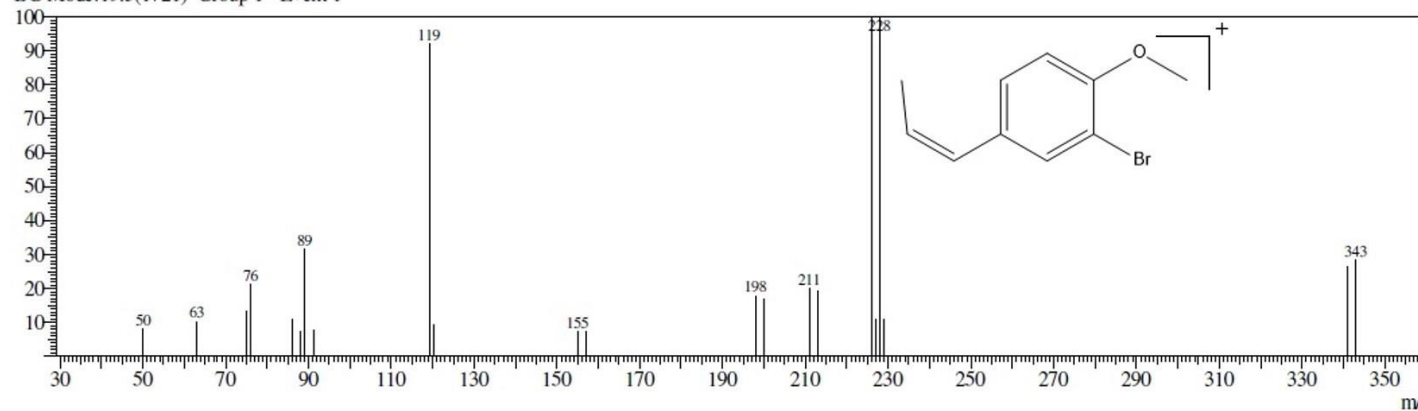


Número do(s) pico(s)	Tempo de retenção (min)	Área (%)
1	8,36	100

1 PDA Multi 1 / 205nm 4nm

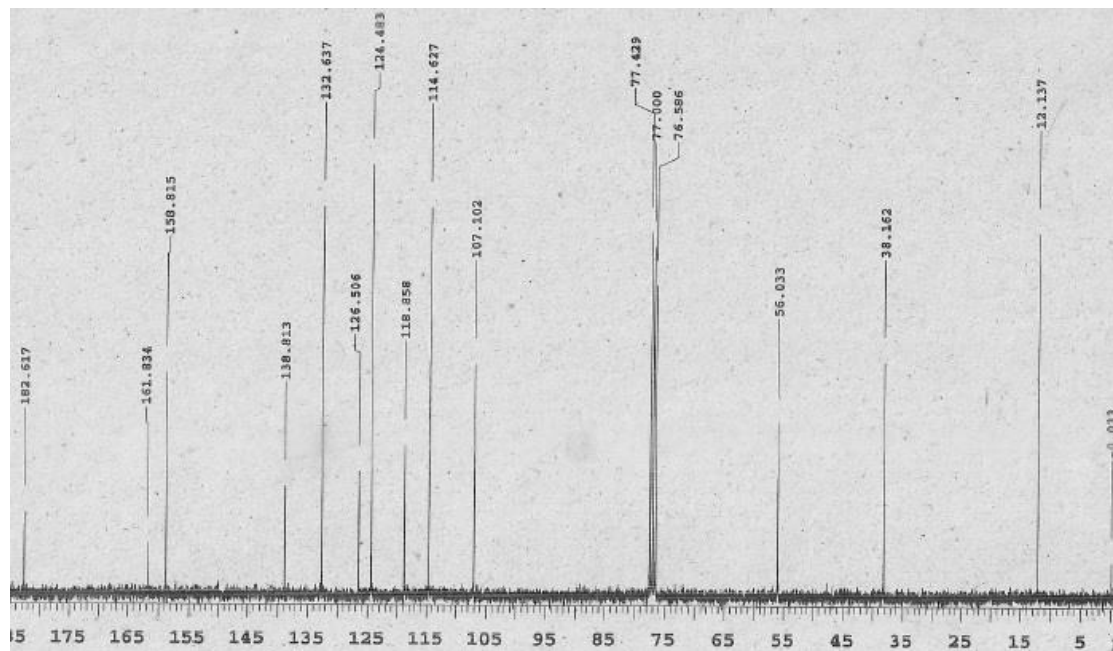
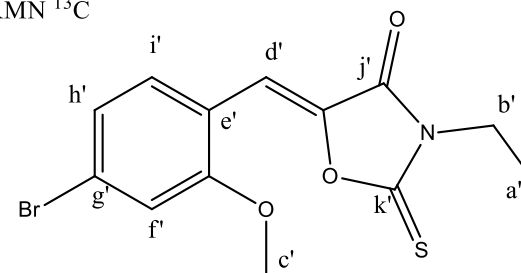
GC-MS

Line#: 2 R.Time: 19.5(Scan#: 1745)
RawMode: Single 19.5(1745) BasePeak: 228(396216)
BG Mode: 19.3(1721) Group 1 - Event 1



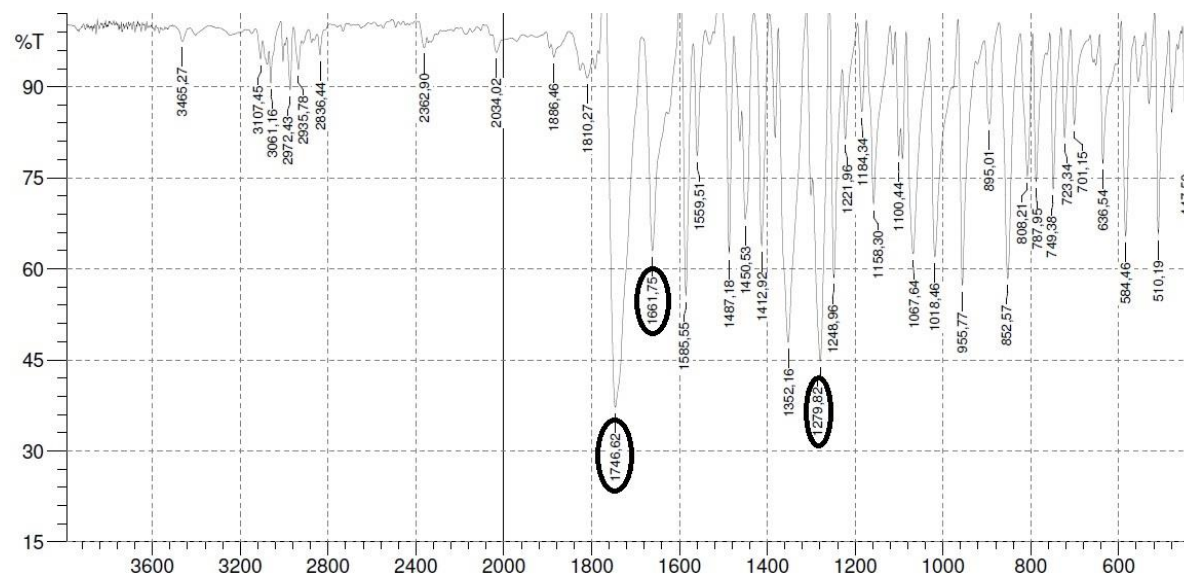
LPSF NBM-4: Tempo de retenção de 19.5 min. Perfil de fragmentação apresentando pico-base de 228. Massa molecular do composto: 343

MS m/z (%) EI: 343; 228.

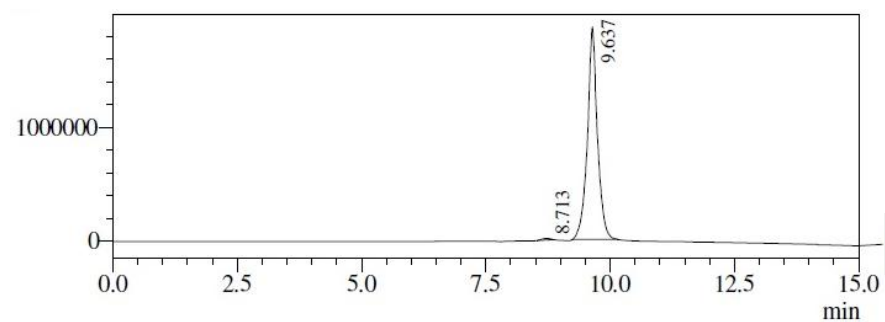
LPSF NBM-8 ^{13}C RMNRMN ^{13}C 

^{13}C RMN [75 MHz] CDCl_3 : a' 12.13 (alif.), b' 38.16 (alif.), c' 56.03, d' 107.10, e' 114.62, f' 118.85, g' 124.48, h' 126.50, i' 132.63, j' 161.83 (C=O), k' 182.61 (C=S)

IV



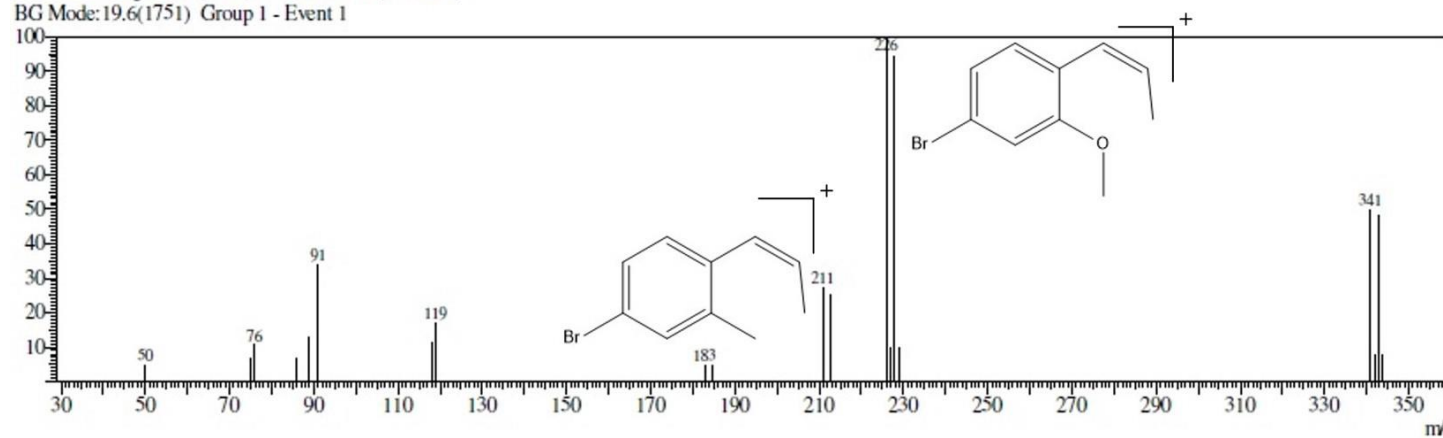
CLAE



Número do(s) pico(s)	Tempo de retenção (min)	Área (%)
1	8,7	0,62
2	9,6	99,32

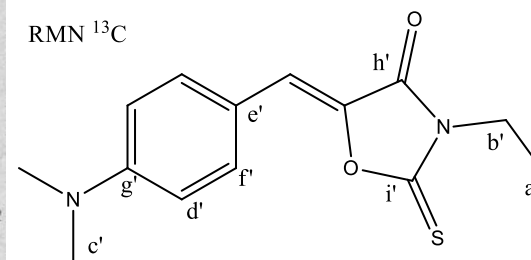
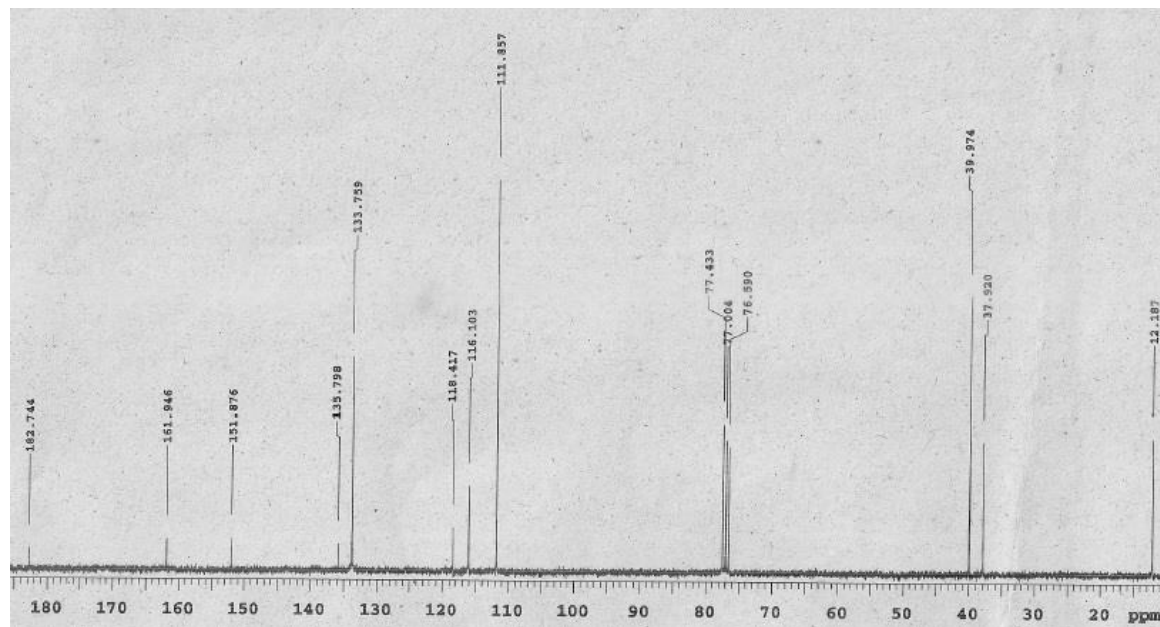
GC-MS

Line#: 1 R.Time: 19.0(Scan#: 1681)
RawMode: Single 19.0(1681) BasePeak: 226(1201996)
BG Mode: 19.6(1751) Group 1 - Event 1



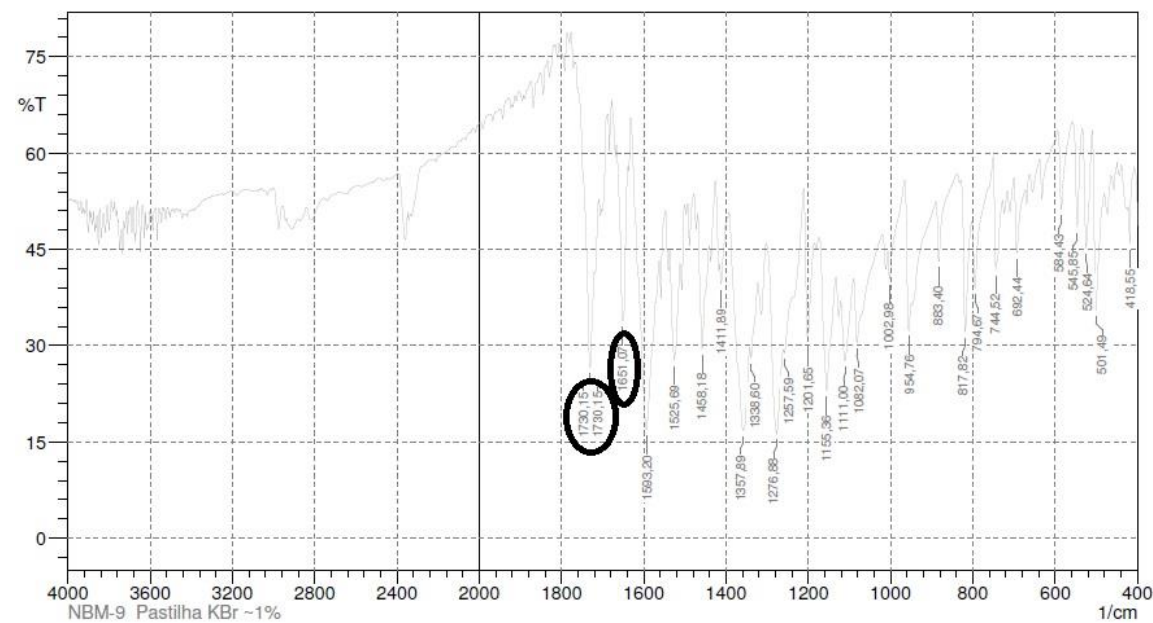
LPSF NBM-8: Tempo de retenção de 19 minutos. Perfil de fragmentação apresentando pico-base de 226. Massa molecular do composto: 341.

MS m/z (%) EI: 341; 226; 211.

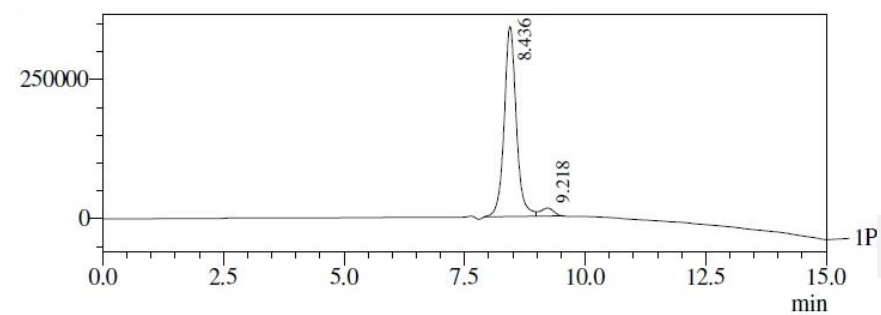
LPSF NBM-9 ^{13}C RMN

^{13}C RMN [75 MHz] CDCl_3 : a' 12.18, b' 37.90, c' 39.97, d' 111.85, e' 118.41, f' 133.75, g' 151.87, h' 161.94, i' 182.74

IV



CLAE



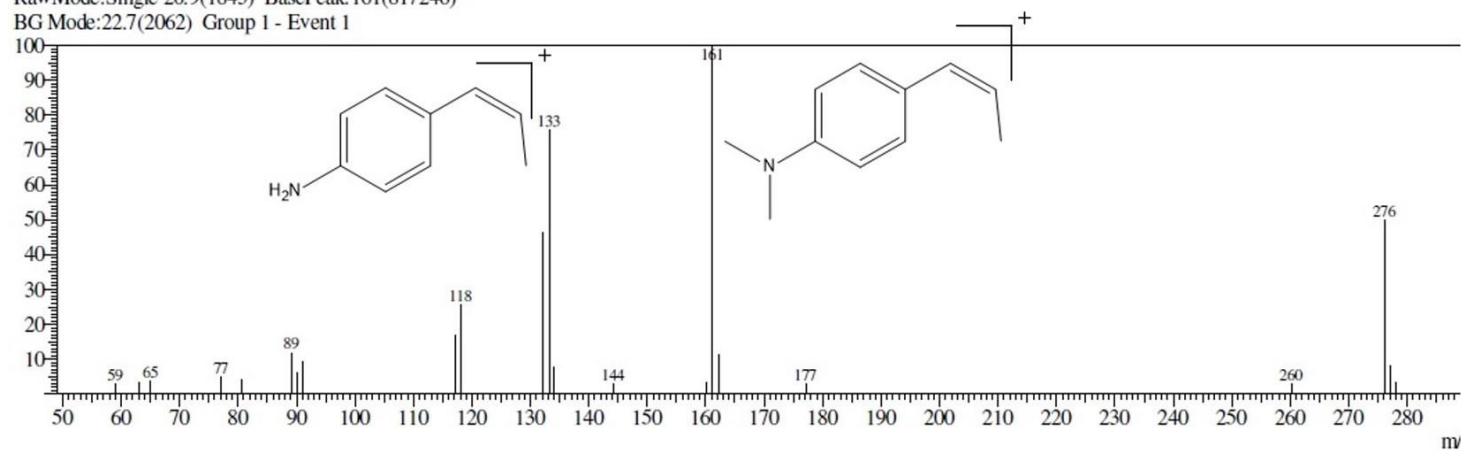
Número do(s) pico(s)	Tempo de retenção (min)	Área (%)
1	8,43	95,826
2	9,21	4,174

GC-MS

Line#:2 R.Time:20.9(Scan#:1843)

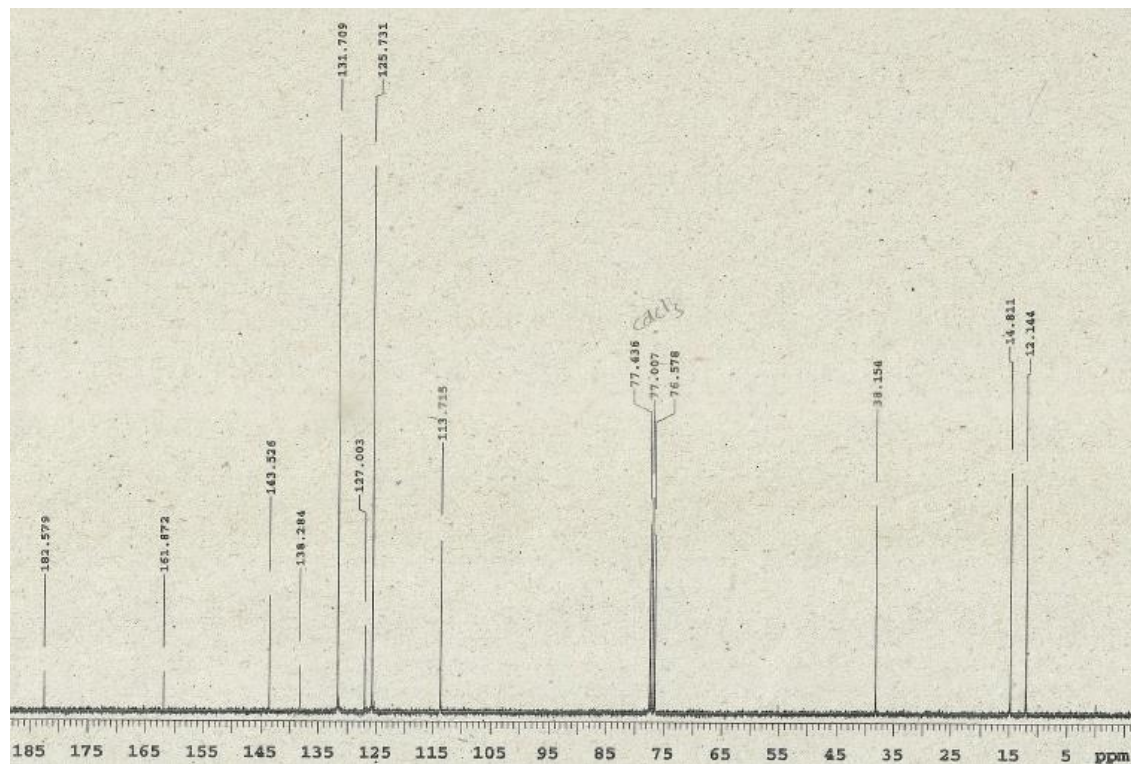
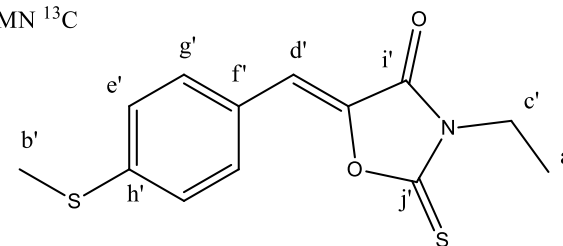
RawMode:Single 20.9(1843) BasePeak:161(817246)

BG Mode:22.7(2062) Group 1 - Event 1



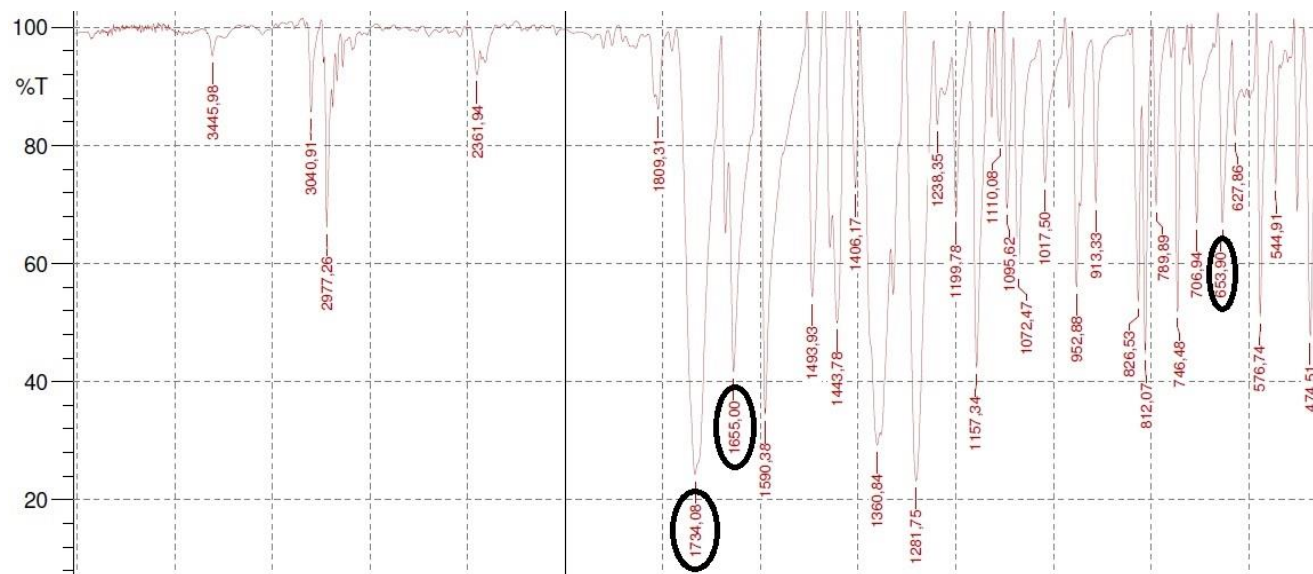
LPSF NBM-9: Tempo de retenção de 20.9 minutos. Perfil de fragmentação apresentando pico-base de 161. Massa molecular do composto: 276.

MS m/z (%) EI: 276; 161; 133.

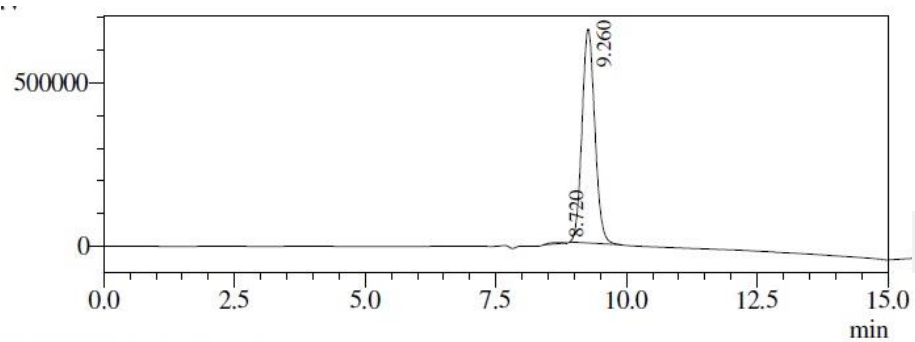
LPSF NBM-10 ^{13}C RMNRMN ^{13}C 

^{13}C RMN [75 MHz] CDCl_3 : a' 12.14 (alif.), b' 14.81 (alif.), c' 38.15 (alif.), d' 113.71, e' 125.73, f' 127.00, g' 131.70, h' 138.28 (C-Ar-S), i' 161.87 (C=O), j' 182.57 (C=S)

IV



CLAE



Número do(s) pico(s)	Tempo de retenção (min)	Área (%)
-------------------------	----------------------------	----------

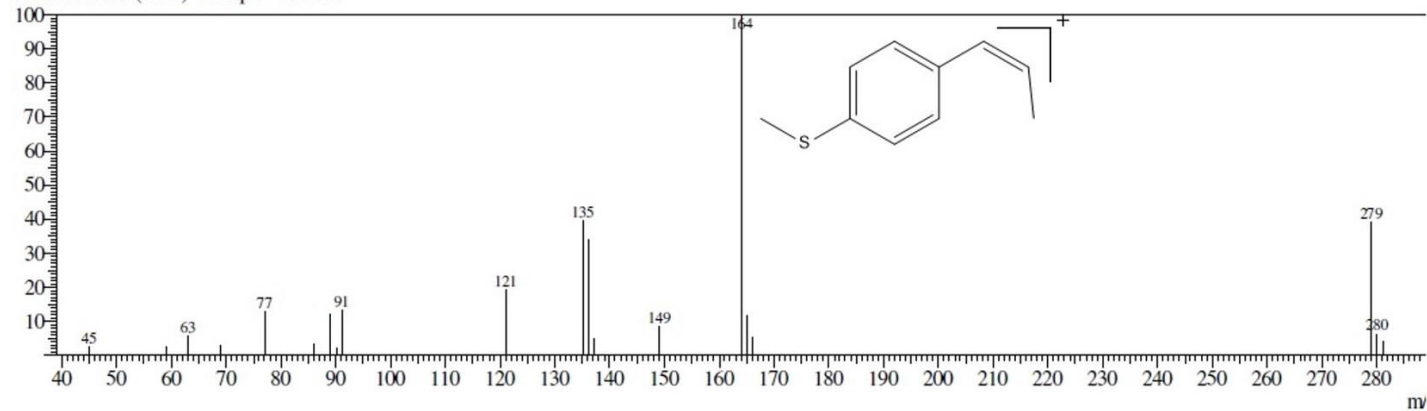
1	9,2	100
---	-----	-----

GC-MS

Line# 2 R.Time: 19.8 (Scan#: 1716)

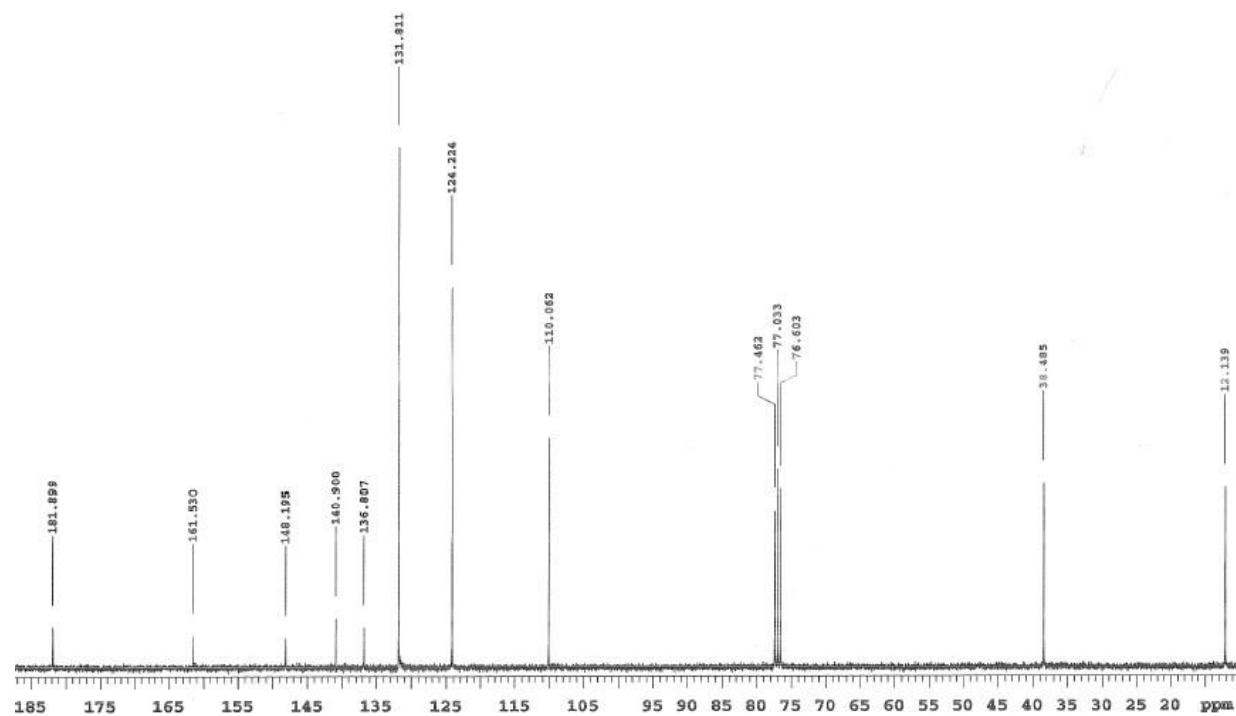
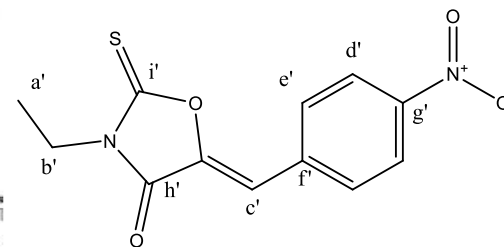
Raw Mode: Single 19.8 (1716) Base Peak: 164 (1052949)

BG Mode: 20.7 (1830) Group 1 - Event 1



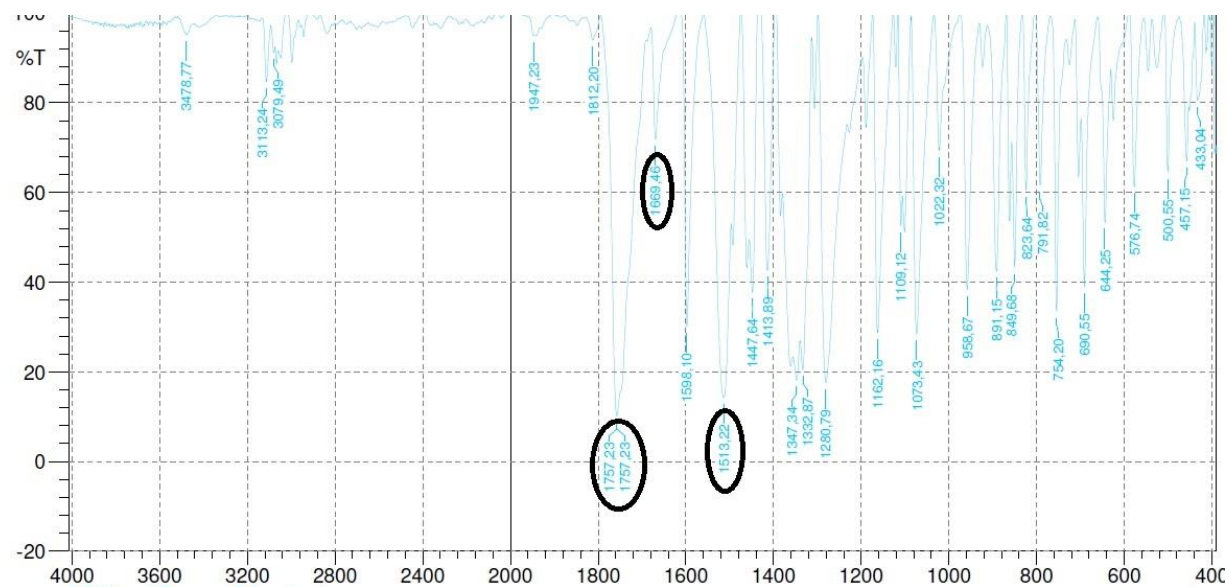
LPSF NBM-10: Tempo de retenção de 19.8 minutos. Perfil de fragmentação apresentando pico-base de 164. Massa molecular do composto: 279.

MS m/z (%) EI: 279; 164.

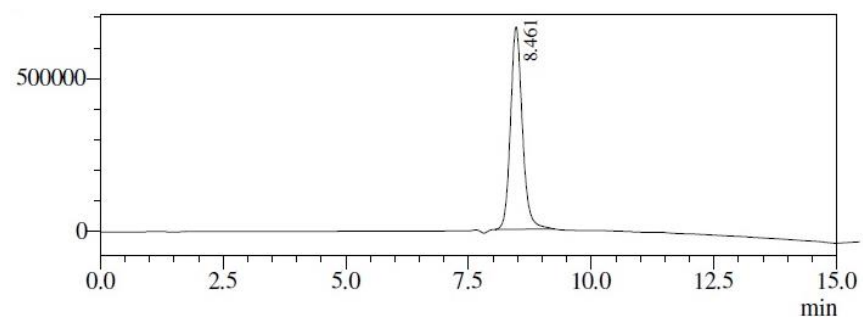
LPSF NBM-11 ^{13}C RMNRMN ^{13}C 

^{13}C RMN [75 MHz] CDCl_3 : a' 12.13, b' 38.48, c' 110.06, d' 124.22, e' 131.81, f' 136.80, g' 148.19, h' 161.53 (C=O), i' 181.89 (C=S)

IV



CLAE



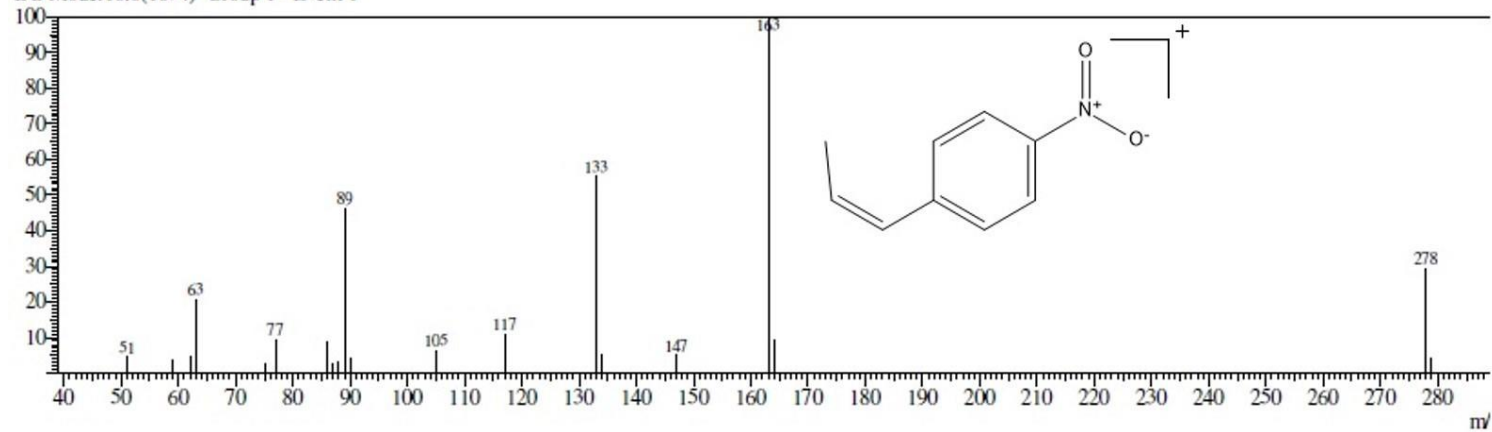
Número do(s) pico(s)	Tempo de retenção (min)	Área (%)
1	8,46	100

GC-MS

Line#: 1 R.Time: 18.3(Scan#: 1592)

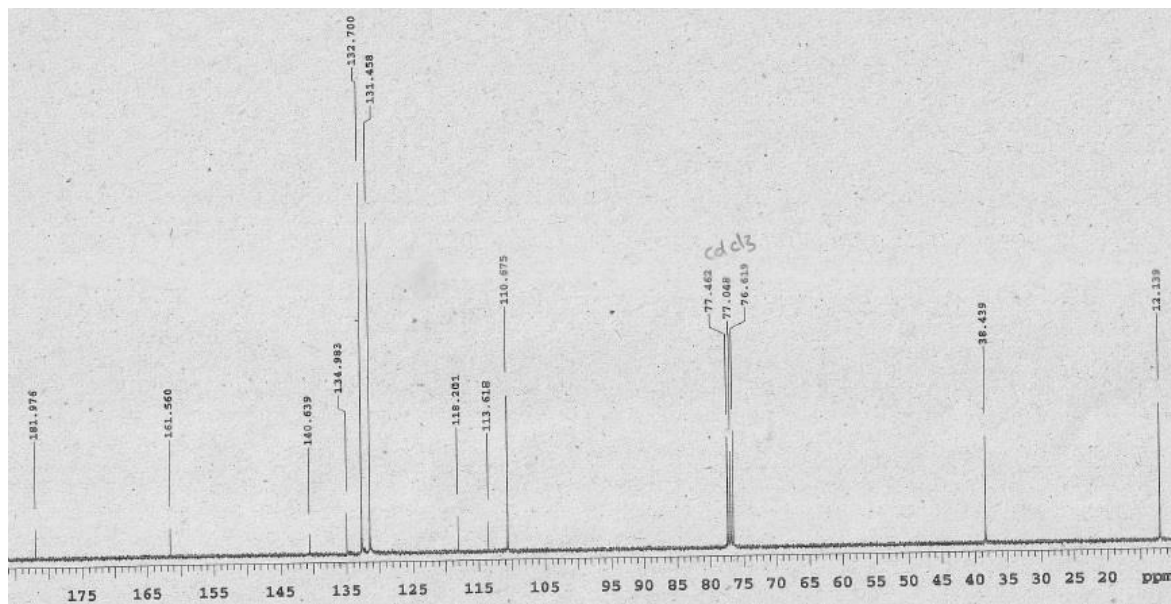
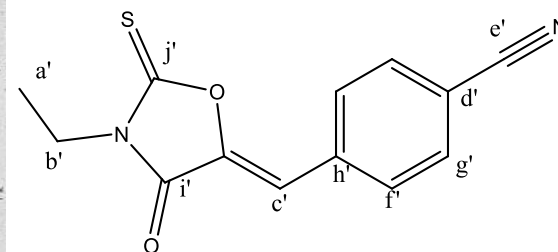
RawMode: Single 18.3(1592) BasePeak: 163(919539)

BG Mode: 18.8(1654) Group 1 - Event 1



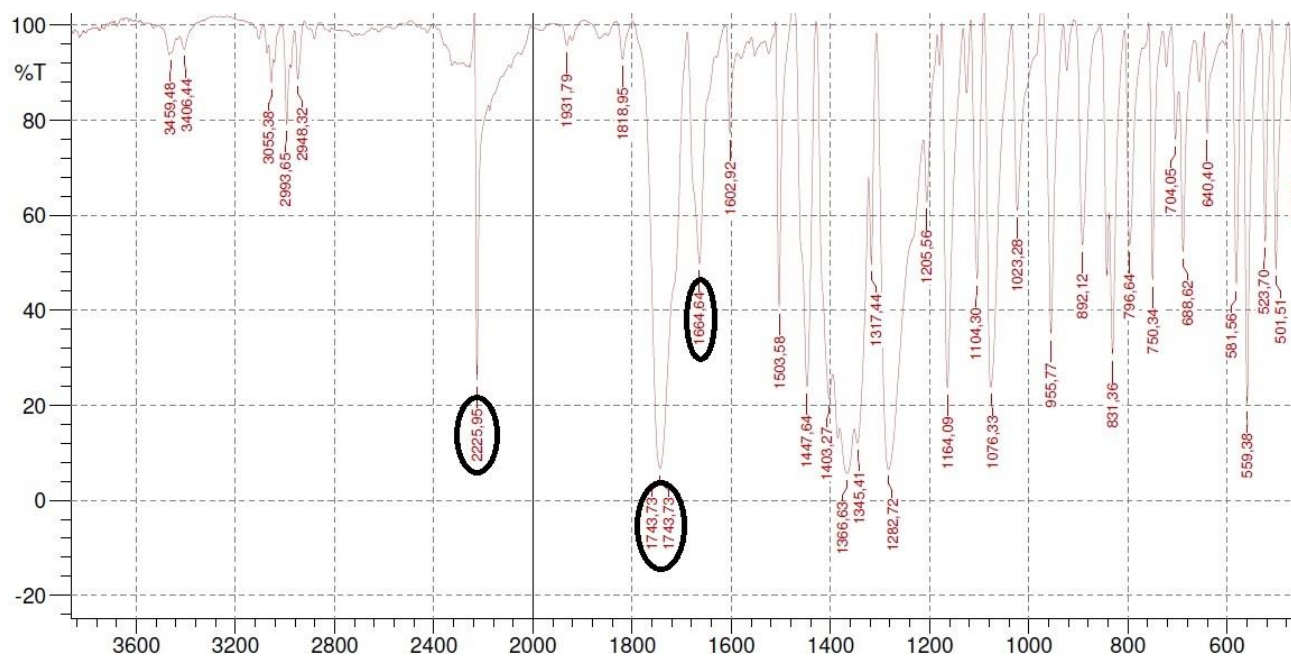
LPSF NBM-11: Tempo de retenção 18.3 minutos. Perfil de fragmentação apresentando pico-base de 163. Massa molecular do composto: 278.

MS m/z (%) EI: 278; 165.

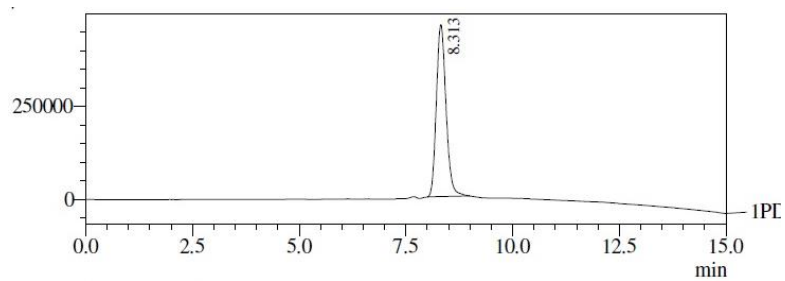
LPSF NBM-17 ^{13}C RMNRMN ^{13}C 

^{13}C RMN [75 MHz] CDCl_3 : a' 12.13, b' 38.43, c' 110.67, d' 113.61, e' 118.20, f' 131.45, g' 132.70, h' 134.98, i' 161.56 (C=O), j' 181.97 (C=S)

IV



CLAE

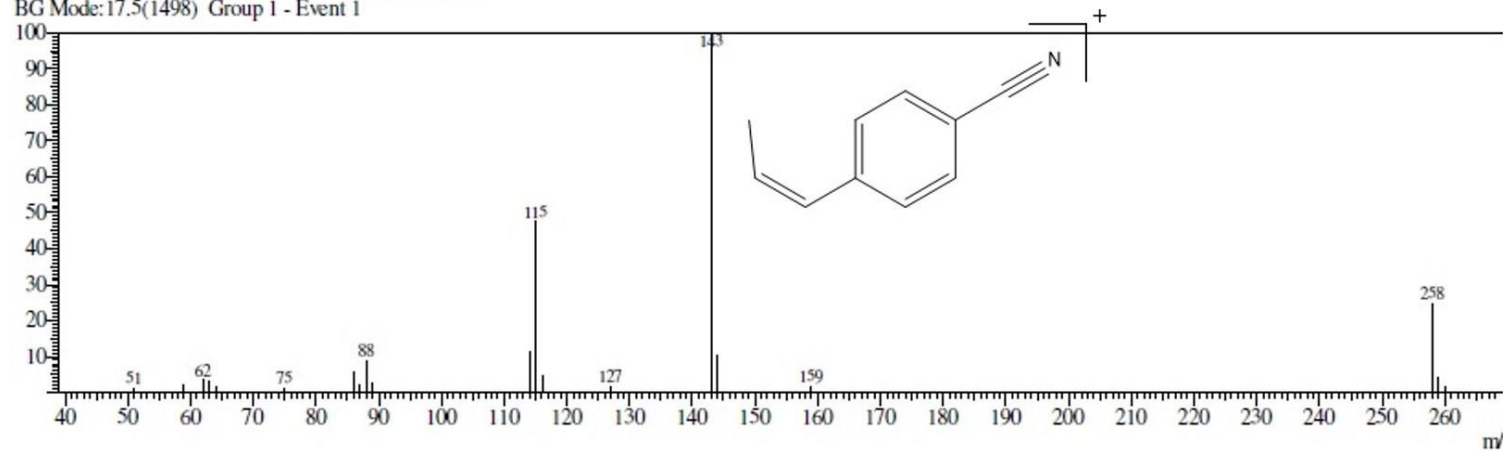


Número de picos	Tempo de retenção (min)	Área (%)
-----------------	-------------------------	----------

1	8,3	100
---	-----	-----

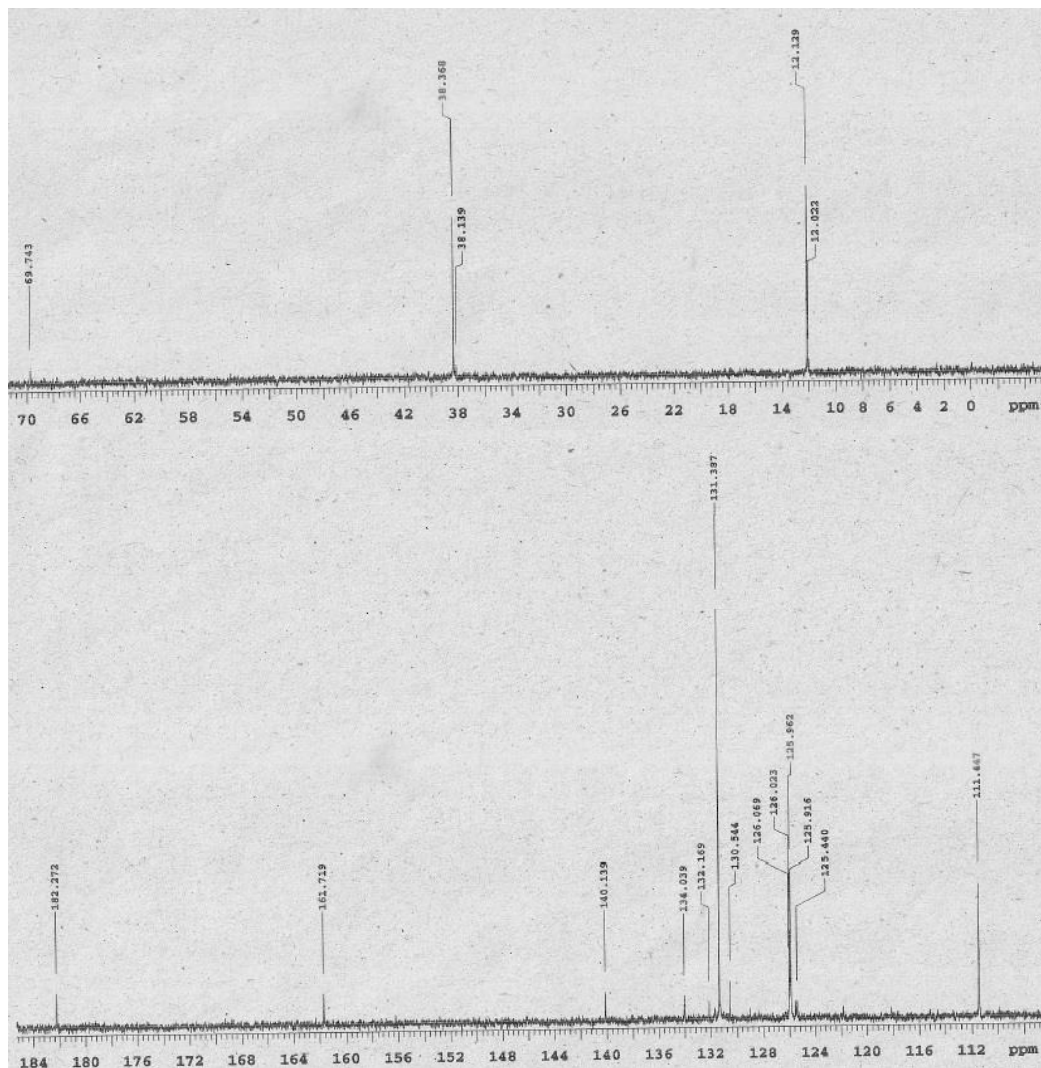
GC-MS

Line#: 1 R.Time: 17.1 (Scan#: 1458)
RawMode: Single 17.1 (1458) BasePeak: 143 (2247347)
BG Mode: 17.5 (1498) Group 1 - Event 1

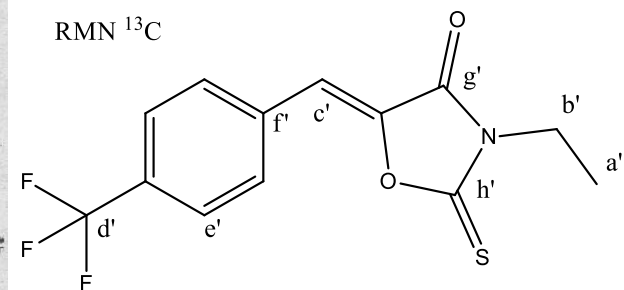


LPSF NBM-17: Tempo de retenção de 17.1 minutos. Perfil de fragmentação apresentando pico-base de 143. Massa molecular do composto: 258.

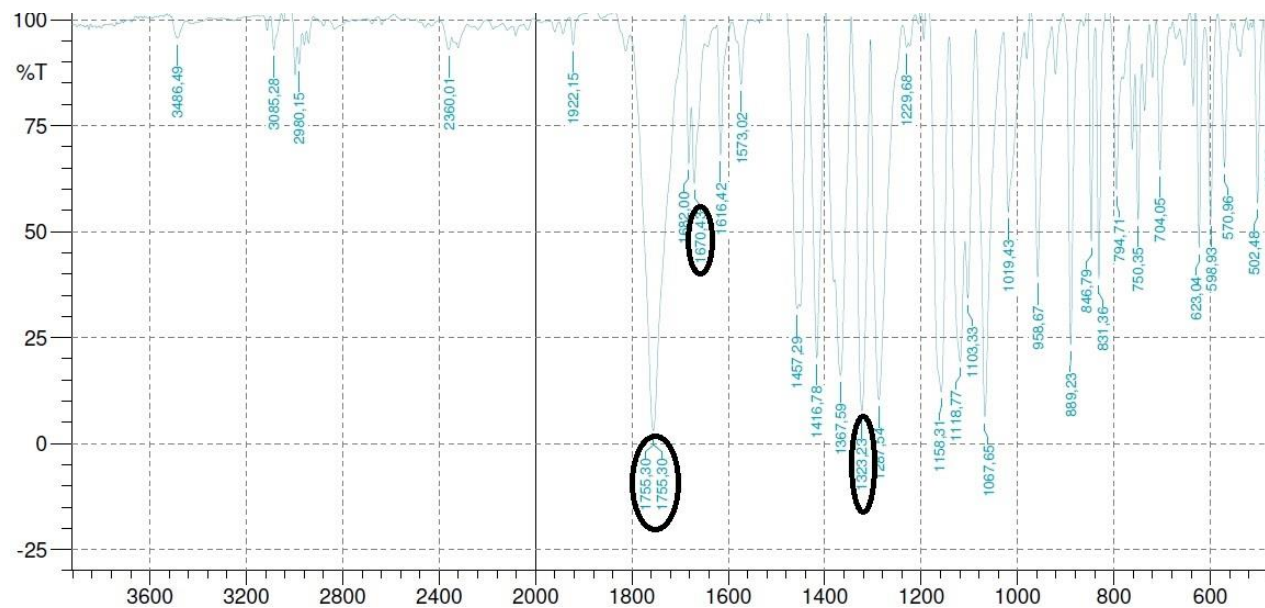
MS m/z (%) EI: 258; 143.

LPSF NBM-19 ^{13}C RMN

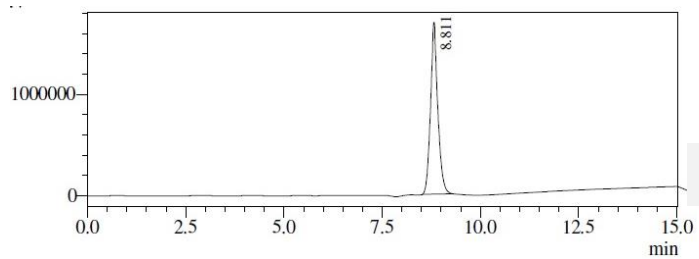
^{13}C RMN [75 MHz] CDCl_3 : a' 12.12, b' 38.36, c' 111.44, d' 125.96, e' 131.38, f' 134.03, g' 161.71 (C=O), h' 182.27 (C=S)



IV



CLAE



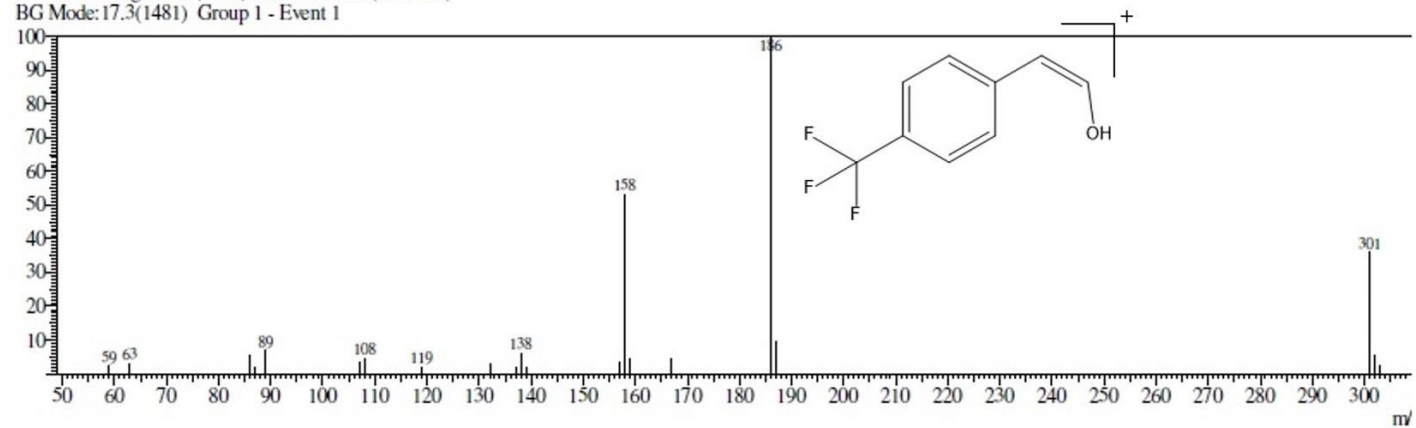
Número do(s) pico(s)	Tempo de retenção (min)	Área (%)
1	8,81	100

GC-MS

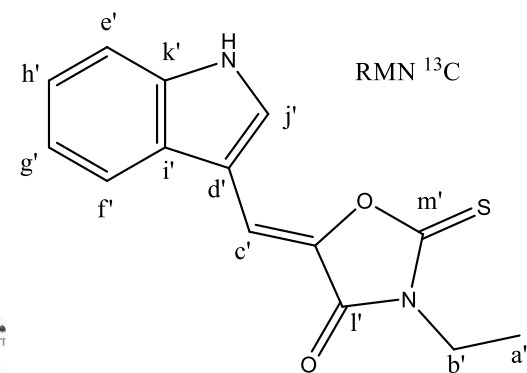
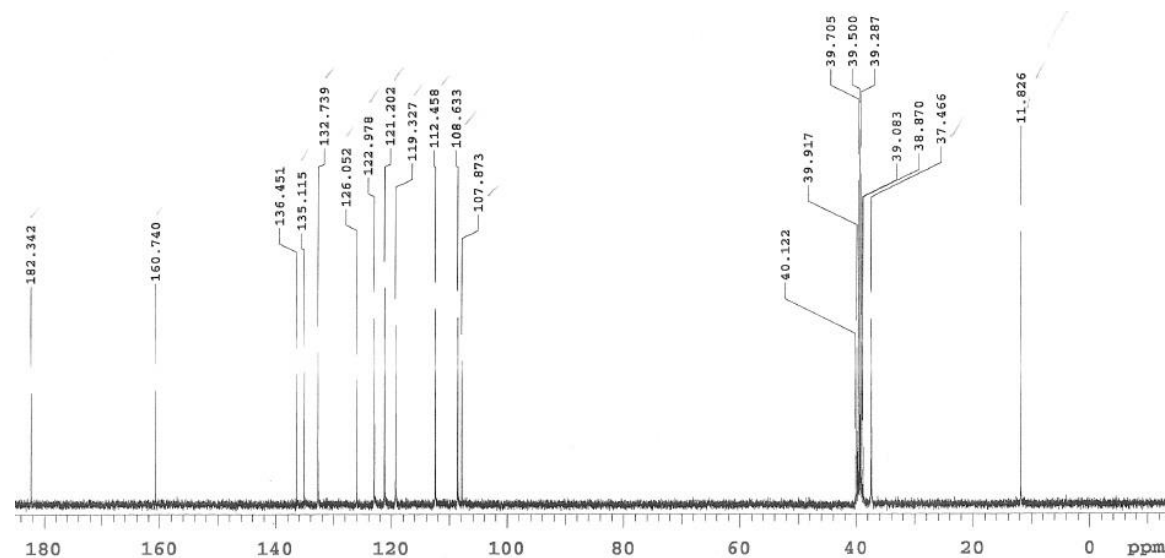
Line#:2 R.Time:13.7(Scan#:1046)

RawMode:Single 13.7(1046) BasePeak:186(2937120)

BG Mode:17.3(1481) Group 1 - Event 1

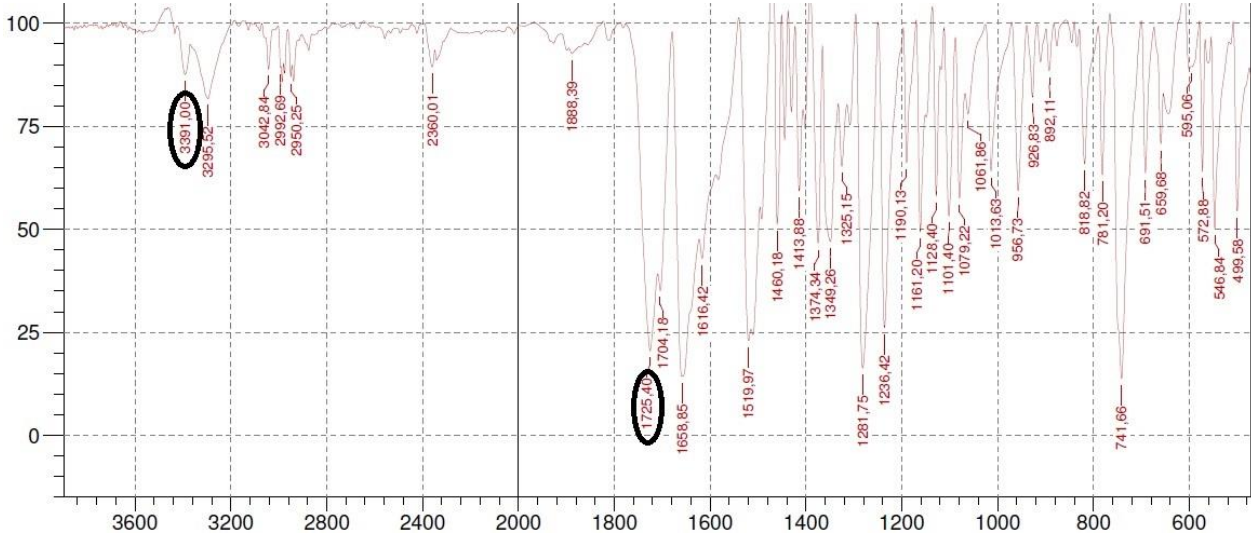


LPSF NBM-19: Tempo de retenção de 13.7 minutos. Perfil de fragmentação apresentando pico-base de 186. Massa molecular do composto: 301
MS m/z (%) EI: 301; 186.

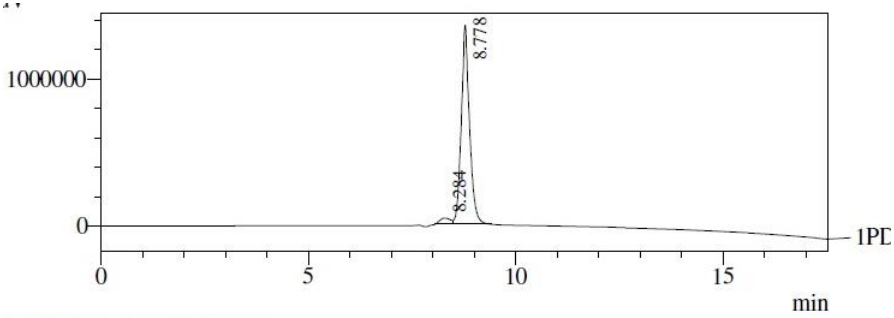
LPSF NBM-20 ^{13}C RMN

^{13}C RMN [75MHz, CDCl_3 , δ]: a' 11.82, b' 37.46, c' 107.87, d' 108.63, e' 112.45, f' 119.32, g' 121.20, h' 122.97, i' 126.05, j' 132.73, k' 135.11, l' 160.74, m' 182.34

IV

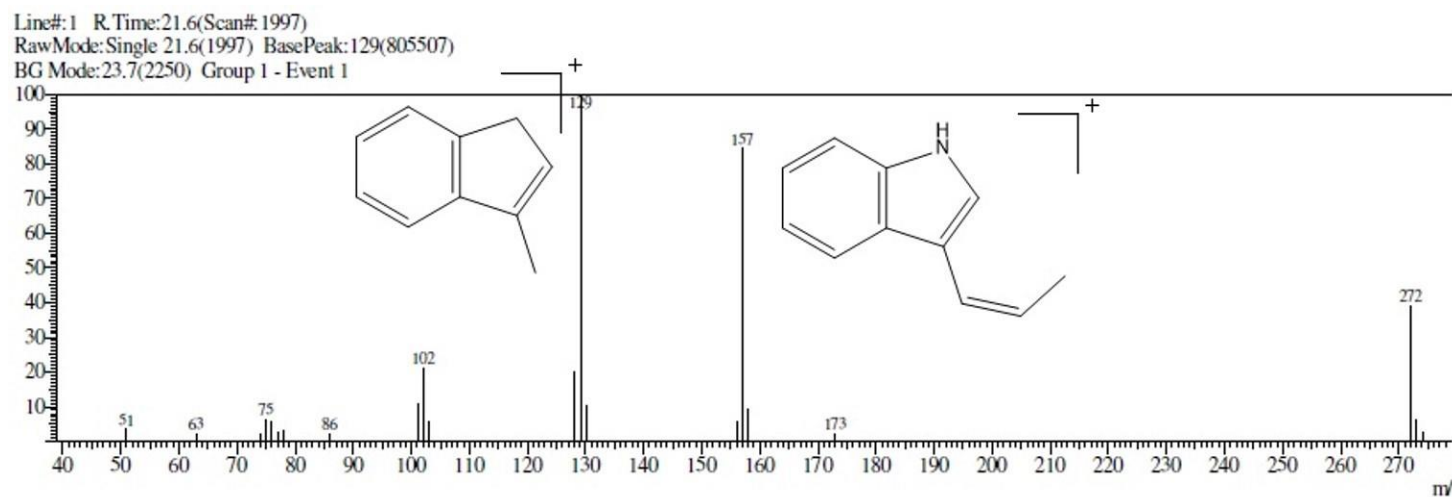


CLAE



Número dos picos	Tempo de retenção (min)	Área (%)
1	8,28	3,74
2	8,77	96,25

GC-MS



LPSF NBM-20: Tempo de retenção de 21.6 minutos. Perfil de fragmentação apresentando pico-base de 129. Massa molecular do composto: 272.

MS m/z (%) EI: 272; 157; 129.