

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL –
MESTRADO**

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM GESTÃO E TECNOLOGIA AMBIENTAL

Ivana da Rosa Garcia

**Avaliação da Citotoxicidade e Síntese de 3-Aril-5-Tiazolidinil-1,2,4-
Oxadiazóis em *Aspergillus* sp.**

Santa Cruz do Sul, Julho 2009.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ivana da Rosa Garcia

**Avaliação da Citotoxicidade e Síntese de 3-Aril-5-Tiazolidinil-1,2,4-Oxadiazóis em
Aspergillus sp.**

Dissertação de mestrado em Tecnologia
Ambiental pela Universidade de Santa Cruz
do Sul, como requisito para obtenção do
título de Mestre em
Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Dornelles.

Co-orientador: Prof. Dr. Valeriano Antonio Corbellini.

Santa Cruz do Sul, Julho 2009.

Ivana da Rosa Garcia

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E SÍNTESE DE 3-ARIL-5-TIAZOLIDINIL-
1,2,4-OXADIAZOIS EM *ASPERGILLUS* sp.**

Esta dissertação foi submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental – Mestrado, Área de Concentração Gestão e Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Dr. Luciano Dornelles

Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC

Orientador

Dr. Valeriano Antonio Corbellini

Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC

Co-orientador

Dr. Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues

Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

Dr. Wolmar Alípio Severo Filho

Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC

Dr. Ênio Leandro Machado

Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC

Dedico esta dissertação aos meus exemplos de vida, meu pai Sr. Ivo da Rosa Garcia e meu esposo Sr. Jatir Schena que sempre me estimularam a dar este grande passo. Estas duas pessoas com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigado por vocês existirem, corretos e competentes, fonte de inspiração e apoio.

Agradecimentos

Embora uma dissertação seja, pela sua finalidade acadêmica, um trabalho individual, há contributos de natureza diversa que não podem nem devem deixar de ser realçados.

Por está razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos.

Gostaria de agradecer, o meu orientador, prof. Dr. Luciano Dornelles, pelo enorme interesse demonstrado por esta dissertação e acima de tudo por suas brilhantes idéias, que certamente foram fundamentais para o desenvolvimento desta dissertação. De forma mais geral gostaria de agradecê-lo por sempre estimular a escolher os caminhos certos, não os mais fáceis, os já percorridos, mas sim aqueles que mais teriam a acrescentar, os mais desafiadores, que me fizeram cruzar limites.

Ao prof. Dr. Valeriano Antonio Corbellini, co-orientador desta dissertação, por sua ajuda e sábias idéias.

Minha família merece poucas palavras, mas aquelas que são as mais importantes. Obrigado por vocês existirem. Obrigado por depositarem em mim a confiança para todas as horas. “Sei que vocês se orgulham por eu ter atingido uma etapa que nenhum de nós tinha atingido antes”. Mas este orgulho que sentem por mim, converto em obrigação de a cada dia ser mais digna de representá-los. Mãe Sirlei e pai Ivo obrigado pela existência que me proporcionaram seus sofrimentos, suas dificuldades me fez forte e muito me ensinou. Mano e Manas, um beijo em cada um de vocês.

E ao Jatir, que por vezes deve ter detestado a mim e a este trabalho, pois ele sacrificou muitos momentos que poderíamos ter desfrutado juntos, mas sempre me incentivou, sempre apoiou e, o melhor de tudo, sempre me cobrou para que eu

continuasse e concluísse mais esta etapa de nossas vidas que vamos construindo juntos.
Te Amo.

As minhas adoradas filhas Paola e Camille, por encantarem ainda mais esta passagem e iluminam meus dias com sorrisos e ternura.

Aos bolsistas, principalmente o Sandro Pedroso da Cunha, pela colaboração e estímulo na realização da pesquisa.

Aos funcionários pela hospitalidade, agilidade e auxílio que permitiram a realização deste estudo.

Aos secretários do departamento de Química, por tornarem factível a realização deste trabalho sendo prestativos dedicados e competentes.

A coordenação do Mestrado em Tecnologia Ambiental, que sempre com muita eficiência, estiveram dispostas para ajudar em tudo que lhes foi solicitado.

A todas as amigas que conquistei nas intermináveis horas nos laboratórios, que compartilhamos risos e dificuldades, e acima de tudo sonhos...

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para execução dessa dissertação de Mestrado.

E principalmente a DEUS por iluminar sempre o meu caminho e enchê-lo de anjos...

Ivana

RESUMO

Este trabalho explorou a síntese e a avaliação da atividade citotóxica do 1,2,4-oxadiazóis, derivados das arilamidoximas e tiazolidinas. Estes compostos foram preparados através das reações das arilamidoximas (benzamidoxima; 4-clorobenzamidoxima; 4-toluilamidoxima; 4-metoxibenzamidoxima) com as tiazolidinas derivadas da L-cisteína etil-éster com acetona, formaldeído e ciclo-hexanona, utilizando carbonato de potássio e tolueno sob refluxo, durante 24 horas. Em outra metodologia, empregou-se uso de micro-ondas sem o uso de solvente para preparação dos oxadiazóis. Os 1,2,4-oxadiazóis foram sintetizados com rendimentos razoáveis, entre 48-68%, e entre 27-50%, nas metodologias empregando solvente e micro-ondas respectivamente. Os compostos foram identificados por espectroscopia no infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e carbono-13 (RMN ¹³C), através das quais se confirmou a obtenção dos compostos heterocíclicos de interesse. A reação de síntese, realizada por irradiação de micro-ondas, é uma forma quimicamente mais limpa com ganhos ambientais significativos: redução no tempo reacional; meio reacional livre de solventes; eficiência energética nas reações propostas e a não geração de efluentes. O 1,2,4-oxadiazol, derivado da benzamidoxima e da tiazolidina obtida através da reação da L-cisteína etil-éster e do formaldeído, após purificação por placa preparativa, foi avaliado através da atividade citotóxica contra várias cepas em *Aspergillus* sp., obtida da coleção de Microrganismos de Microbiologia Industrial (UNISC). Através da técnica de determinação de crescimento em ágar Sabouraud-dextrose com diluição seriada, a solução do composto inibiu o crescimento do fungo de todas as amostras na faixa de concentrações avaliadas, sendo que, de maneira geral o efeito de inibição se intensificou com o aumento da concentração do composto.

Palavras chaves: 1,2,4-oxadiazóis, micro-ondas, *Aspergillus* sp., atividade citotóxica.

ABSTRACT

This work explored the synthesis and the evaluation of cytotoxic activity of the 1,2,4-oxadiazoles, derived from the arylamidoximes and thiazolidines. These compounds were prepared through the reactions of the arylamidoximes (benzamidoxime; 4-chlorine-benzamidoxime; 4-tolylamidoxime; 4-methoxybenzamidoxime) with the thiazolidine derived from the esterified L-Cysteine Ethyl Ester with acetone, formaldehyde and cyclohexanone using potassium carbonate and toluene under reflux, for 24 hours. In another methodology, we used the microwave without solvent to the preparation of the oxidiazoles. The 1,2,4-oxadiazoles were synthesized with reasonable productivity, among 46-68%, and 27-50%, in the methodologies using solvent and microwave respectively. The compounds were identified by spectrometry in the infrared (IV), nuclear magnetic resonance of the hydrogen (NMR¹H) and carbon-13 (NMR¹³C), through which we confirmed the obtainment of the desired heterocyclic compound. The synthesis reaction, done by microwaves irradiation, is a cleaner chemical way with significant environmental gain: reduction in the reacting time; reacting means free solvents; energetic efficiency in the proposed reactions and the non-generation of effluents. The 1,2,4-oxadiazoles derived from benzamidoxime and thiazolidine obtained through the reaction of the L-Cysteine Ethyl Ester and the formaldehyde, after the purification by means of the preparative plate, was evaluated by means of the cytotoxic activity against various strains in *Aspergillus* sp. obtained from the collection of Microorganisms of Industrial Microbiology (UNISC). By means of the growing determination technique in agar Sabouraud dextrose with serial dilution, the compound solution inhibited the growth of the fungus in the rate of the evaluated concentrations, and, generally, the inhibition effect intensified with the growth of the compound concentration.

Keywords: 1, 2,4-oxadiazoles, microwave, *Aspergillus* sp., cytotoxic activity.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ar – Aromático

ATR – Reflexão total atenuada

BDA - Batata Dextrose Ágar

BOP-Cl - Cloreto de bis (2-oxo-3-oxalidínil)

CCDP - Cromatografia em camada delgada preparativa

CDI - 1,1'-carbonildiimidazol

CMMI - Coleção de Microrganismos de Microbiologia Industrial da UNISC

CMR – Crescimento micelial radial

DAS - Sabouraud Dextrose Ágar- Ágar Sabourad

DCC – N,N' - Díciclo-hexilcarbodiimida

DDT – Dicloro-difenil-tricloroetano

DIC - Cloreto de 2-(dimetilamino) isopropila

DMF – N, N-Dimetilformamida

DQO - Demanda Química de Oxigênio

DMSO - Dimetilsulfóxido

EDC – 1-[3-(dimetilamino) propil]-3-etilcarbodiimida

IV - Infravermelho

MIC - Concentração Inibitória Mínima

Pf - Ponto de fusão

Ph - Fenila

POPA - Ácido 3-[3-(fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]propiónico

ppm - Partes por milhão

Rf - Fator de relação.

RMN ¹H- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN ¹³C - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono

TBTU - 1,1,3,3-Tetrametilurônio

TMS - Tetrametilsilano

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Síntese dos 1,2,4-oxadiazóis através de reações com e sem solvente.....	2
Figura 2 - Estrutura química do POPA.....	4
Figura 3 - Estrutura química de pesticidas derivados de 1,2,4-oxadiazol 5 e 6	5
Figura 4- Reação de obtenção de 1,2,4-oxadiazóis a partir de amidoximas e haletos de arila.....	5
Figura 5 - Reações de preparação de 1,2,4-oxadiazóis, envolvendo métodos de O-acilação e cicloadição.....	6
Figura 6 - Reação de obtenção do 1,2,4-oxadiazóis tendo um grupo carbamoil na posição 3, através de 3 etapas.....	7
Figura 7 - Reações de carbamoilamidoximas com cloretos de di- e tricloroaceta...	7
Figura 8 - Reações de síntese de 1,2,4-oxadiazóis usando CDI como reagente de acoplamento.....	8
Figura 9 - Reações de síntese de 1,2,4-oxadiazóis utilizando o DCC como reagente de acoplamento.....	8
Figura 10 - Reações de síntese de 1,2,4-oxadiazóis com grupamento amino protegido.....	9
Figura 11- Reações de síntese de 1,2,4-oxadiazóis derivados de α -aminoacilbenzotriazóis e amidoximas.....	10
Figura 12 - Reações de síntese de 1,2,4-oxadiazóis sob condições livres de solventes.....	10
Figura 13 - Síntese do 1,2,4-oxadiazóis utilizando os métodos convencional e por irradiação por microondas.....	11
Figura 14 - Aspectos morfológicos macroscópicos e microscópicos de <i>Aspergillus niger</i> ; <i>A. terreus</i> ; <i>A. fumigatus</i> e <i>nidulans</i>	17
Figura15- Participação de diferentes enzimas de Fase I envolvidas no metabolismo de xenobióticos.....	20
Figura16- Emissão de tubo germinativo de <i>Aspergillus nidulans</i>	24
Figura 17 - Fluxograma da metodologia.....	26

Figura 18 - Preparação das arilamidoximas.....	29
Figura 19 - Métodos utilizados na preparação das tiazolidinas.....	30
Figura 20 - Metodologias utilizadas na obtenção dos 1,2,4-oxadiazóis 3a-c	32
Figura 21 - Preparação dos 1,2,4-oxadiazóis 3a-b	34
Figura 22 – Preparação dos 1,2,4-oxadiazóis através da irradiação por micro-ondas.....	41
Figura 23 - Espectro de IV e RMN ¹ H do composto 3 aa	49
Figura 24 - Gabarito de triplicata de discos de cultura de <i>Aspergillus</i> sp. utilizada como modelo para demonstrar como foram gerados os diâmetros de CMR.....	52
Figura 25 - Padrões de curvas de atividade fungistática.....	53
Figura 26 - Curvas de crescimento micelial radial de <i>Aspergillus</i> , sob diferentes concentrações de 1,2,4-oxadiazol.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Solventes e reagentes empregados na síntese e avaliação da atividade citotóxica dos 1,2,4-oxadiazóis.....	28
Tabela 2 - Aspectos físicos e rendimentos obtidos na síntese das tiazolidinas.....	39
Tabela 3 - Dados espectrais das tiazolidinas etil éster (2a-c) sintetizadas.....	40
Tabela 4 - Aspectos físicos e rendimentos obtidos na síntese do 1,2,4-oxadiazóis (3a-c).....	43
Tabela 5 - Dados de identificação dos 1,2,4-oxadiazóis sintetizados (3a-c).....	45
Tabela 6 – Identificação qualitativa de impactos ambientais na síntese dos 1,2,4-oxadiazóis com e sem solvente.....	50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	4
2.1 1,2,4-Oxadiazóis.....	4
2.2 Química Verde.....	11
2.2.1 Tecnologias Limpas.....	14
2.2.2 Micro-ondas.....	14
2.3 Aspectos morfofisiológicos de <i>Aspergillus</i> sp.....	15
2.3.1 Aplicações do gênero <i>Aspergillus</i> na área de tecnologia ambiental.....	18
2.3.2 Fungos como modelo microbiano de biotransformação de fármacos.....	20
2.3.3 <i>Aspergillus</i> sp. como bioindicador em estudos ecotoxicológicos.....	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Equipamentos.....	27
3.2 Solventes e reagentes.....	27
3.3 Preparação das arilamidoximas.....	29
3.4 Preparação das tiazolidinas.....	30
3.4.1 Preparação de ácido 4-tiazolidina carboxílico (48a).....	30
3.4.2 Preparação de ácido 2,2-dimetil-4-tiazolidina carboxílico (48b).....	30
3.4.3 Ciclização da <i>L</i> -cisteína etil éster.....	31
3.4.3.1 Ciclização da <i>L</i> -cisteína etil éster com formaldeído ou com propan-2-ona....	31
3.4.3.2 Ciclização do cloridrato de <i>L</i> -cisteína etil éster com ciclo-hexanona.....	31
3.5 Síntese dos 1,2,4-oxadiazóis.....	32
3.5.1 Preparação dos 1,2,4-oxadiazóis derivados das tiazolidinas 2a-c	32
3.5.1.1 Reações utilizando solvente sob refluxo (Método A).....	32
3.5.1.2 Reações sem solvente utilizando microondas doméstico (Método B).....	33
3.5.2 Preparação dos 1,2,4-oxadiazóis derivados das tiazolidinas 48a e 48b	33

3.5.2.1 Reações utilizando solvente sob refluxo (Método A).....	34
3.5.2.2 Reações sem solvente utilizando microondas doméstico (Método B).....	35
3.6 Análises espectroscópicas.....	35
3.6.1 Análises espectroscópicas na região do infravermelho (IV).....	35
3.6.2 Análises espectroscópicas de ressonância magnética nuclear.....	36
3.7 Ensaio de citotoxicidade.....	36
3.7.1 Amostragem.....	36
3.7.2 Ensaio de difusão em disco.....	36
3.7.3 Ensaio de crescimento micelial radial.....	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 Obtenção e análises dos materiais de partida.....	38
4.2 Obtenção e análise dos 1,2,4-oxadiazóis (3a-c).....	41
4.3 Avaliação de citotoxicidade em <i>Aspergillus sp</i>	51
4.3.1 Ensaio de difusão em disco.....	51
4.3.2 Ensaio de crescimento micelial radial.....	52
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ANEXOS.....	68
ANEXO A – Espectro de IV da Benzamidoxima 1a em KBr (drifts).....	69
ANEXO B - Espectro de IV da <i>p</i> -clorobenzamidoxima 1b em KBr (drifts).....	69
ANEXO C - Espectro de IV da <i>p</i> -toluilamidoxima 1c em KBr (drifts).....	70
ANEXO D - Espectro de IV da <i>p</i> -metoxibenzamidoxima 1d em KBr (drifts).....	70
ANEXO E1 - Espectro de IV da tiazolidina 2a (ATR).....	71
ANEXO E2 - Espectro de RMN ¹ H da tiazolidina 2a em CDCl ₃	71
ANEXO F1 - Espectro de infravermelho da tiazolidina 2b (ATR).....	72
ANEXO F2 - Espectro de RMN ¹ H da tiazolidina 2b em CDCl ₃	72
ANEXO G1 - Espectro de infravermelho da tiazolidina 2c (ATR).....	73
ANEXO G2 - Espectro de RMN ¹ H da tiazolidina 2c em CDCl ₃	74

ANEXO H1 - Espectro de IV do 1,2,4-oxadiazol 3aa em KBr (drifts).....	75
ANEXO H2 - Espectro de RMN ¹ H do 1,2,4-oxadiazol 3aa em CDCl ₃	75
ANEXO I1 - Espectro de IV do 1,2,4-oxadiazol 3ba em KBr (drifts).....	76
ANEXO I2 - Espectro de RMN ¹ H do 1,2,4-oxadiazol 3ba em CDCl ₃	76
ANEXO J1 - Espectro de IV do 1,2,4-oxadiazol 3ca em KBr (drifts).....	77
ANEXO J2 - Espectro de RMN ¹ H do 1,2,4-oxadiazol 3ca em CDCl ₃	77
ANEXO K1 - Espectro de IV do 1,2,4-oxadiazol 3da em KBr (drifts).....	78
ANEXO K2 - Espectro de RMN ¹ H do 1,2,4-oxadiazol 3da em CDCl ₃	78
ANEXO L1 - Espectro de IV do 1,2,4-oxadiazol 3ab (ATR).....	79
ANEXO L2 - Espectro de RMN ¹ H do 1,2,4-oxadiazol 3ab em CDCl ₃	79
ANEXO M1 - Espectro de IV do 1,2,4-oxadiazol 3bb (ATR).....	80
ANEXO M2 - Espectro de RMN ¹ H do 1,2,4-oxadiazol 3bb em CDCl ₃	80
ANEXO N1 - Espectro de IV do 1,2,4-oxadiazol 3cb (ATR).....	81
ANEXO N2 - Espectro de RMN ¹ H do 1,2,4-oxadiazol 3cb em CDCl ₃	81
ANEXO O1 - Espectro de IV do 1,2,4-oxadiazol 3db em KBr (drifts).....	82
ANEXO O2 - Espectro de RMN ¹ H do 1,2,4-oxadiazol 3db em CDCl ₃	82
ANEXO P1 - Espectro de IV do 1,2,4-oxadiazol 3ac (ATR).....	83
ANEXO P2 - Espectro de RMN ¹ H do 1,2,4-oxadiazol 3ac em CDCl ₃	83
ANEXO Q1 - Espectro de IV do 1,2,4-oxadiazol 3bc (ATR).....	84
ANEXO Q2 - Espectro de RMN ¹ H do 1,2,4-oxadiazol 3bc em CDCl ₃	84
ANEXO R1 - Espectro de IV do 1,2,4-oxadiazol 3cc (ATR).....	85
ANEXO R2 - Espectro de RMN ¹ H do 1,2,4-oxadiazol 3cc em CDCl ₃	86
ANEXO S1 - Espectro de IV do 1,2,4-oxadiazol 3dc (ATR).....	87
ANEXO S2 - Espectro de RMN ¹ H do 1,2,4-oxadiazol 3dc em CDCl ₃	88

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de pesquisa na busca de novas substâncias orgânicas que possuam atividades biológicas ressalta a importância de se explorar a síntese de compostos heterocíclicos que possam ser aplicados na área farmacêutica, médica e agroquímicas. Dentro dos princípios da necessidade de um desenvolvimento sustentável, tem-se como filosofia que a química deve manter a melhor qualidade de vida, diminuindo os danos causados ao meio ambiente.

Os derivados do 1,2,4-oxadiazóis constituem um grupo de compostos heterocíclicos de grande importância, no qual tem sido bastante explorado a sua síntese e testados quanto as suas atividades biológicas. Muitos destes compostos demonstram bioatividade (MELO et al., 1998), tais como: analgésica (ANTUNES et al., 2003), anti-inflamatória (AFIATPOUR et al., 1994; LEITE et al., 2000), antimicrobianas (DIANA e NITZ, 1995), antivirais (ALDOUS et al., 1995), pesticidas e inseticidas (JESCHKE et al., 1995), bloqueadoras de atividade β -adrenorreceptora combinados com moderadas propriedades bloqueadoras β -adrenorreceptora (SOKOLOV et al., 1995), entre outras.

Com base nesse contexto, um dos objetivos deste trabalho foi explorar a síntese de novos compostos heterocíclicos, os 1,2,4-oxadiazóis, derivados de arilamidoximas e de tiazolidinas, visando possíveis atividades biológicas, utilizando duas metodologias: reação com solvente e reação sem solvente utilizando microondas, conforme o esquema apresentado na Figura 1.

No quinto e último capítulo, “Considerações Finais” principais inferências sobre os objetivos atingidos e conclusões obtidas no desenvolvimento do estudo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 1,2,4-Oxadiazóis

O núcleo oxadiazólico despertou o interesse de diversos pesquisadores, especialmente após a década de 60, por possuir largo espectro de atividade farmacológica. Estudos envolvendo oxadiazóis foram conduzidos por Palazzo e colaboradores (1961), Jones e colaboradores (1965), Singh e Yadav (1977), Suman e Bahel (1979) e Ramalingan e colaboradores (1981), entre outros, demonstrando a versatilidade dos derivados oxadiazólicos como antimicrobianos, antiespasmódicos, antitussivos, analgésicos, antiinflamatórios, anestésicos locais e agentes ativos sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). Embora existam quatro isômeros dos oxadiazóis, os anéis 1,3,4- e 1,2,4-oxadiazol têm sido mais extensamente explorados, pois são responsáveis pelos melhores resultados farmacológicos e por possuírem maior número de bioisómeros eficientes.

Alguns dos compostos analgésico e antiinflamatórios mais potentes são os ácidos arilpropiónicos, como o Ibuprofeno e Naproxeno. Um destes ácidos, o ácido 3-[3-(fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il] propiónico (POPA) **4**, apresenta uma significativa atividade analgésica e anti-inflamatória observada após administração oral (AFIATPOUR et al., 1994). Sua estrutura química pode ser observada na Figura 2.

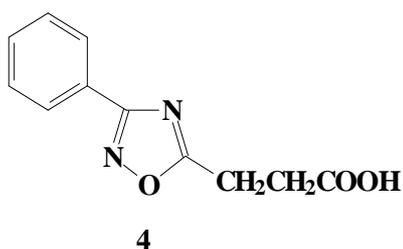


Figura 2 – Estrutura química do POPA.

Alguns oxadiazóis são utilizados como pesticidas, especialmente como inseticidas e acaricidas (JESCHKE et al., 1995), conforme as estruturas dos compostos **5** e **6** apresentados na Figura 3.

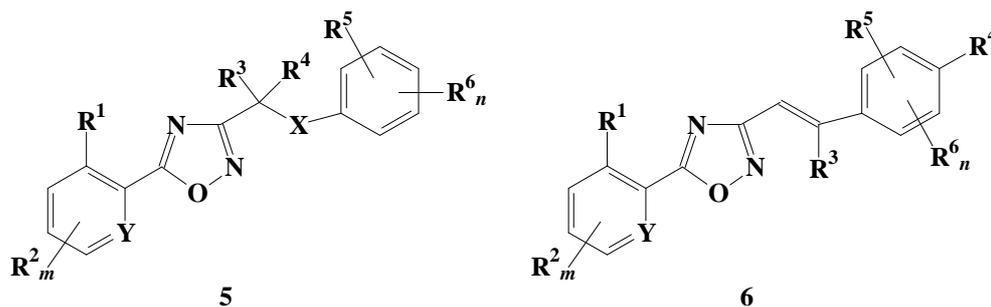


Figura 3 - Estrutura química de pesticidas derivados de 1,2,4-oxadiazol **5** e **6**.

As rotas mais comuns de síntese do 1,2,4-oxadiazóis, são a partir de amidoximas com (i) derivados de ácidos carboxílicos, como por exemplo cloretos de ácidos (MEYER et al., 2003), fluoretos (SAMS e LAU, 1999), anidridos (BORG et al., 1999), ou ésteres ativos (BUCHANAN et al., 1999; VU et al., 1999); (ii) ácidos carboxílicos na presença de reagentes de acoplamento incluindo diciclo-hexilcarbodiimida (DCC) (DORNELLES et al., 2004), 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDC) (LIANG e FENG, 1996; RICE e NUSS, 2001; RUDOLPH et al., 2001), cloreto de 2-(dimetilamino) isopropila (DIC)/HOBt (HAMZÉ et al., 2003), cloreto de bis (2-oxo-3-oxazolidinil) fosfínico (BOP-Cl) (BORG et al., 1995), tetrafluoroborato de 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (TBTU) (EVANS et al., 2003), ou 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) (DEEGAN et al., 1999). Outros métodos de obtenção do 1,2,4-oxadiazóis **9** envolvem reações de amidoximas **7** com haletos de arila **8** e derivados de ácidos carboxílicos na presença de reagentes de acoplamento (YOUNG E De VITA, 1998), ou com aldeídos seguido por oxidação (SRIVASTAVA et al., 2003), conforme pode ser observado na Figura 4.

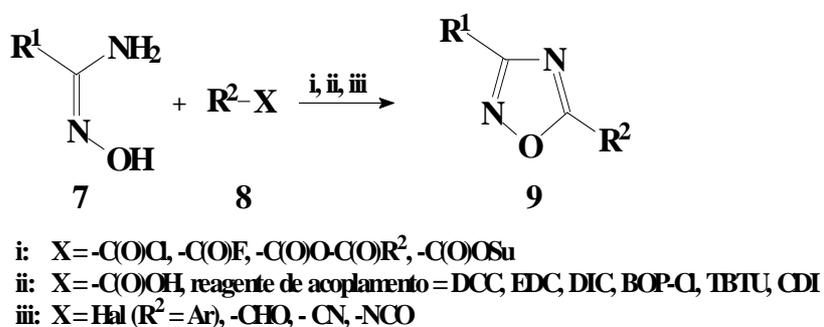


Figura 4 - Reação de obtenção de 1,2,4-oxadiazóis a partir de amidoximas e haletos de arila ou derivados de ácidos carboxílicos.

Embora existam numerosos relatos de preparação de derivados de 1,2,4-oxadiazóis **13**, a maior parte deles pode ser dividida em dois grupos, segundo Clapp (1984). Um método é a transformação química de amidoximas **10**, o qual envolve O-acilação, seguido pela condensação intramolecular do composto **12** (rota 1 da Figura 5). O outro método é a cicloadição 1,3-dipolar de nitrilas **15** com óxidos de nitrila **14** (rota 2 da Figura 5).

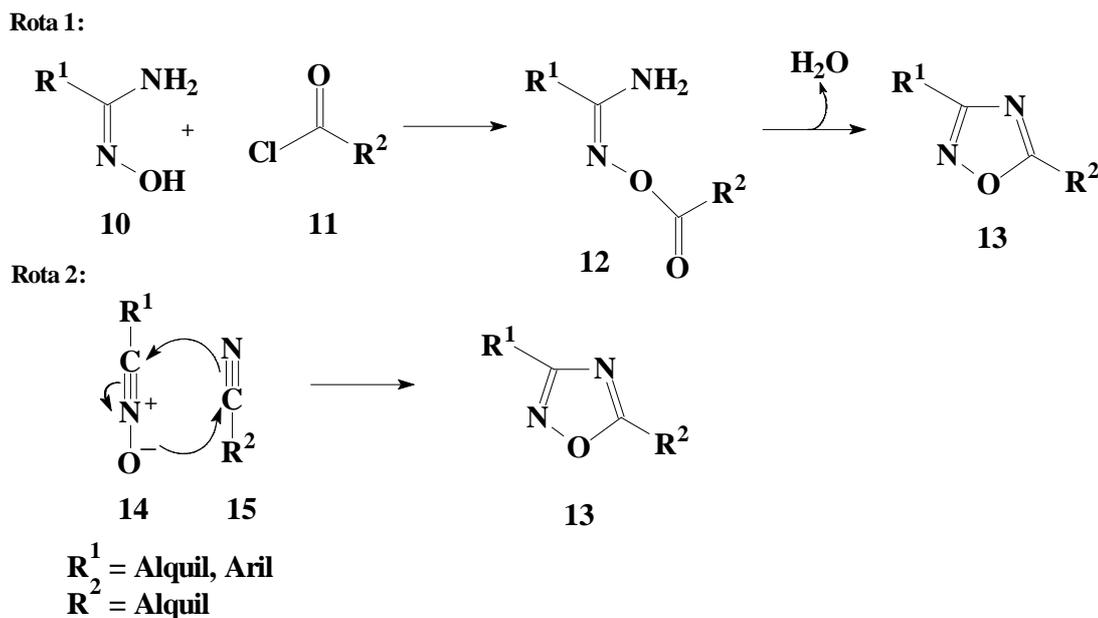


Figura 5 - Síntese de 1,2,4-oxadiazóis, envolvendo métodos de O-acilação (rota 1) e cicloadição (rota 2).

Uma série de 1,2,4-oxadiazóis **20**, tendo um grupo carbamoil na posição 3, foram sintetizados a partir de 2-metil-4-nitroisoxazolin-5(2*H*)-ona **16** através de 3 etapas, descritas por Ariga e colaboradores (2006). A amonólise de nitroisoxazolonas **12** leva á formação de 2-amino-2-hidroxiimino-*N*-metilacetamida **17** em excelentes rendimentos. A O-acilação da amidoxima **17**, seguido pela formação do heterociclo, procedeu sob condições suaves para formar os 3-carbamoil-1,2,4-oxadiazóis **20** tendo na posição 5 um substituinte que pode ser facilmente modificado pela substituição do agente de O-acilação (Figura 6).

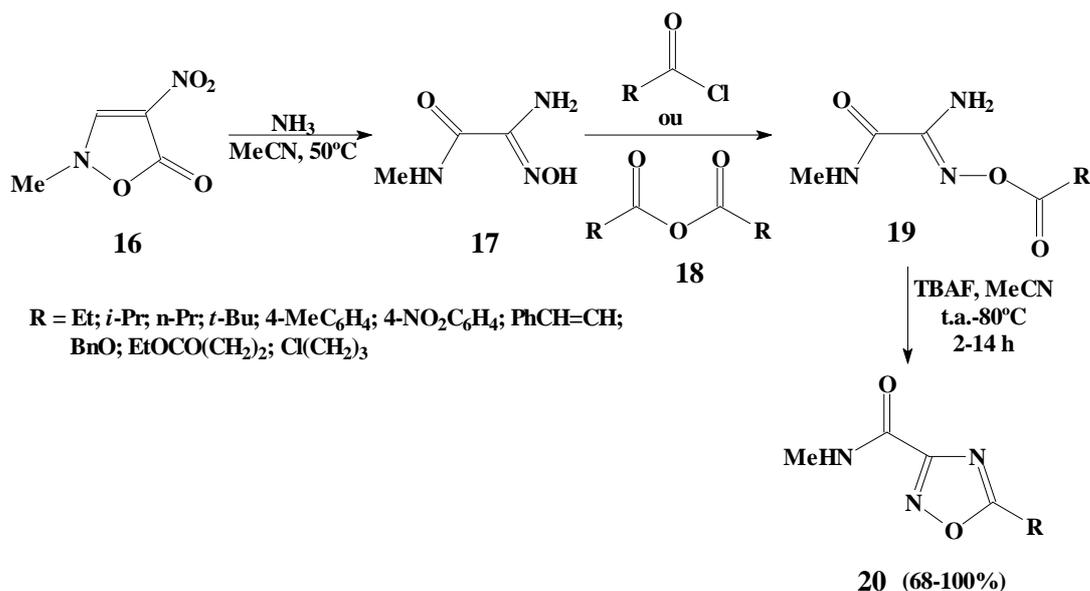


Figura 6 - Reação de obtenção do 1,2,4-oxadiazóis tendo um grupo carbamoil na posição 3, através de 3 etapas.

A síntese de 3-carbamoil-1,2,4-oxadiazóis tem atraído considerável atenção nos últimos anos, pois são exploradas a sua utilização como herbicidas. Um método de síntese deste 1,2,4-oxadiazóis **23**, foram descritos por Yarovenko e colaboradores (2002), sendo obtidos através de reações de carbamoilamidoximas **21** com cloretos de dicloro- e tricloroacetila **22** e com a adição de Na_2CO_3 anidro, conforme a Figura 7.

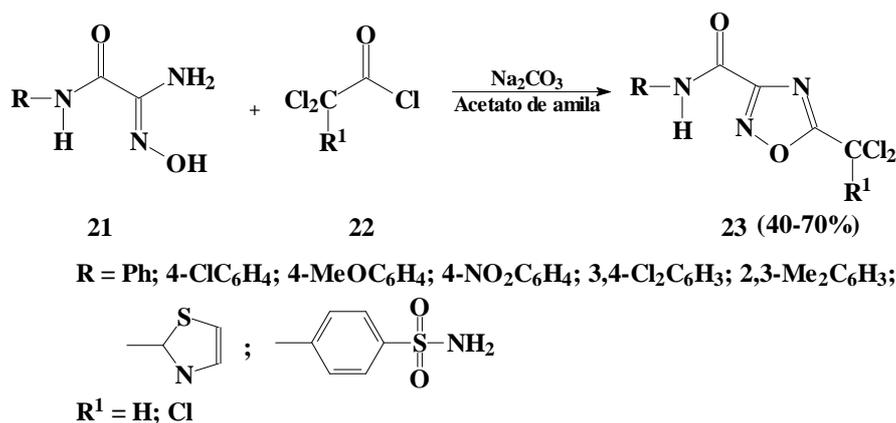


Figura 7 - Reações de carbamoilamidoximas com cloretos de di- e tricloroacetila.

Porco Jr. e colaboradores (1999) descreveram a síntese de 1,2,4-oxadiazóis **27**, usando CDI como reagente de acoplamento, através da reação entre arilamidoximas **24** e

ácidos carboxílicos **25**. A utilização de CDI facilitou a purificação dos oxadiazóis pela simples extração líquido-líquido e filtração (Figura 8).

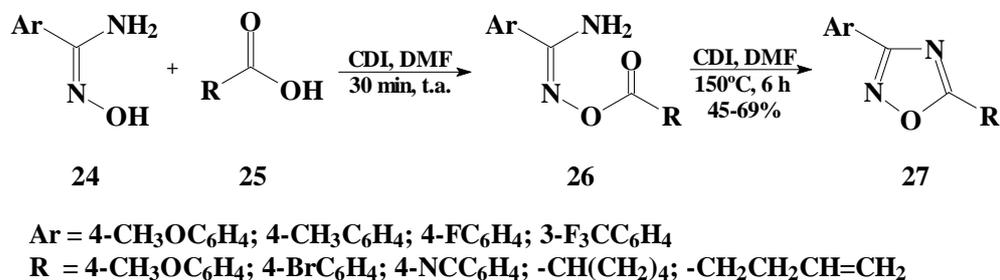


Figura 8 - Reações de síntese de 1,2,4-oxadiazóis usando CDI como reagente de acoplamento.

Srivastava e colaboradores (2005) relataram a síntese do 1,2,4 oxadiazóis **31** derivados de arilamidoximas **28** e do ácido palmítico **29**, utilizando o DCC como reagente de acoplamento. Estes heterocíclicos foram explorados por possuírem propriedades antiinflamatórias similares ao da aspirina e do ibuprofeno. Três compostos (1,2,4-oxadiazóis derivados da benzamidoxima, 4-toluilamidoxima e 4-clorobenzamidoxima) foram avaliados para atividades antitumorais, onde o 1,2,4-oxadiazol derivado da 4-toluilamidoxima, demonstrou uma excelente atividade comparado com o lapachol, conforme esquema representado na Figura 9.

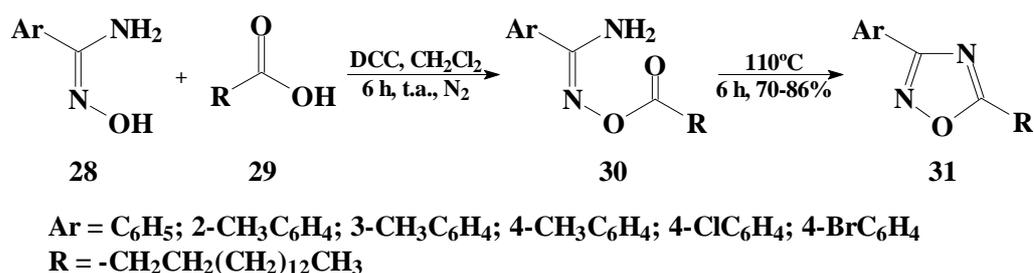


Figura 9 - Reações de síntese de 1,2,4-oxadiazóis utilizando o DCC como reagente de acoplamento.

Doze novos compostos, os 1,2,4-oxadiazóis **35**, foram sintetizados por Dolenc e colaboradores (2007) com baixos rendimentos, através da reação entre arilamidoximas **34** e cloreto de etilmalonila. As estruturas do 1,2,4-oxadiazóis **35** obtidos contém uma amina e

protegida e grupo éster, assim podem ser aplicados como potenciais blocos peptidomiméticos. A rota sintética foi realizada em condições simples e brandas de modo que a quiralidade dos aminoácidos **32** de partida foi mantida (Figura 10).

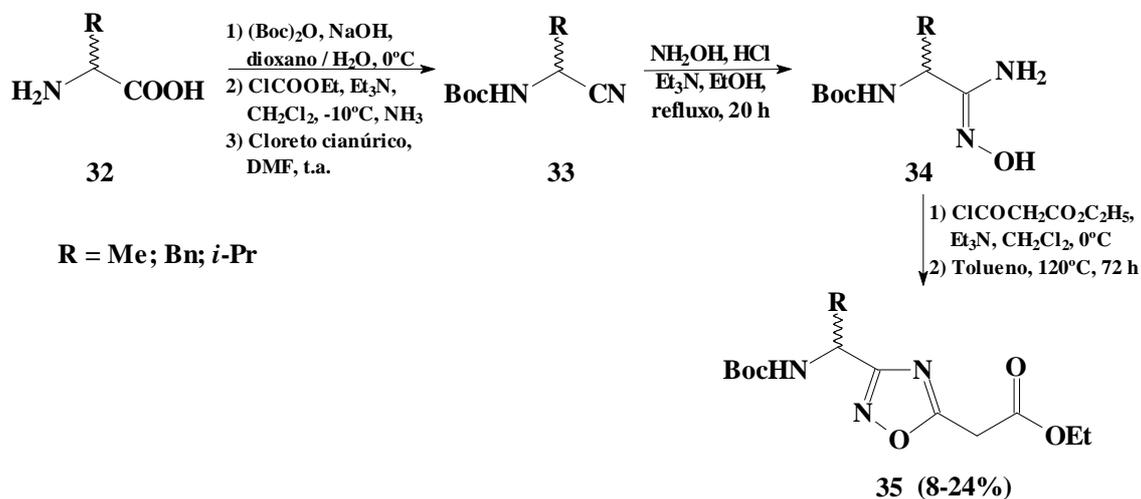


Figura 10 - Reações de síntese de 1,2,4-oxadiazóis com grupamento amino protegido.

Katritzky e colaboradores (2005) descreveram a síntese de 1,2,4-oxadiazóis **39** derivados de α -aminoacilbenzotriazóis quirais **36** e de amidoximas **37** através de um procedimento simples e rápido. Durante todo o processo de síntese, a quiralidade original foi preservada em mais de 97% dos produtos enantiomericamente puros (Figura 11).

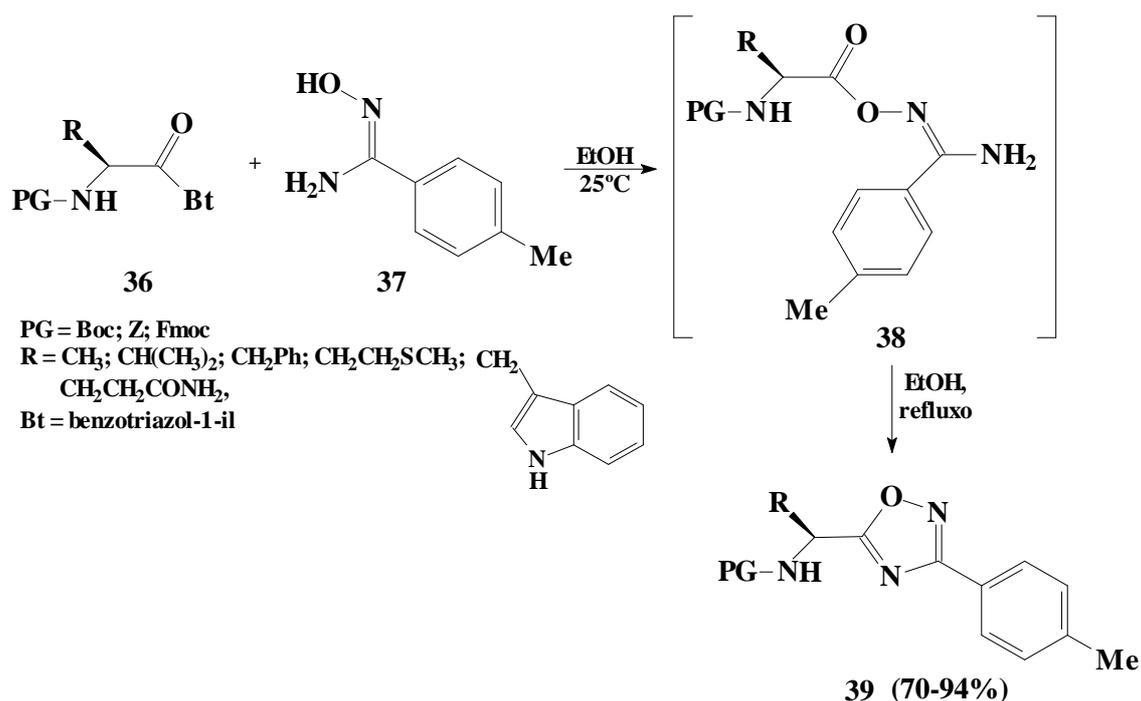
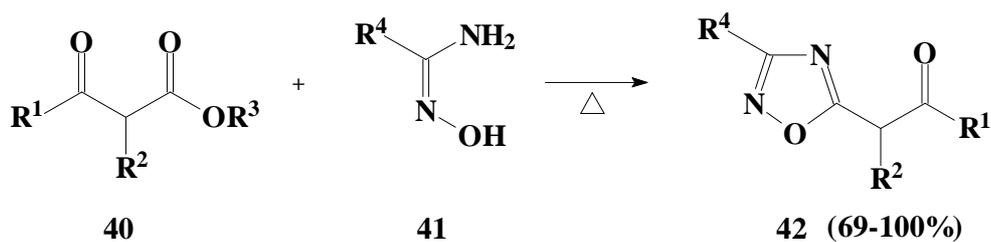


Figura 11 - Reações de síntese de 1,2,4-oxadiazóis derivados de α -aminoacilbenzotriazóis e amidoximas.

Recentemente Du e colaboradores (2007) descreveram a síntese verde de 5- β -ceto-1,2,4-oxadiazóis **42**, através do aquecimento de β -cetoésteres **40** e amidoximas **41** sob condições livres de solventes, obtendo os produtos com elevados rendimentos (Figura 12).



R¹ = Me; *t*-Bu
 R² = H; Bn
 R³ = *t*-Bu; Me; Et
 R⁴ = Ph; 4-MeOC₆H₄; 4-CF₃C₆H₄; 4-MeOCOC₆H₄; COOEt; *i*-Pr, CH₂OBn;

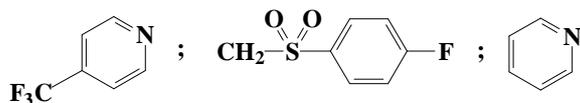
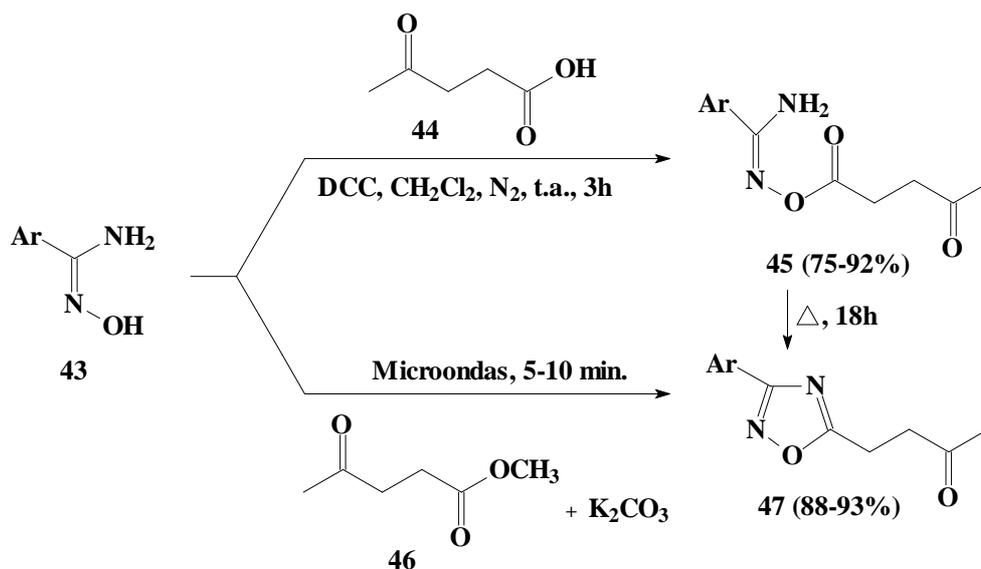


Figura 12 - Reações de síntese de 1,2,4-oxadiazóis sob condições livres de solventes.

Srivastava e colaboradores (2007) descreveram a síntese de 4-[3-(aril)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-butan-2-onas **47** a partir do luvinato de metila **46** e arilamidoximas **43**. A reação foi realizada em forno de micro-ondas, sem qualquer solvente em menor tempo reacional e em rendimentos comparáveis com aquecimento convencional, conforme esquema da Figura 13.



Ar = C₆H₅, 2-CH₃C₆H₄, 3-CH₃C₆H₄, 4-CH₃C₆H₄, 4-ClC₆H₄, 4-BrC₆H₄, 4-O₂NC₆H₄, 4-CH₃OC₆H₄

Figura 13 – Síntese do 1,2,4-oxadiazóis utilizando os métodos convencional e por irradiação por microondas.

2.2 Química Verde

A química tem uma grande participação nos dias atuais com os inúmeros produtos fundamentais à humanidade. A sua presença pode ser destacada desde diversos combustíveis aos mais complexos medicamentos. Porém, a produção química também gera inúmeros inconvenientes, como a formação de subprodutos tóxicos e a contaminação do ambiente e do próprio homem expostos a estes xenobióticos (POLIAKOFF et al., 2002 ; GRAEDEL, 1999).

Dentro da problemática industrial vigente, um dos principais problemas que se destaca é o grande volume de efluentes tóxicos produzidos por vários processos químicos. A emissão de contaminantes pode ser minimizada através de diversos caminhos, tais como o emprego de reagentes alternativos apropriados (CLARK e MACQUARRIE, 1998), o aumento da seletividade para maximizar o uso dos materiais de partida, a utilização de catalisadores para facilitar a separação do produto final da mistura, bem como a reciclagem dos reagentes e catalisadores empregados no processo (CLARK e MACQUARRIE, 1996).

Dentro dos princípios da necessidade de um desenvolvimento sustentável, tem-se como regra que a química deve manter e melhorar a qualidade de vida. Tal fato requer uma nova conduta química para o aprimoramento dos processos com o objetivo fundamental da geração cada vez menor de resíduos e efluentes tóxicos, bem como da menor produção de gases indesejáveis ao ambiente. Este novo caminho a ser delineado pela química é denominado como química verde (CLARK, 1999; TUNDO et al., 2000).

A química verde tem a preocupação do desenvolvimento de tecnologias e processos incapazes de causar poluição. Idealmente a aplicação dos princípios da química verde conduz à regulamentação, ao controle para não causar a uma remediação desnecessária. Além dos benefícios ambientais, tal pensamento apresenta um impacto econômico graças à diminuição de gastos com armazenamento, tratamento de resíduos e a descontaminação. Assim, a adoção da química verde é só mais uma das iniciativas para a prevenção desenfreada. Este novo pensamento científico incentiva tal combinação e a implantação da química verde nos currículos e na prática científica, bem como aplicá-la em escala comercial e industrial (TUNDO et al., 2000).

A emergência da química verde está sendo suportada por sociedades científicas, governos e indústrias (THORNTON, 2001). Os princípios da prática química guiada pela preocupação com a qualidade de vida e com o meio ambiente formam os doze princípios da química verde:

- Prevenção - é melhor prevenir a formação de subprodutos do que tratá-los posteriormente;
- Economia de átomos - Os métodos sintéticos devem ser desenvolvidos para maximizar a incorporação dos átomos dos reagentes nos produtos finais desejados;

- Síntese com compostos de menor toxicidade - Sempre que possível deve-se substituir compostos de alta toxicidade por compostos de menor toxicidade nas reações químicas;
- Desenvolvimento de compostos seguros - Os produtos químicos deverão ser desenvolvidos para possuírem a função desejada, apresentando a menor toxicidade possível;
- Diminuição de solventes e auxiliares - A utilização de substâncias auxiliares deverá ser evitada quando possível, ou usadas inócuas ao processo;
- Eficiência energética - Os métodos sintéticos deverão ser conduzidos sempre que possível à pressão e temperatura ambientes, para diminuir a energia gasta durante um processo químico que representa um impacto econômico e ambiental;
- Uso de substâncias recicladas - Os produtos e subprodutos de processos químicos deverão ser reutilizados sempre que possível;
- Redução de derivados - A derivação deverá ser minimizada ou evitada quando possível, pois estes passos reacionais requerem reagentes adicionais e, conseqüentemente, podem produzir subprodutos indesejáveis;
- Catálise - A aplicação de catalisadores para aumentar a velocidade e o rendimento dos processos químicos;
- Desenvolvimento de compostos para degradação - Produtos químicos deverão ser desenvolvidos para a degradação inócua de produtos tóxicos, para não persistirem no ambiente;
- Análise em tempo real para a prevenção da poluição - As metodologias analíticas precisam ser desenvolvidas para permitirem o monitoramento do processo em tempo real, para controlar a formação de compostos tóxicos;
- Química segura para a prevenção de acidentes - As substâncias usadas nos processos químicos deverão ser escolhidas para minimizar acidentes em potencial, tais como explosões e incêndios (ANASTAS e KIRCHHOFF, 2002; HJERESSEN et al., 2000; WINTERTON, 2001; TROST, 1995).

2.2.1 Tecnologias Limpas

A conscientização de que devemos cuidar hoje do meio ambiente para não sofreremos severas conseqüências futuras é constatada a cada ano. São inúmeros os casos de catástrofes naturais decorrentes dos maus tratos ocasionados pela sociedade. Por esta razão, as chamadas tecnologias limpas estão cada vez mais presentes em nosso dia-a-dia (ANASTAS e WILLIAMSON, 1996; CANN, 1999).

Tecnologias limpas deve-se salientar, não significam tecnologias sofisticadas ou adequadas a um nicho muito específico de mercado. Via de regra, tecnologias limpas são aquelas baseadas em matéria-prima renovável, muitas vezes de origem biológica, o que facilita o descarte do produto após o uso (ANASTAS e WARNER, 1998).

A atual tendência de desenvolvimento na área química aponta para a utilização de processos que emitam menos poluentes, pelo uso dos chamados “equipamentos verdes”. De modo geral, a obtenção de equipamentos de menor impacto ambiental significará menor custo de tratamento de efluentes e, portanto, maior ganho de produtividade.

2.2.2 Micro-ondas

As micro-ondas são radiações eletromagnéticas não ionizantes, que possuem uma frequência que vai de 300 a 300.000 MHz e que corresponde a comprimentos de onda de 1 mm a 1 m. A região de microondas situa-se entre a região infravermelho e ondas de rádio no espectro eletromagnético (ZLOTORZYNSKI, 1995).

Os avanços nas sínteses orgânicas catalisadas por sólidos ácidos e básicos com a irradiação micro-ondas permitem que muitas reações sejam feitas na ausência de quaisquer solventes orgânicos (KINGSTON e JASSIE, 1988).

As reações orgânicas com catálise heterogênea têm sido muito aplicadas no contexto industrial. Estas reações são acompanhadas com sucesso devido ao fato de que os catalisadores suportados em compostos porosos apresentam uma ótima dispersão dos sítios reativos, aumentando a seletividade e a eficiência das reações tradicionais. Os suportes sólidos usados nestas reações podem ser reciclados e reutilizados como catalisadores destas reações. As reações aceleradas pela irradiação micro-ondas envolvem a absorção

seletiva da radiação micro-ondas pelas moléculas polares, já que as moléculas apolares são inertes à perda dielétrica na região das micro-ondas (VARMA e SAINI, 1998; VARMA, 1999).

Os primeiros relatos de reações orgânicas conduzidas em forno de micro-ondas domésticos surgiram em 1986, em dois trabalhos independentes de Gedye e Giguere. As reações foram conduzidas em frasco selado com uma comparação com o aquecimento convencional. Uma notável redução no tempo de reação foi observada, embora não tenha havido um controle de pressão. Também foram relatados alguns acidentes, pois alguns frascos deformaram ou explodiram devido a condições de irradiação. Apesar disso, inúmeros trabalhos se seguiram após estes fatos iniciais, sendo apresentadas na literatura, diversas reações orgânicas conduzidas com sucesso em forno de micro-ondas doméstico sem modificação, e com segurança (GEDYE et al., 1986; GIGUERE et al., 1986).

Nos últimos anos vários artigos científicos foram relatados na literatura envolvendo a síntese de heterociclos com a utilização da irradiação de micro-ondas em síntese orgânica. A técnica tem sido aplicada a diversas reações orgânicas, entre elas podem ser citadas, oxidação, redução, esterificação, proteção e desproteção, cicloadição, condensação, alquilação, substituição nucleofílica e muitas outras (WINTERTON, 2001; GUO e XU, 2004).

As principais vantagens na utilização de energia por micro-ondas sobre o aquecimento convencional, em reações químicas são: as taxas de aquecimento em uma reação onde alguma substância (solvente ou reagente) presente, absorva bem as radiações de micro-ondas, são muito maiores do que no aquecimento convencional; o reator ou recipiente da reação pode ser transparente às microondas, a energia é absorvida somente pelos reagentes ou solventes; a energia é transferida diretamente para a amostra, não havendo contato físico com a fonte de aquecimento; a possibilidade de maiores rendimentos, maior seletividade e menor decomposição térmica (GABRIEL et al., 1998).

2.3 Aspectos morfofisiológicos de *Aspergillus* sp.

O gênero *Aspergillus* faz parte dos fungos filamentosos que constituem um grupo de microrganismos aeróbios fisiologicamente diversos, individualizado pela particular

modalidade de reprodução sexuada ou assexuada. De acordo com Ceballos e König (1997), os conídios representam o modo mais comum de reprodução assexuada; são produzidos pelas transformações do sistema vegetativo do próprio micélio. As células que dão origem aos conídios são denominadas células conidiogênicas. Vários padrões de conidiogênese são encontrados neste gênero. Ao exame macroscópico apresentam crescimento característico com aspecto aveludado ou cotonoso (algodão) ou como borra de café, presença de esporos, presença de micélio e ausência de clorofila ou qualquer outro pigmento fotossintético similar.

A diferenciação das espécies de *Aspergillus* é realizada a partir da avaliação macroscópica, as colônias deste gênero apresentam diferentes colorações do verso e reverso, texturas, topologia, superfície, cor do pigmento, cor da colônia, tempo de crescimento e diâmetro da colônia. (Conforme Figura 14) Adaptada do site: www.doctorfungus.org/imageban/index.htm. Acessado em Maio de 2009.

A espécie *Aspergillus niger* é uma das mais comuns do gênero *Aspergillus*. Cresce rapidamente em vários substratos artificiais produzindo colônias de base branca coberta por densa camada de cabeças globosas, com métulas e fálides ou somente fiálides. Têm conídios escuros unicelulares globosos, medindo de 4 a 5 μm de diâmetro (SANSON et al., 2004).

A espécie *Aspergillus flavus* é isolada primariamente de plantas e solo. Apresenta rápida taxa de crescimento e suas colônias têm coloração verde amarelada e textura variando de lanoso, algodinoso e granular. Tem conidióforos de cabeças esféricas radiadas que se tornam fendidas em colunas com a maturidade e apresentam métulas e fiálides. Seus conídios são globosos, medindo de 3 a 6 μm (SANSON et al., 2004).

A espécie *Aspergillus terreus* cresce rapidamente e produz grande quantidade de conídios, formam colônias filamentosas de diferentes características que microscopicamente apresentam hifas septadas de aproximadamente 4 μm de diâmetro, e estruturas de frutificação típica formada por célula-pé, conidióforo, vesícula, métula e/ou fiálide que promovem a reprodução assexuada através da produção de fialoconídios. ORZECHAWSCHI, 2008. Adaptado do site: www.funvest.com.br/novo/revista/45/n3/174-179. Acessado em Maio de 2009.

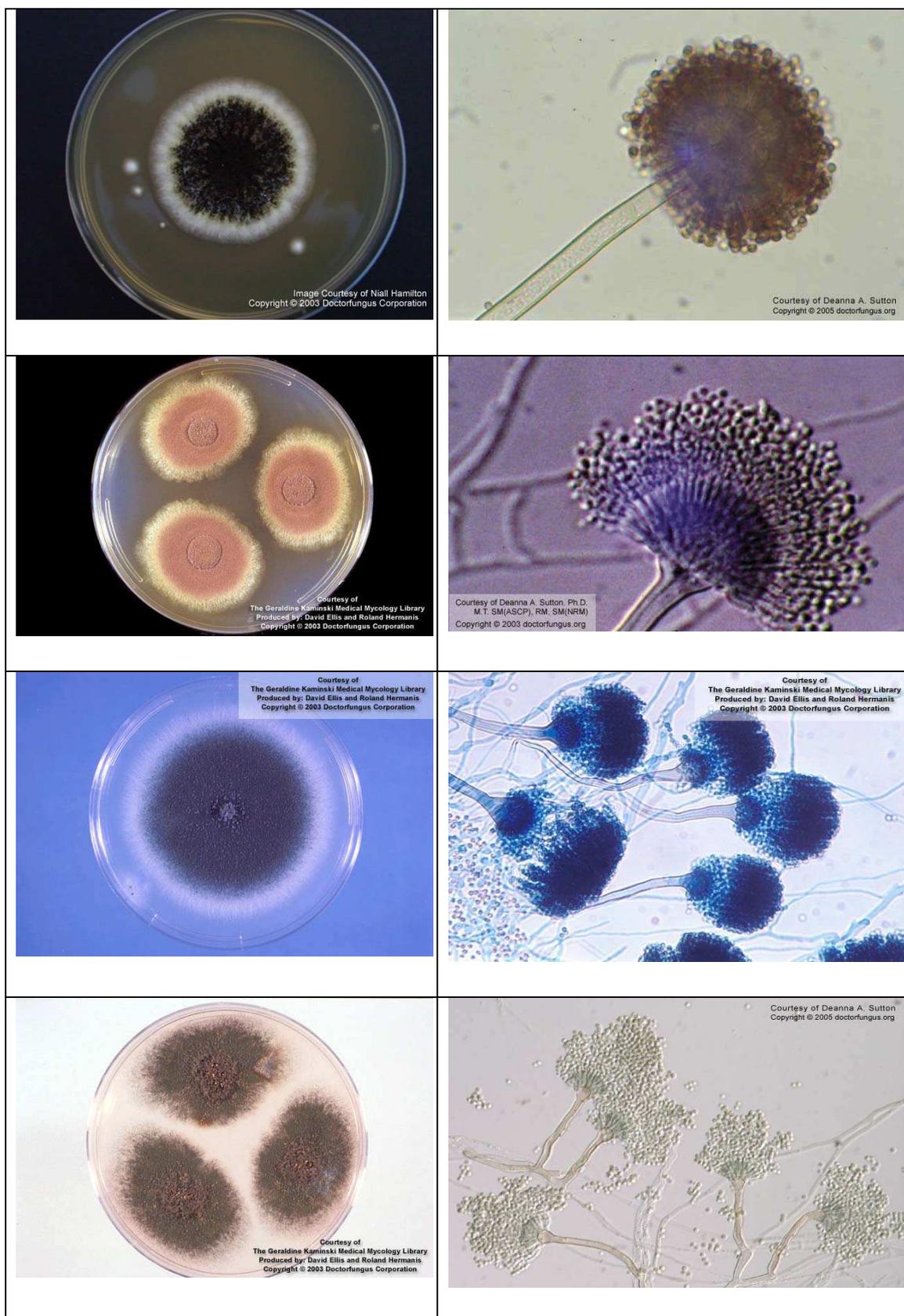


Figura 14 - Aspectos morfológicos macroscópicos (à esquerda) e microscópicos (conidióforos, à direita) de *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *A. fumigatus* e *A. nidulans*. Adaptado do site: www.doctorfungos.org/imageban/index.htm. Acessado em Maio de 2009.

2.3.1 Aplicações do gênero *Aspergillus* na área de tecnologia ambiental

A capacidade dos microrganismos de degradar compostos orgânicos é cientificamente reconhecida e vem sendo utilizada ao longo do tempo em processos de tratamento biológico de efluentes líquidos e de resíduos sólidos. Graças a essa habilidade têm sido desenvolvidos processos biotecnológicos destinados a diversas finalidades, dentro os quais se destacam a degradação de poluentes, a lixiviação de minerais, a desobstrução de poços de petróleo e a recuperação de locais contaminados, solo, águas superficiais e subterrâneas (OLIVEIRA, 2002).

Tais microrganismos como os fungos, na maioria das vezes, são os responsáveis pelo desaparecimento dos contaminantes, estudos comprovam que inseticidas organofosforados são amplamente utilizados em muitos países como a Índia, para melhores rendimentos na agricultura, entretanto estes inseticidas levam várias ameaças aos organismos, incluindo seres humanos e ainda a atividade microbiana do solo assim, é motivo de preocupação.

Fungos são microrganismos capazes de degradar vários compostos orgânicos recalcitrantes: fenóis clorados (pentaclorofenol, triclorofenol e diclorofenol), inseticidas (DDT, lindane, dieldrin), anilinas cloradas (3,4-dicloroanilinas), dioxinas (diclorodibenzeno-p-dioxina, tetraclorodibenzeno-p-dioxina), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (fluoreno, antraceno, pireno), corantes (cristal violeta, azul bromofenol, azocorantes) (CONEGLIAN, 2007).

Representantes do gênero *Aspergillus*, têm habilidade de mineralizar xenobióticos tais como organofosforados, e podem ser usados como um excelente biorremediadores de solos contaminados por este poluente (BHALERO, 2009; PURANIK, 2009).

A utilização de microrganismos como os fungos, tornou-se uma importante alternativa na área da biorremediação. Alguns microrganismos existentes nas áreas degradadas foram capazes de evoluir e se adaptar, interagindo com metais pesados. Essa interação vem sendo cada vez mais estudada, entendida e aprimorada (REN et al., 2009).

O *Aspergillus niger* é conhecido, principalmente, por sua capacidade de produzir enzimas e ácidos orgânicos por fermentação, especialmente, ácido cítrico. Muitos

pesquisadores apostaram na eficiência desta espécie na remoção de substâncias complexas e de poluentes como metais pesados (SÀ, 1997; SANTAELLA, 1997, 1999; GARCIA, 2000; GIFFONI, 2002, FACÒ, 2003; SAMPAIO, 2004; RODRIGUES, 2004; SANTOS 2006). O potencial destes representantes deste gênero para a biorremediação *in situ* tem sido atribuída a sua habilidade em degradar uma variedade de xenobióticos via um mecanismo de radical livre mediado pelas peroxidases extracelulares-LiP e MnP-e lacase, que são componentes chave para o sistema enzimático. Estas enzimas têm um potencial de oxidação-redução muito elevado e podem oxidar potencialmente xenobióticos que não são atacados por outras peroxidases. (Adaptado do site: www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc-eng-bioq/trabalho-grad/2006_1/têxtil/efluente.doc). Acessado em Maio de 2009.

Yakubu e Dudeney (1986) demonstraram que este fungo foi efetivamente capaz de remover íons urânio. Huang e Huang (1996) demonstraram que *Aspergillus* pode remover íons cádmio e cobre de soluções aquosas. Desta forma, o emprego adequado de microrganismos na remoção de metais pesados torna-se assim um desafio na área de biotecnologia ambiental.

Nos trabalhos de Volesky e Holan (1995) e de Kapoor e Viraraghavan (1995), nos quais foi feito um levantamento dos microrganismos com capacidade para remover metais pesados, percebe-se que entre outros fungos estudados que, *Aspergillus niger*, apresentou um bom potencial de remoção de metais como urânio, tório, chumbo, ouro, cobre e cádmio, entre outros.

Prince e colaboradores (2001), trabalhando com rejeitos líquidos da suinocultura, contendo elevados teores de cobre e zinco, observaram que os metais podiam ser acumulados em níveis fitotóxicos em solos utilizados para a agricultura sendo, novamente, *Aspergillus niger* apontado como o fungo, dentre vários estudados, que apresentou maior potencial para esse propósito. O fungo foi capaz de crescer em placas de Petri adicionadas de cobre, em um nível cinco vezes superior ao inibitório para o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*. Também foi evidenciada a capacidade de bioacumulação de zinco por *A. niger* para detoxificar o ambiente contaminado. Os resultados mostraram que *A. niger* foi capaz de remover 91% de cobre e 70% de zinco do efluente tratado.

Um dos principais problemas das indústrias têxtil é o efluente gerado, principalmente pela elevada DQO e coloração devida á presença de corantes, pigmentos e produtos químicos auxiliares, que fazem com que o efluente têxtil necessite de um tratamento específico (KANG et al.,1999). Num estudo recente uma metodologia simulou um ensaio para descolorir pigmentos coloridos de efluentes têxteis, e este estudo comprovou a eficiência demonstrada por *Aspergillus fumigatus* que descoloriu 84% deste corante no efluente (SHARMA et al., 2008).

2.3.2 Fungos como modelo microbiano de biotransformação de fármacos

O fígado é o principal sítio de metabolização de fármacos, embora outras enzimas metabolizadoras de xenobióticos são encontradas no tecido nervoso, rins, pulmão, plasma e trato-gaстрintestinal (secreções digestivas, flora bacteriana e parede intestinal) (WILLIANS et al., 2002). As reações envolvidas nestes processos são, por conveniência, classificadas em reações da Fase I e Fase II (AZERAD, 1999; WILLIANS et al., 2002; BARREIRO et al., 1996).

As enzimas de Fase I, em geral, são capazes de transformar inúmeros substratos e catalisar reações diferentes. Trata-se de proteínas catalíticas de natureza diversa, incluindo enzimas com atividade de monoxigenases como o citocromo P-450 ou a flavina monoxigenase, amino oxidases, aromatasas, epóxido, hidrolases ou estereases e, amidases hepáticas e plasmáticas. Destas o citocromo P-450 é a mais importante e amplamente estudado, conforme apresentado na Figura 15 (DONATO, 2004; WILLIANS et al., 2002).

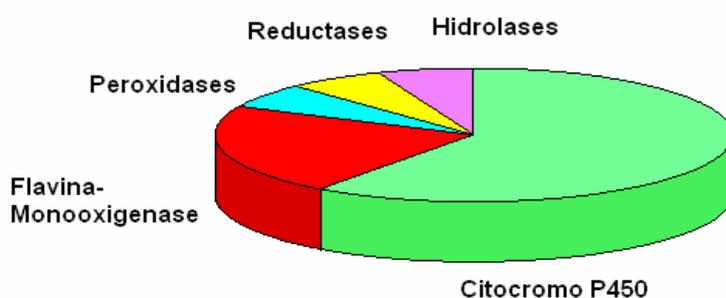


Figura 15 - Participação de diferentes enzimas de Fase I envolvidas no metabolismo de xenobióticos (adaptado de DONATO, 2004).

O estudo do metabolismo de fármacos tradicionalmente é realizado em modelos animais, perfusão em órgãos e cultura de células normais ou malignas. Modelos microbianos podem consistir em uma alternativa ou pelo menos um complemento aos estudos em sistemas animais, haja vista que podem imitar o metabolismo de mamíferos e fornecer algumas informações pertinentes sobre o destino metabólicos de um fármaco (ROSAZZA et al., 1979; SMITH e ROSAZZA, 1983; SARIASLANI, 1991, ABOURASHED et al., 1999; AZERAD, 1999).

A utilização de microrganismos como modelo para estudo do metabolismo de fármacos tem sido bem utilizado desde o conceito primeiramente introduzido por Smith e Rosazza em 1974. O conceito de modelo microbiano segundo estes autores está fundamentado no fato de que tanto os fungos como os mamíferos são organismos eucarióticos que apresentam sistemas enzimáticos similar para a maioria das funções fisiológicas e para o metabolismo de xenobióticos (ABOURASHED et al.,1999).

O CYP-450 de classe III participa da síntese de prostaglandinas em mamíferos. Além das funções biossintéticas, o CYP-450 de classe I e da classe II participa da metabolização de xenobióticos tanto de plantas como de animais. São responsáveis pelos processos de metabolização de fármacos e dos processos de detoxificação (WILLIANS et al., 2002; DONATO, 2004).

A presença de CYP-450 em fungos foi descrita desde 1964, em cepas de *Scharomyces cerevisiae*. Através de estudos em uma grande variedade de espécie, podem-se definir sete diferentes reações enzimáticas associadas com os citocromo P-450 dos fungos, incluindo a biossíntese do colesterol, fitosterol e ergosterol, a hidroxilação de cadeias longas de alcanos a hidroxilalação de ácidos graxos, a hidroxilação do ácido oléico e a hidroxilação da progesterona. Na biossíntese do colesterol, fitosterol ou ergosterol, uma etapa fundamental é a 14 α -demetilação do lamosterol em mamíferos, *S. cerevisiae*, *Candida glabrata* e *C. albicans*, catalisada pelo P-450 14DM (BOSSCHE e KOYMANS; 1998). O envolvimento destas enzimas em muitos destes estudos é concluído de maneira indireta como pelo uso de inibidores específicos do complexo enzimático citocromo P-450, devido à dificuldade de purificação destas enzimas (BRINK et al., 1998).

Outra classe bem estudada de bioconversões catalisadas pelo sistema enzimático citocromo P-450 são as hidroxilações estéreo-específicas de esteróides. Frações microsômicas capazes de hidroxilar esteróides *in vitro* têm sido preparadas a partir de vários fungos filamentosos incluindo *Aspergillus ochraceus* (11 α -hidroxilação da progesterona). Um envolvimento das enzimas do citocromo P-450 em hidroxilações sítio-específico da progesterona foi observado em vários fungos como *Cunninghamella elegans*, *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces lilacinus* e *Rhizopus nigricans*, de modo que o envolvimento deste sistema enzimático nas bioconversões pode ser claramente provado em pela proteína do sistema enzimático promotor da hidroxilação da progesterona por *P.blakesleanus* (BRINK et al.,1998).

Aspergillus niger é comumente utilizado como modelo de biotransformação hepática de xenobióticos. Estudos demonstram que os fungos, como sistemas de biotransformação, podem ser usados para sintetizar drogas no metabolismo dos mamíferos. O uso de modelo microbiano de drogas do metabolismo dos mamíferos tem vantagens de diminuir custos, facilitar tratamento de escala e elevar a capacidade de conduzir sínteses químicas (SMITH e ROSAZZA, 1983). Estes autores sugeriram que pudesse ser possível definir, assim a transformação microbiana de sistemas de muitas biotransformações observados em mamíferos. É importante perceber que um sistema de transformação microbiana seja visto como um grupo selecionado de microrganismo que poderiam ser usados a conduzir paralelamente mamíferos microbianos xenobióticos para estudo do metabolismo. Além das vantagens já citadas deste sistema de transformação microbiana, existe ainda o das moléculas polifuncionais que se formam ao redor do seu centro, numa seleção moderada nas condições com as quais a biotransformação pode ocorrer.

Aspergillus niger demonstra ser um fungo adequado como modelo de transformação e citotoxicidade. Segundo Veschambre e colaboradores, num estudo onde avalia a ecotoxicidade de alguns herbicidas (diuron, chorotoburon, endossulfan e isoproturon), e a sua influência dos fungos no metabolismo de biotransformação destes herbicidas. Os resultados deste estudo demonstram a importância de identificar os produtos poluentes de degradação para melhor avaliar o impacto do agente poluente. Obviamente que em alguns casos o poluente pode sofrer transformações, podendo tornar-se ainda mais tóxico, portanto mais poluente ainda. Estudos realizados por Goswami e colaboradores

(2009) comprovaram que uma espécie de *Aspergillus* de uma cultura em caldo de 18 dias de incubação, degradou 95% do endosulfan, portanto enzimas degradantes podem ser usadas para biorremediação de locais contaminados por endosulfan.

2.3.3 *Aspergillus* sp. como bioindicador em estudos ecotoxicológicos

Através de métodos de testes de toxicidade aguda, é possível em período de 30 minutos a 72 horas detectar a presença de agentes tóxicos em uma amostra. Assim, estes métodos, preenchem uma grande lacuna no campo dos indicadores para qualificação de águas naturais ou servidas. Por esta razão, os sistemas de testes biológicos devem ser aplicados no controle de emissões de poluentes e monitoramento ambiental, detectando através de efeitos tóxicos causados aos organismos a presença de substâncias perigosas que constituem riscos para corpos hídricos (NIEWEGLOWSKI et al., 1999).

Uns dos organismos mais utilizados e padronizados para execução de testes de toxicidade aguda em águas e efluentes industriais é o microcrustáceo *Daphnia magna* Straus, 1820 (cladocera, crustácea), a bactéria marinha *Vibrio fischeri* e fungos do gênero *Aspergillus* sp .

Testes microbianos podem ser usados como processos para avaliação do risco de um poluente pelo comportamento de um ecossistema, em geral, testes com organismos são freqüentemente executados com únicos testes de espécies, considerando que testes com microorganismos medem freqüentemente um processo executado por uma comunidade de espécies microbianas.

Num prévio trabalho segundo Tixier e colaboradores (2000), foi observado um estudo quantitativo de biodegradação demonstrou a toxicidade dos derivados herbicidas em estudo, mostrando que estes produtos de biodegradação possam apresentar uma toxicidade muito mais alta que a molécula pai. É assim de grande importância saber o destino de herbicidas depois de disseminado em terras e a toxicidade do metabolismo correspondente.

Segundo Beelen e colaboradores (1999), espécies de *Aspergillus niger* têm sido motivadas para estudos em testes de toxicidade onde se usa uma única espécie e um processo microbiano. Neste estudo vários testes de toxicidade são realizados no laboratório

e o campo para avaliação de risco de um poluente dentro de ecossistemas aquáticos e terrestres. A legislação neste caso aponta para proteger ambos, a estrutura e os efeitos danosos destes poluentes ambientais. Os resultados deste estudo podem ser o único teste para avaliação do risco de um poluente para a estrutura de um ecossistema.

Os ensaios de ecotoxicidade com fungos filamentosos não são diferentes de ensaios de atividade antifúngica e baseiam-se em medidas de citotoxicidade quanto à inibição do crescimento e quanto à indução de morte celular. A inibição do crescimento fúngico filamentoso pode ser avaliada inicialmente através do ensaio de sensibilidade por difusão em disco, por medida de crescimento micelial radial (CMR), por determinação de massa fúngica desidratada (peso seco) ou turbidez. Os ensaios de citotoxicidade fungicida são normalmente avaliados pela quantificação de tubos germinativos emitidos em caldo de cultura (Figura 16) ou por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) em meio sólido, ágar Sabouraud-destroxe, técnica *pour plate*, após contato prévio com solução de diferentes concentrações de xenobiótico.

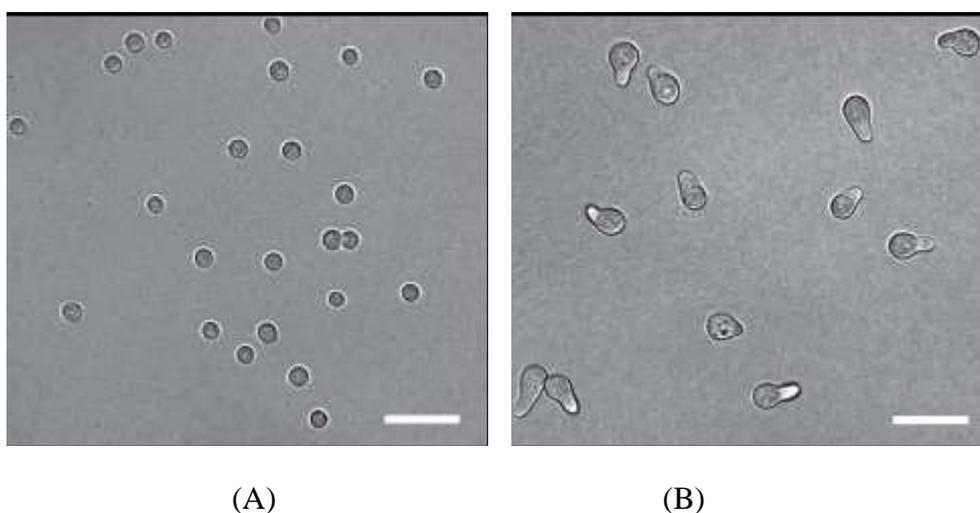


Figura 16 - Emissão de tubo germinativo de *Aspergillus nidulans*. A = 3h de incubação; B = 5 h de incubação; adaptado de Momany et al., 2007.

O ensaio de difusão em disco serve mais para detectar se há ou não toxicidade do xenobiótico em relação ao bioindicador fúngico selecionado. Mas não dá uma idéia da dependência da toxicidade com a concentração do agente.

Para a avaliação de atividade fungistática de xenobióticos por medida do diâmetro ou área de crescimento micelial radial (CMR) existem várias técnicas. A mais amplamente usada é a de auxanografia e baseia-se no recorte de discos de ágar contendo culturas do fungo bioindicador depositados sobre uma placa contendo um determinado meio de cultura com a solução de xenobiótico ou de substância a ser investigada (WOOLFOLK, 1971). Já o método proposto por Butty e colaboradores (1995) envolve a utilização das duas técnicas, onde a droga antifúngica (xenobiótico no caso de ensaio de ecotoxicidade) é diluída em meio sólido em placa de Petri, e recortes de mesma dimensão são retirados desta placa, posteriormente os espaços são preenchidos com inóculo proveniente de meio de cultura. Outra variação é substituir os discos de cultura por discos de papel impregnados com volume fixo de inóculo previamente padronizado de esporos viáveis.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia utilizada no desenvolvimento da parte experimental, na síntese do 1,2,4-oxadiazóis (**3a-c**) e avaliação citotóxica do composto **3aa**, pode ser melhor visualizada no fluxograma da Figura 17.

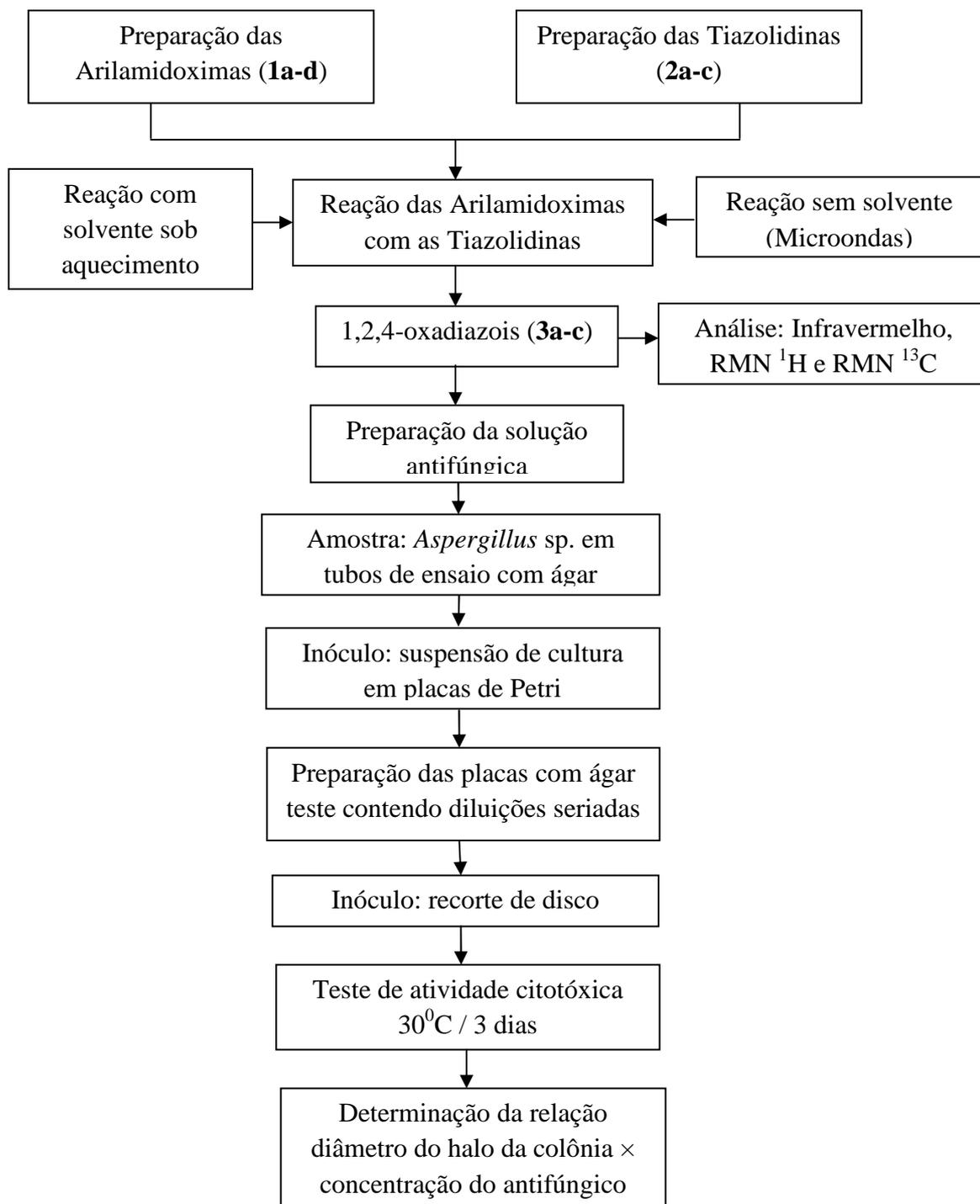


Figura 17 – Fluxograma da metodologia.

3.1 Equipamentos

Na realização da síntese e análise da atividade citotóxica do 1,2,4-oxadiazóis, foram utilizados os equipamentos relacionados a seguir.

- Agitador de tubos de ensaio Tecnal AP 56;
- Autoclave Quimis, modelo 190.24;
- Balança analítica Ohaus, modelo TP400D, série 3311;
- Balança Quimis, modelo SA210;
- Bomba de vácuo, marca Tecnal, modelo Te. 058, série 0176;
- Chapa de aquecimento com agitador magnético Velp Científica;
- Espectrômetro de infravermelho FT-IR Nicolet, modelo Magma 550, da UNISC;
- Espectrômetro de ressonância magnética, modelo DPX-200, marca Bruker; da UFSM;
- Estufa bacteriológica Biomatic série 00/10/01;
- Estufa de secagem De Leo, modelo 292, série 6;
- Evaporador rotatório Fisaton, modelo 802, série 26158;
- Forno de Microondas Panasonic, modelo NNS60BK, potência 650 w;
- Lâmpada de ultravioleta (254 nm), revelador;
- Máquina de gelo Everest, modelo EGE160;
- Paquímetro Mitutoyo, modelo Digimatic Caliper, série BB089370;
- Perfurador *punch biopsy*;
- Pipetador automático;

3.2 Solventes e Reagentes

Os solventes e reagentes empregados neste trabalho foram utilizados conforme adquiridos pela empresas Aldrich, Merck, Vetec, Nuclear, Synth e Oxoid, estando eles listados na Tabela 1.

Tabela 1- Solventes e reagentes empregados na síntese e avaliação da atividade citotóxica do 1,2,4-oxadiazóis.

Reagentes	Marca
Acetato de etila P.A.	Nuclear
Acetona	Vetec
Ácido clorídrico P.A.	Synth
Ácido <i>p</i> -toluenossulfônico	Merck
Ágar dextrose sabouraud	Oxoid
Benzonitrila	Merck
Bicarbonato de sódio	Nuclear
Carbonato de sódio anidro	Synth
Ciclo-hexanona	Merck
Cloreto de tionila	Merck
Cloridrato de hidroxilamina	Synth
Clorofórmio P.A.	Nuclear
Diclorometano P.A.	Nuclear
Dimetilsulfóxido P.A.	Nuclear
Dioxano P.A.	Vetec
Etanol 95% P.A.	Nuclear
Éter etílico	Nuclear
Formaldeído	Merck
Hidróxido de Sódio P.A.	Nuclear
Iodo	Nuclear
L-Cisteína	Nuclear
<i>L</i> -cisteína etil éster	Merck
N, N'-Diciclohexilcarbodiimida (DCC)	Merck
Gás Nitrogênio	White Martins, Brasil
n-Hexano P.A.	Nuclear
4-Clorobenzonitrila	Merck
4-Metoxibenzonitrila	Aldrich
4-Nitrobenzonitrila	Aldrich
4-Toluilnitrila	Merck
Silicagel 60A- 230-400 mesh	Vetec
Silicagel 60G- F254 para CCD	Vetec
Sulfato de magnésio anidro P.A.	Nuclear

3.4 Preparações das tiazolidinas

Foram realizados dois métodos de obtenção das tiazolidinas, conforme Figura 19.

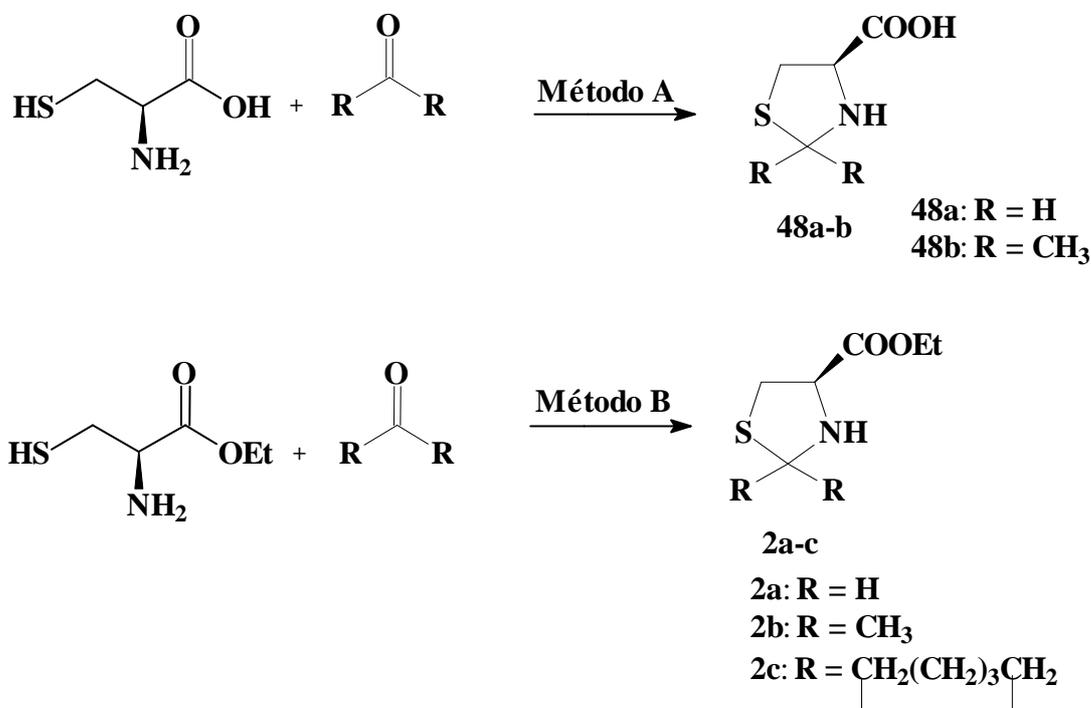


Figura 19 - Métodos utilizados na preparação das tiazolidinas.

3.4.1 Preparação de Ácido 4-Tiazolidina Carboxílico (48a)

Em um balão de 50 mL foram adicionados 30 mmol (5,268g) de cloridrato de *L*-cisteína, 15 mL de água e 82,8 mmol (2,486g) de formaldeído 38% (6,0 mL). O sistema ficou sob agitação por 20 horas a 25° C e em repouso por mais 4 horas. Em seguida foram adicionados 15 mL de etanol absoluto e 9 mL de piridina, sendo o sistema agitado manualmente. Foi observada a formação de cristais e o sistema permaneceu em repouso por mais 24 horas. Os cristais brancos formados foram filtrados e lavados com etanol absoluto, e posteriormente, com éter etílico.

3.4.2 Preparação de Ácido 2,2-Dimetil-4-Tiazolidina Carboxílico (48b)

Em um balão de 500 mL e fundo redondo, foram adicionados 10 mmol (1,76g) de cloridrato de *L*-cisteína, 3,54 mol de propan-2-ona (205,66g; 260 mL); 0,33 mmol (0,06g)

de ácido *p*-toluenossulfônico, e 10 mL de benzeno. Um condensador de refluxo foi acoplado sobre o balão mantido em refluxo, por 24 horas à temperatura ambiente.

Após as 24 horas de reação o produto permaneceu decantando por uma noite, sendo vertida lentamente a acetona residual, filtrando-se e lavando-se o sólido com acetona. O sólido foi recolhido em balão de 50 mL sendo adicionados 10 mL de acetona e o solvente evaporando sob vácuo a 85° C.

3.4.3 Ciclização da *L*-cisteína etil éster

3.4.3.1 Ciclização da *L*-cisteína etil éster com formaldeído ou com propan-2-ona

Em um balão de 50 mL e fundo redondo, foram adicionado 10 mmol (1,856g) de cloridrato de *L*-cisteína etil éster, 10mL de diclorometano e 30 mmol (4,2g) de carbonato de potássio. Após foi adicionado então 20 mmol de formaldeído (0,601g; 1,5 mL de solução a 38%) ou 67,7 mmol (3,932g; 5mL) de propan-2-ona. Após a adição dos reagentes, o balão foi conectado a um condensador de refluxo, com o objetivo de evitar perdas de diclorometano, permanecendo sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. Após o tempo de agitação a mistura reacional foi transferida com 30 mL de água para um funil de separação, e extraída com diclorometano (3 x 20mL). A fase orgânica foi coletada, seca com sulfato de magnésio anidro, filtrada e após a evaporação do solvente foi obtida a tiazolidina etil éster **2a** ou **2b**.

3.4.3.2 Ciclização do cloridrato de *L*-cisteína etil éster com ciclo-hexanona

Em um balão de 250 mL e fundo redondo, foram adicionado 15 mmol (2,784g) de cloridrato de *L*-cisteína etil éster e 150 mL de benzeno. Após foram adicionado 20 mmol (1,963g; 2,0 mL) de ciclo-hexanona e 0,33 mmol (0,066g) de ácido *p*-toluenossulfônico. O meio reacional foi refluxado sob agitação por 48 horas. O solvente foi evaporado sob vácuo, e após o resíduo restante no balão atingir a temperatura ambiente, foi adicionado a este 100 mL de solução aquosa de carbonato de potássio a 20 %. O conteúdo do balão foi transferido para a um funil de separação, e extraído com diclorometano (3 x 30 mL). A

fase orgânica foi coletada, seca com sulfato de magnésio anidro, filtrada e após a evaporação do solvente foi obtida a tiazolidina etil éster **2c**.

3.5 Síntese do 1,2,4-oxadiazóis

Os 1,2,4-oxadiazóis foram preparados partindo-se das arilamidoximas **1a-d** e com as tiazolidinas **2a-c** e **4a-b**, sob condições diferenciadas.

3.5.1 Preparação do 1,2,4-oxadiazóis derivados das tiazolidinas **2a-c**

Os 1,2,4-oxadiazóis **3a-c** foram preparados pela reação das arilamidoximas **1a-e** com as tiazolidinas **2a-c**, em presença de K_2CO_3 e tolueno sob refluxo (**Método A**) e em presença de K_2CO_3 em microondas doméstico (**Método B**), conforme Figura 20.

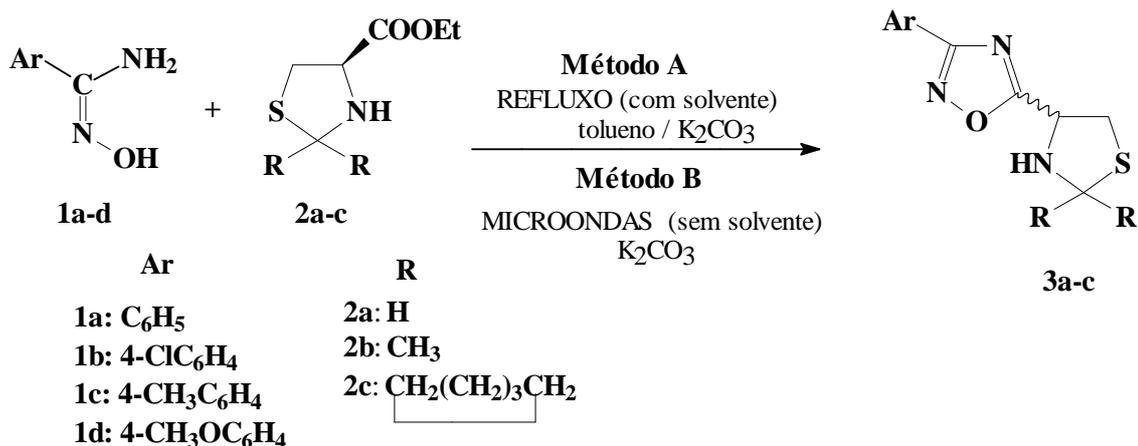


Figura 20 - Metodologias utilizadas na obtenção do 1,2,4-oxadiazóis **3a-c**.

3.5.1.1 Reações utilizando solvente sob refluxo (**Método A**)

Em um balão de duas bocas de 50 mL e fundo redondo foram adicionado 1,35 mmol da tiazolidina etil éster (0,217 g tiazolidina **2a**), (0,255 g de tiazolidina **2b**) ou (0,309 g de tiazolidina **2c**) e 8 mL de tolueno. Após a solubilização da tiazolidina no tolueno, foi adicionados 2,5 mmol da respectiva arilamidoxima (0,34 g de benzamidoxima **1a**), (0,425 g de 4-clorobenzamidoxima **1b**), (0,375 g de 4-toluilamidoxima **1c**) ou (0,415g de 4-metoxibenzamidoxima **1d**). Em seguida foram adicionados 2,5 mmol (0,35 g) de carbonato de potássio e o sistema foi aquecido sob refluxo e agitação por 24 horas. Após dilui-se com

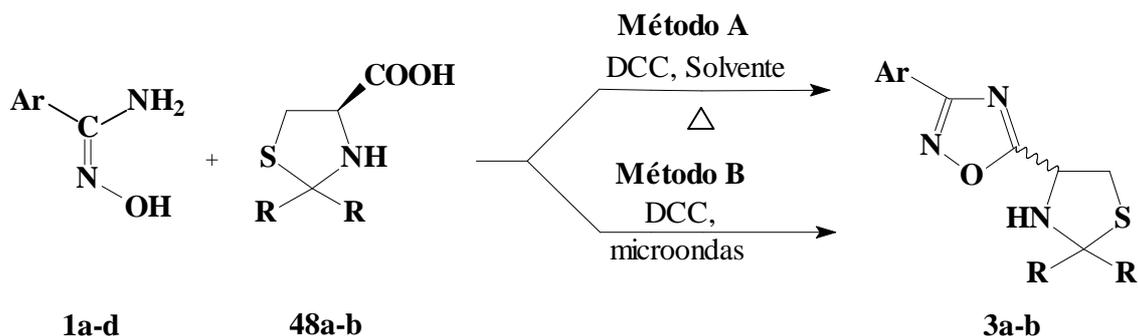
50 mL de acetato de etila e transferiu para um funil de separação, e extraiu-se com água (2 x 20 mL). Após a fase aquosa foi descartada e a fase orgânica coletada, seca com sulfato de magnésio seco, filtrada e o solvente evaporado. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna utilizando sílica gel, na qual se utilizou, inicialmente, n-hexano como eluente e na seqüência, eluiu-se com soluções de n-hexano/acetato de etila na concentração (7:3). As frações coletadas da coluna foram analisadas através de cromatografia em camada delgada. Uniram-se, então, as frações de mesmo R_f, removendo-se, posteriormente, os solventes em um evaporador rotatório.

3.5.1.2 Reações sem solvente utilizando microondas domésticas (Método B)

Em tubo de ensaio com tampa de rosca foram adicionados 0,5 mmol de tiazolidina etil éster (0,0805 g para **2a**; 0,0945 g para **2b** e 0,1145 g para **2c**) e 1 mmol da arilamidoxima (0,136 g de benzamidoxima **1a**; 0,170g de 4-clorobenzamidoxima **1b**; 0,150g de 4-toluilamidoxima **1c** e 0,166 g de 4-metoxibenzamidoxima **1d**). Após foi adicionado 1mmol (0,14g) de carbonato de potássio e os reagentes foram homogeneizados com uma espátula. O tubo de ensaio com a tampa semi-rosqueada foi submetido a irradiação de micro-ondas por tempo variável de 5-10 minutos à potência média-alta (650 W). A mistura foi então dissolvida em diclorometano, filtrado e purificado por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), utilizando sílica gel 60G F254 e revelação por luz ultravioleta 254nm; como eluente foi utilizado hexano: acetato de etila (7:3), sendo então obtidos os 1,2,4-oxadiazóis.

3.5.2 Preparação do 1,2,4-oxadiazóis derivados das tiazolidinas **48a** e **48b**

Os 1,2,4-oxadiazóis **3a-b** foram preparados pela reação das arilamidoximas **1a-e** com as tiazolidinas **4a-b**, em presença de DCC e DMF sob aquecimento (Método A) e em presença de DCC no microondas doméstico (Método B), conforme Figura 21.



Ar: a) C₆H₅; b) 4-ClC₆H₄; c) 4-CH₃C₆H₄; d) 4-CH₃OC₆H₄

R: a) H; b) CH₃

Figura 21 - Preparação do 1,2,4-oxadiazóis **3a-b**.

3.5.2.1 Reações utilizando solvente sob refluxo (Método A)

Para obtenção do 1,2,4-oxadiazóis **3ba** foram adicionados em um balão de fundo redondo de 100 mL sob atmosfera inerte, 3 mmol (0,510 g) da arilamidoxima **1b** (4-clorobenzamidoxima) e 3 mmol (0,399 g) da tiazolidina **48a**. Após foram adicionado 30 mL de DMF (N', N-dimetilformamida) e 3mmol (0,6175 g) de DCC (dicio-hexil-carbodiimida).

O meio reacional permaneceu sob agitação sob refluxo à temperatura de 110° C por 7 horas. O acompanhamento das reações foi realizado através de cromatografia em camada delgada, observando-se o desaparecimento dos compostos de partida da reação e a formação de produtos.

Após, o solvente foi removido em um evaporador rotatório e os produtos foram purificados por cromatografia em coluna utilizando sílica gel, na qual se utilizou, inicialmente, n-hexano como eluente e na seqüência, eluiu-se com soluções de n-hexano/acetato de etila na concentração (7:3).

As frações coletadas da coluna foram analisadas através de cromatografia em camada delgada. Uniram-se, então, as frações de mesmo R_f, removendo-se, posteriormente, os solventes em um evaporador rotatório.

3.5.2.2 Reações sem solvente utilizando microondas domésticas (Método B)

Em um tubo de ensaio com tampa de rosca foram adicionado 1mmol da arilamidoxima **1a-e** (0,136 g de benzamidoxima **1a**; 0,170 g de 4-clorobenzamidoxima **1b**; 0,150 g de 4-toluilamidoxima **1c**; 0,166 g de 4-metoxibenzamidoxima **1d**) e 1 mmol da tiazolidina (0,133 g de ácido 4-tiazolidinacarboxílico **48a**; 0,161 g de ácido 2,2-dimetil-4-tiazolidinacarboxílico **48b**). Após a homogeneização da arilamidoxima com a tiazolidina foi adicionado 1,2 mmol (0,247g) de DCC (diciclohexil-carbodiimida) e misturou-se novamente os reagentes.

O tubo de ensaio contendo os reagentes foi submetido a irradiação de micro-ondas com a tampa semi-fechada por tempos que variaram entre 1 e 9 minutos sob potência médio-alta. A mistura meio reacional foi então dissolvida em diclorometano, filtrado o produto e purificado por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), utilizando sílica gel 60G F254 e revelação por luz ultravioleta 254 nm. Como eluente foi utilizado hexano: acetato de etila (7:3), sendo então obtidos os 1,2,4-oxadiazóis.

3.6 Análises espectroscópicas

3.6.1 Análises espectroscópicas na região do infravermelho (IV)

Nas análises de absorção na região do infravermelho, seguiu-se o procedimento padrão para todas as amostras, num ambiente aclimatado a 20°C e com a umidade relativa do ar inferior a 60%, utilizando-se Espectrômetro Nicollet, Magna 550, de janela espectral de 4000 a 600 cm^{-1} (Departamento de Química e Física – UNISC). Os espectros de absorção no infravermelho foram registrados na forma de filme líquido e pastilha de KBr, com filme de poliestireno de 0,05 mm de espessura na absorção de 1601 cm^{-1} .

Para as amostras sólidas secas, realizaram-se as análises através do Método de Reflectância Difusa (DRIFTS), no qual a amostra é macerada com KBr e colocada num acessório do equipamento, juntamente com o branco, que consiste em KBr puro. Procedeu-se à análise do branco e, seqüencialmente, à da amostra. O resultado provém dos espectros da amostra, excluindo-se o branco.

As amostras líquidas e sólidas não completamente secas (pastosas) foram analisadas através do Método de Reflectância Total Atenuada Horizontal (ATR), no qual a amostra é colocada sobre um prisma e analisada utilizando-se como branco a varredura na

superfície limpa do prisma. O resultado provém dos espectros da amostra, excluindo-se o branco.

3.6.2 Análises Espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear

Nas análises por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono 13 (RMN ^{13}C) os espectros foram obtidos através de um Espectrômetro Bruker DPX, Departamento de Química da UFSM, o qual opera respectivamente nas frequências de 200 e 400 MHz para ^1H e nas frequências de 50 e 100 MHz para ^{13}C . Os deslocamentos químicos (δ) estão relacionados em parte por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS) utilizando como padrão interno para os espectros de RMN ^1H , CDCl_3 (7,26 ppm) como solvente; colocando-se entre parênteses a multiplicidade (s = singleto, d = dubleto, dd = duplo dubleto, dq= duplo quarteto, t = tripleto, m = multipletto), o número de hidrogênios deduzidos da integral relativa.

3.7 Ensaios de citotoxicidade

3.7.1 Amostragem

As cepas de *Aspergillus sp.* utilizadas neste trabalho foram obtidos das micoteca da Universidade de São Paulo (USP) e da Coleção de Microrganismos de Microbiologia Industrial da UNISC (CMMI) foram assim constituídas: *Aspergillus niger* USP898; *Aspergillus niger* CMMI111; *Aspergillus sp.* CMMI15; *Aspergillus flavus* CMMI1;; *Aspergillus niger* USP4; *Aspergillus niger* CMMILA1; *Aspergillus fumigatus* USP174; *Aspergillus terreus* CMMI233-3; *Aspergillus fumigatus* CMMI13. As referidas cepas foram mantidas em tubos de ensaio com ágar Sabouraud-dextrose e cultivados à temperatura de 25 a 30 $^{\circ}\text{C}$ com reinoculações quinzenais.

3.7.2 Ensaio de difusão em disco

O ensaio foi efetuado aplicando-se discos de papel filtro comercialmente disponíveis, impregnados com quantidade solução $1,6 \cdot 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ de 3-aryl-5-tiazolidinil-

1,2,4-oxadiazol em dimetilsulfóxido sobre a superfície de placas de 9 cm de diâmetro com 10 mL de ágar Sabouraud-dextrose previamente inoculada com “swab” impregnado de esporos de cada uma das cepas (culturas de 5 dias a 30 °C em ágar Sabouraud-dextrose). Depois de 18 a 24 horas de incubação, determinou o tamanho da zona clara de inibição ao redor do disco.

3.7.3 Ensaio de crescimento micelial radial

Cada cultura estoque de *Aspergillus* de 15 dias de cultivo foi inoculada em tubo de ensaio contendo 5 mL de meio Sabouraud-dextrose estéril inclinado e incubada a 30 °C até a esporulação (cerca de 48 h). Os esporos foram coletados com “swab” e semeados sobre placas de Petri de 7 cm de diâmetro contendo 10 mL de ágar Sabouraud-dextrose e as placas incubadas até a cobertura da superfície da placa com micélio vegetativo com o mínimo de esporulação (24 h). Discos de cultura de 5 mm de cada cepa foram recortados com auxílio de *punch biopsy* nº 4 e transferidos invertidos segundo gabarito trigonal para a superfície de placas de Petri contendo 9,9 mL de ágar Sabouraud-dextrose e 0,1 mL de solução de 3-aryl-5-tiazolidinil-1,2,4-oxadiazol em dimetilsulfóxido nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,16 mol L⁻¹ tendo como controle meio somente acrescido de dimetilsulfóxido. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C por cerca de 5 dias e submetidas à determinação do crescimento micelial radial.

As médias geométricas dos diâmetros perpendiculares dos halos das colônias foram determinadas, e por fim as respectivas áreas. O crescimento micelial radial foi determinado, descontando a área de cada colônia da área inicial do disco de cultura e correlacionando com a respectiva concentração da solução de xenobiótico.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção e análises dos materiais de partida

Na preparação das arilamidoximas, obteve-se a benzamidoxima **1a** (70%) na forma de cristais esbranquiçados, a 4-clorobenzamidoxima **1b** (85%) na forma de cristais levemente amarelados, a 4-toluilamidoxima **1c** (87%) na forma de cristais brancos, a 4-metoxibenzamidoxima **1d** (91%) como um cristal branco-acizentado. Os espectros de IV das arilamidoximas podem ser observados nos ANEXOS A-D.

Os materiais de partida sintetizados foram analisados por IV e RMN ^1H , obtendo-se os seguintes dados espectrais de IV para as arilamidoximas $\nu(\text{cm}^{-1})$:

1a: 3455 e 3357 (NH_2), 3194 (O-H), 3058 ($-\text{C}-\text{H}_{\text{arom.}}$), 1645 (C=N);

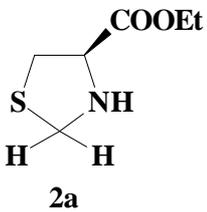
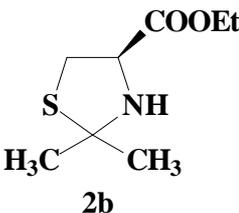
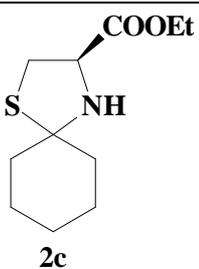
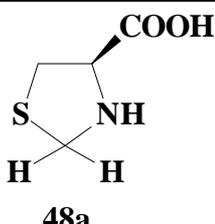
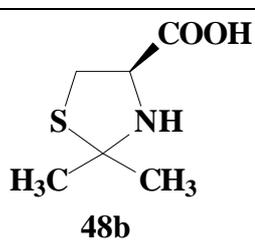
1b: 3467 e 3345 (NH_2), 3155 (O-H), 3053 ($-\text{C}-\text{H}_{\text{arom.}}$), 1660 (C=N);

1c: 3505 e 3374 (NH_2), 3061 (O-H), 3061 ($-\text{C}-\text{H}_{\text{arom.}}$), 2924 ($-\text{C}-\text{H}_{\text{alif.}}$), 1667 (C=N);

1d: 3437 e 3350 (NH_2), 3242 (O-H), 3036 ($-\text{C}-\text{H}_{\text{arom.}}$), 2966 ($-\text{C}-\text{H}_{\text{alif.}}$), 1650 (C=N), 1245 (C-O-C).

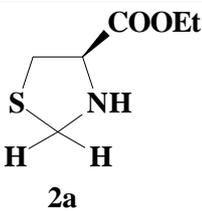
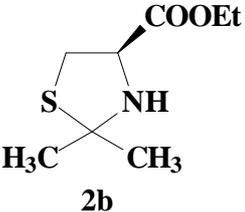
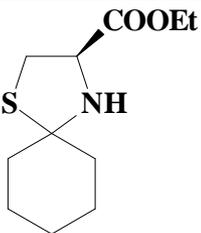
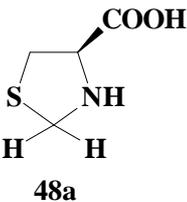
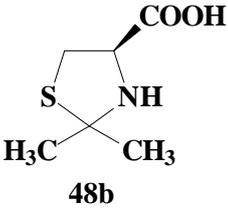
As tiazolidinas apresentaram os seguintes aspectos físicos e rendimentos conforme podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 - Aspectos físicos e rendimentos obtidos na síntese das tiazolidinas.

Tiazolina	Aspecto Físico	Rendimento (%)
 <p>2a</p>	Óleo amarelo claro	81
 <p>2b</p>	Óleo amarelo claro	80
 <p>2c</p>	Óleo amarelo escuro	68
 <p>48a</p>	Sólido branco	72
 <p>48b</p>	Sólido branco	64

Para as tiazolidinas, foram obtidos os dados espectrais de IV e RMN ^1H representados na Tabela 3 e os espectros podem ser observados nos ANEXOS E-G.

Tabela 3 - Dados espectrais das tiazolidinas etil éster (**2a-c**) e ácidos 4-tiazolidinas carboxílicos (**48a** e **48b**) sintetizadas.

Produto	IV ν (cm ⁻¹)	RMN ¹ H (CDCl ₃) δ (ppm)
 <p>2a</p>	3309 (N-H); 1727 (C=O); 1179 (C-O-C); 807 (N-H).	4,38 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H); 4,22 (dq, $J = 7,2$ e 1,8 Hz, 2H); 4,15 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H); 3,84 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H); 3,25 (dd, $J = 10,4$ e 7,2 Hz, 1H); 2,87 (dd, $J = 10,2$ e 7,6 Hz, 1H); 2,41 (s, 1H); 1,31 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H)
 <p>2b</p>	3309 (N-H); 1732 (C=O); 1184 (C-O-C); 798 (N-H).	4,25 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H); 4,08 (dd, $J = 9,0$ e 7,0 Hz, 1H); 3,44 (dd, $J = 10,4$ e 6,8 Hz, 1H); 3,03 (t, $J = 9,8$ Hz, 1H); 2,44 (s, 1H); 1,71 (s, 3H); 1,53 (s, 3H); 1,31 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H)
 <p>2c</p>	3300 (N-H); 1732 (C=O); 1184 e 1160 (C-O-C); 793 (N-H)	4,27 (dq, $J = 7,2$ e 2,4 Hz, 2H); 4,04 (dd, $J = 9,4$ e 6,8 Hz, 1H); 3,30 (dd, $J = 10,2$ e 6,8 Hz, 1H); 2,87 (dd, $J = 10,4$ e 9,6 Hz, 1H); 2,51 (s, 1H); 1,9-1,4 (m, 10H); 1,32 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H)
 <p>48a</p>	2965 (NH); 3100-2500 (COOH); 1583 (C=O);	4,83 (s, 2H, COOH, NH); 4,49 (d, $J = 10,4$ Hz 1H); 4,41 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H); 4,35 (d, $J = 10,2$ Hz, 1H); 3,44 (dd, $J = 12,0$ e 7,4 Hz, 1H); 3,31 (dd, $J = 11,9$ e 6,2 Hz 1H)
 <p>48b</p>	2963 (NH); 3100-2500 (COOH); 1578 (C=O);	8,78 (s, 1H); 4,87 (t, $J = 8,6$ Hz, 1H); 4,17 (s, 1H); 3,6-3,3 (m, 2H); 2,06 (s, 3H); 1,72 (s, 3H)

4.2 Obtenção e análise do 1,2,4-oxadiazóis (3a-c)

Os melhores resultados obtidos na síntese do 1,2,4-oxadiazóis, foram através das reações das tiazolidinas etil éster (**2a**, **2b** e **2c**) com as arilamidoximas (**1a-d**), com solvente ou sob micro-ondas, quando comparados com os ácidos 4-tiazolidinas carboxílicos (**48a** e **48b**).

Os 1,2,4-oxadiazóis, preparados através da metodologia **3.5.2.1**, com ácidos 4-tiazolidinas carboxílicos **48a** e **48b** (reações utilizando solvente sob refluxo - Método A), foram obtidos em baixo rendimento (5-10%.)

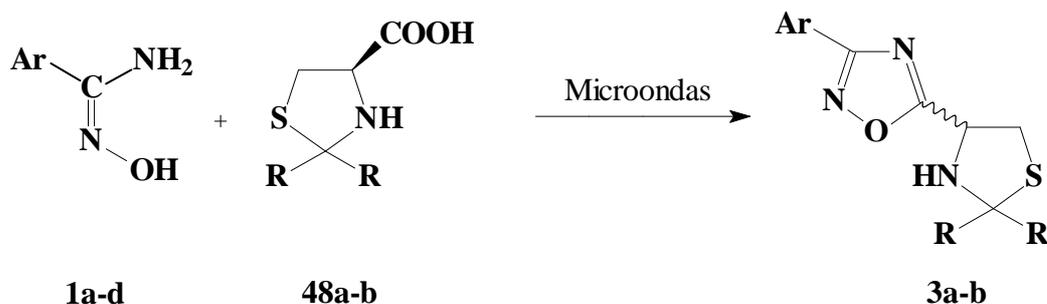
Na síntese do 1,2,4-oxadiazóis por irradiação de micro-ondas, metodologia **3.5.2.2** (Método B), com ácidos 4-tiazolidinas carboxílicos **48a** e **48b**, foram testadas várias condições reacionais, com a variação do tempo de reação, conforme Figura 22:

1°) Arilamidoximas (**1a-d**) + Tiazolidinas (**48a-b**) + DCC (Relatado na metodologia).

2°) Arilamidoximas (**1a-d**) + Tiazolidinas (**48a-b**) + DCC + Alumina Neutra

3°) Arilamidoximas (**1a-d**) + Tiazolidinas (**48a-b**) + Alumina Neutra

4°) Arilamidoximas (**1a-d**) + Tiazolidinas (**48a-b**)



Ar: a) C₆H₅; b) 4-ClC₆H₄; c) 4-CH₃C₆H₄; d) 4-CH₃OC₆H₄

R: a) H; b) CH₃

Figura 22 – Preparação do 1,2,4-oxadiazóis através da irradiação por micro-ondas.

Os melhores resultados foram obtidos na primeira condição reacional, sendo esta condição empregada na síntese do 1,2,4-oxadiazóis (**3a-b**) por irradiação de micro-ondas. Os rendimentos foram os seguintes: **3cb** (10%); **3aa** (6%); **3ba** (4%); **3ca** (9%); **3da** (4%).

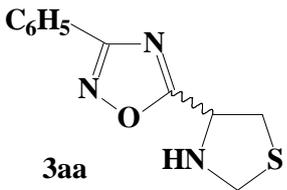
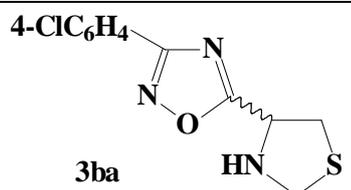
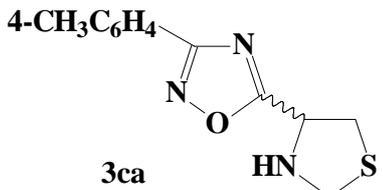
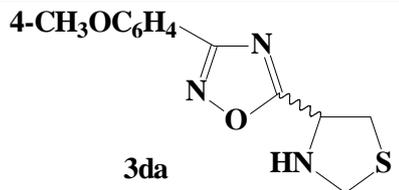
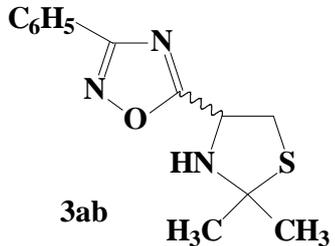
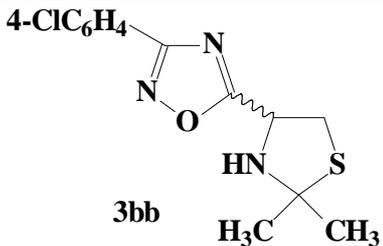
Os rendimentos do 1,2,4-oxadiazóis obtidos por micro-ondas, variaram de 4 e 10 %. Houve a formação preferencial sob estas condições, de subprodutos de reação entre o DCC e a tiazolidina, entre 15 e 35%. Este fato deve indicar que a exposição ao calor imediato favorece a formação de subprodutos derivados do DCC/tiazolidinas. Os subprodutos formados nas reações utilizando os diferentes solventes, sob refluxo, apresentaram maior percentual de formação (DMF entre 30-35%; Dioxano entre 50-58%; THF entre 5-15%), quando comparados com reações realizadas em microondas. Estes subprodutos foram identificados por RMN ¹H.

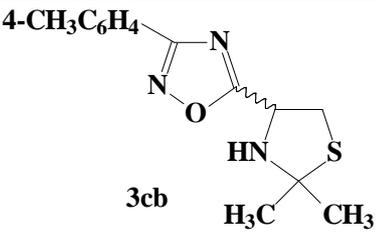
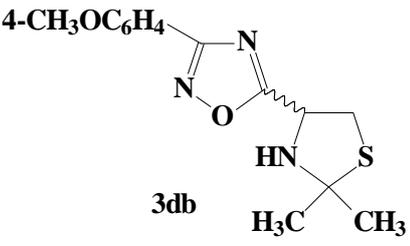
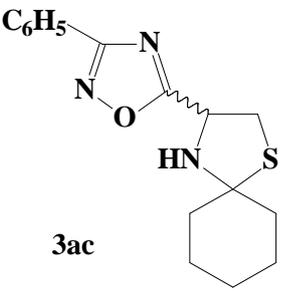
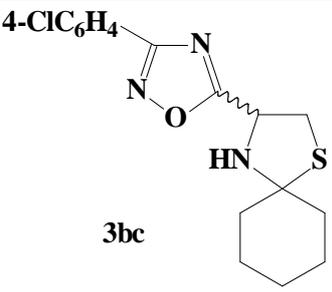
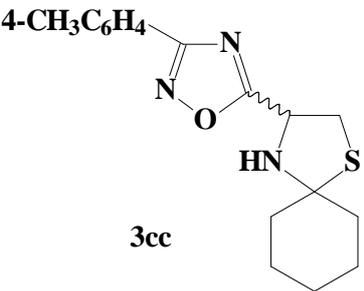
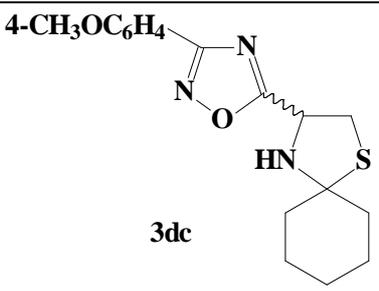
A obtenção de subprodutos de reação entre o DCC e arilamidoximas não foram observadas em níveis significativos sob as condições testadas.

As reações realizadas sob refluxo em DMF apresentaram rendimentos entre 1 e 3% para os 1,2,4 oxadiazóis.

Os 1,2,4-oxadiazóis, obtidos através da metodologia **3.5.1**, através das reações das tiazolidinas etil éster (**2a**, **2b** e **2c**) com as arilamidoximas (**1a-d**), apresentaram os seguintes aspectos e rendimentos, apresentados na Tabela 4, gerando a série **3aa** a **3dc**.

Tabela 4 – Aspectos físicos e rendimentos obtidos na síntese dos 1,2,4-oxadiazóis (3a-c), derivados dos compostos 1a-d e 2a-c.

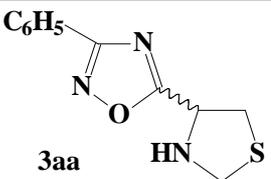
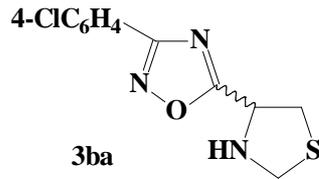
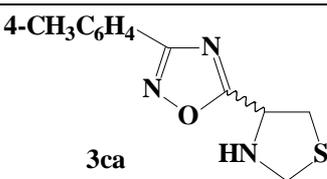
Produto (1,2,4-oxadiazol)	Aspecto Físico	Reação com solvente (Rendimento em %)	Reação sob microondas (Rendimento em %)
 <p>3aa</p>	sólido amarelo Pf = 83°C	60	35
 <p>3ba</p>	sólido amarelo Pf = 85°C	54	34
 <p>3ca</p>	sólido amarelo Pf = 87°C	59	30
 <p>3da</p>	sólido amarelo Pf = 83°C	58	40
 <p>3ab</p>	óleo amarelo	53	42
 <p>3bb</p>	óleo amarelo	53	45

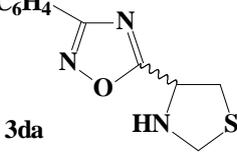
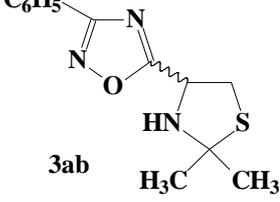
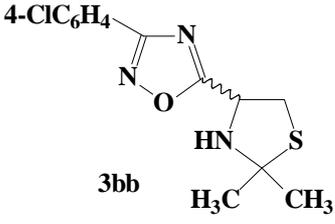
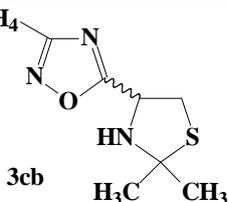
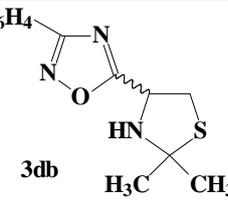
 <p>3cb</p>	óleo amarelo	52	32
 <p>3db</p>	sólido amarelo Pf = 84°C	58	27
 <p>3ac</p>	óleo amarelo	48	36
 <p>3bc</p>	óleo amarelo	51	50
 <p>3cc</p>	óleo amarelo	59	43
 <p>3dc</p>	óleo amarelo	68	47

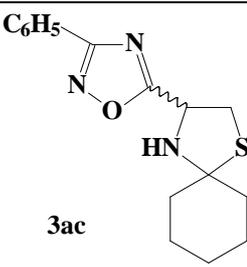
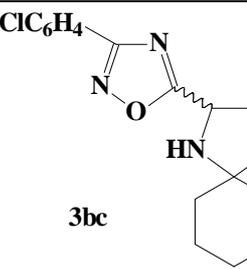
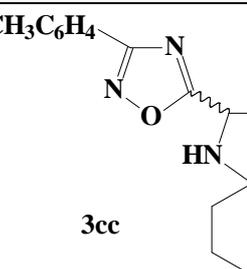
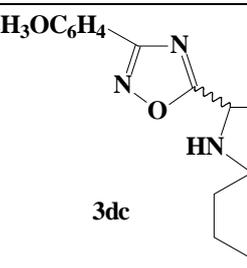
As arilamidoximas contendo grupos doadores de elétrons como metila e metoxila e grupos retiradores de elétrons como o cloro, foram preparadas e estudadas na formação dos oxadiazóis. Os substituintes presentes no anel aromático da amidoxima não influenciaram de maneira significativa na formação do 1,2,4-oxadiazóis, exceto para os derivados da tiazolidina **2c**. Os melhores rendimentos na síntese do 1,2,4-oxadiazóis foram os obtidos partindo-se das tiazolidinas etil éster (**2a**, **2b** e **2c**) com as arilamidoximas (**1a-d**), com solvente (tolueno) sob refluxo, na presença de carbonato de potássio.

Os 1,2,4-oxadiazóis sintetizados foram analisados e identificados por IV, RMN ^1H e ^{13}C , e a verificação de Rf através de cromatografia em camada delgada (hexano: acetato de etila, 7:3), sendo que estes dados estão representados na Tabela 5.

Tabela 5 - Dados de identificação do 1,2,4-oxadiazóis sintetizados (**3a-c**).

Produto	IV $\nu(\text{cm}^{-1})$	RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm)	RMN ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm)
 3aa Rf 0,41	3278 (N-H); 3068 (C-H _{arom.}); 2960, 2935 (C-H _{alif.}); 1568(C=N); 1446 (C=C)	8,08 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H); 7,5-7,3 (m, 3H); 4,72 (t, $J = 6,6$ Hz, 1H); 4,45 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H); 4,39 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H); 3,43 (dd, $J = 10,6$ e 6,8 Hz, 1H); 3,23 (dd, $J = 10,6$ e 6,8 Hz, 1H); 2,69 (s, 1H)	177,94; 168,40; 131,30; 128,82; 127,49; 126,42; 68,92; 61,79; 37,78
 3ba Rf 0,40	3237 (N-H); 3078 (C-H _{arom.}); 2935, 2853 (C-H _{alif.}); 1598 (C=N); 1414 (C=C)	8,03 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H); 7,46 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H); 4,73 (t, $J =$ 6,4 Hz, 1H); 4,44 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H); 4,33 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H); 3,44 (dd, $J = 10,7$ e 6,8 Hz, 1H); 3,23 (dd, $J = 10,6$ e 6,6 Hz, 1H); 2,66 (s, 1H)	178,14; 167,56; 137,47; 129,12; 128,72; 124, 81; 72,92; 61,72; 33,86
 3ca Rf 0,42	3263 (N-H); 3042 (C-H _{arom.}); 2945, 2879 (C-H _{alif.}); 1568 (C=N); 1419 (C=C)	7,97 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 7,28 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H); 4,69 (t, $J = 6,4$ Hz, 1H); 4,44 (d, $J = 9,8$ Hz, 1H); 4,31 (d, $J = 9,4$ Hz, 1H); 3,43 (dd, $J = 10,6$ e 6,8 Hz, 1H); 3,21 (dd, $J = 10,6$ e 6,8 Hz, 1H); 2,67 (s, 1H); 2,41 (s, 3H)	177,74; 168,38; 141,63; 129,52; 127,40; 123,59; 72,85; 61,81; 33,89; 21,55

<p>3da</p>  <p>Rf 0,30</p>	<p>3273 (N-H); 3060 (C-H_{arom.}); 2934, 2833 (C-H_{alif.}); 1609 (C=N); 1486 (C=C); 1253 (C-O-C)</p>	<p>8,02 (d, <i>J</i> = 9,2 Hz, 2H); 6,98 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 4,68 (t, <i>J</i> = 6,4 Hz, 1H); 4,44 (d, <i>J</i> = 9,6 Hz, 1H); 4,31 (d, <i>J</i> = 9,2 Hz, 1H); 3,87 (s, 3H); 3,43 (dd, <i>J</i> = 10,6 e 6,8 Hz, 1H); 3,21 (dd, <i>J</i> = 10,4 e 6,8 Hz, 1H); 2,64 (s, 1H);</p>	<p>177,85; 168,72; 162,82; 133,95; 119,63; 114,72; 73,50; 55,51; 30,29; 29,72</p>
<p>3ab</p>  <p>Rf 0,62</p>	<p>3293 (N-H); 3071 (C-H_{arom.}); 2975, 2924 (C- H_{alif.}); 1601(C=N); 1450 (C=C)</p>	<p>8,09 (d, <i>J</i> = 7,8 Hz, 2H); 7,6-7,4 (m, 3H); 4,81 (dd, <i>J</i> = 9,0 e 6,4 Hz, 1H); 3,64 (dd, <i>J</i> = 10,7 e 6,6 Hz, 1H); 3,29 (dd, <i>J</i> = 10,2 e 9,6 Hz, 1H); 2,51 (s, 1H); 1,77 (s, 3H); 1,65 (s, 3H)</p>	<p>177,87; 168,38; 131,45; 128,89; 127,51; 126,23; 71,78; 65,94; 39,95; 29,67</p>
<p>3bb</p>  <p>Rf 0,67</p>	<p>3240 (N-H); 3060 (C-H_{arom.}); 2944, 2906 (C-H_{alif.}); 1590(C=N); 1411 (C-H_{alif.})</p>	<p>8,04 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H); 7,47 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H); 4,81 (dd, <i>J</i> = 8,7 e 6,6 Hz, 1H); 3,64 (dd, <i>J</i> = 10,7 e 6,6 Hz, 1H); 3,28 (dd, <i>J</i> = 10,6 e 9,6 Hz, 1H); 2,66 (s, 1H); 1,77 (s, 3H); 1,65 (s, 3H)</p>	<p>178,35; 166,57; 130,89; 129,23; 128,71; 125,30; 71,19; 63,42; 29,67; 22,67</p>
<p>3cb</p>  <p>Rf 0,67</p>	<p>3263 (N-H); 3082 (C-H_{arom.}); 2944, 2898 (C-H_{alif.}); 1562 (C=N); 1417 (C=C)</p>	<p>7,98 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz 2H); 7,29 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz 2H); 4,80 (dd, <i>J</i> = 8,9 e 6,8 Hz, 1H); 3,63 (dd, <i>J</i> = 10,6 e 6,6 Hz, 1H); 3,28 (dd, <i>J</i> = 10,3 e 9,4 Hz, 1H); 2,64 (s, 1H); 2,42 (s, 3H); 1,77 (s, 3H); 1,65 (s, 3H)</p>	<p>177,58; 168,27; 141,75; 129,54; 127,39; 123,39; 75,64; 58,98; 41,10; 32,37; 30,85; 21,53</p>
<p>3db</p>  <p>Rf 0,54</p>	<p>3293 (N-H); 3060 (C-H_{arom.}); 2975, 2942 (C-H_{alif.}); 1611 (C=N); 1480 (C=C); 1252 (C-O-C);</p>	<p>8,03 (d, <i>J</i> = 9,2 Hz, 2H); 6,99 (d, <i>J</i> = 9,2 Hz, 2H); 4,79 (dd, <i>J</i> = 8,8 e 6,8 Hz, 1H); 3,87 (s, 3H); 3,63 (dd, <i>J</i> = 10,6 e 6,8 Hz, 1H); 3,28 (dd, <i>J</i> = 10,4 e 9,2 Hz, 1H); 2,74 (s, 1H); 1,77 (s, 3H); 1,65 (s, 3H)</p>	<p>177,32; 168,25; 162,67; 129,14; 118,30; 114,26; 75,33; 59,78; 55,77; 43,45; 33,72; 32,30</p>

 <p>3ac</p> <p>Rf 0,75</p>	3288 (N-H); 3048 (C-H _{arom.}); 2929, 2878 (C-H _{alif.}); 1601(C=N); 1450 (C=C);.	8,09 (d, <i>J</i> = 7,6 Hz, 2H); 7,6-7,4 (m, 3H); 4,78 (dd, <i>J</i> = 9,2 e 6,4 Hz, 1H); 3,49 (dd, <i>J</i> = 10,4 e 6,4 Hz, 1H); 3,15 (dd, <i>J</i> = 10,4 e 9,2 Hz, 1H); 2,62 (s, 1H); 2,0-1,2 (m, 10H)	177,98; 168,27; 131,32; 128,80; 127,46; 126,29; 81,57; 58,14; 40,69; 40,25; 39,05; 25,39; 25,15; 23,76
 <p>3bc</p> <p>Rf 0,74</p>	3282 (N-H); 3048 (C-H _{arom.}); 2929, 2880 (C-H _{alif.}); 1591(C=N); 1404 (C=C);.	8,03 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H); 7,46 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 4,78 (dd, <i>J</i> = 8,8 e 6,8 Hz, 1H); 3,49 (dd, <i>J</i> = 10,6 e 6,4 Hz, 1H); 3,14 (dd, <i>J</i> = 10,4 e 9,6 Hz, 1H); 2,61 (s, 1H); 2,0-1,2 (m, 10H)	178,19; 167,41; 137,46; 129,11; 128,72; 124,73; 81,53; 58,06; 40,69; 40,20; 38,97; 25,35; 25,11; 23,73
 <p>3cc</p> <p>Rf 0,75</p>	3288 (N-H); 3046 (C-H _{arom.}); 2929, 2878 (C-H _{alif.}); 1596(C=N); 1410 (C=C);.	7,97 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2H); 7,28 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2H); 4,77 (dd, <i>J</i> = 9,2 e 6,8 Hz, 1H); 3,48 (dd, <i>J</i> = 10,4 e 6,8 Hz, 1H); 3,14 (dd, <i>J</i> = 10,4 e 9,6 Hz, 1H); 2,62 (s, 1H); 2,41 (s, 3H); 2,0-1,2 (m, 10H)	177,71; 168,17; 141,61; 129,45; 127,31; 123,38; 81,50; 58,07; 40,61; 40,15; 38,95; 25,33; 25,09; 23,69; 21,44
 <p>3dc</p> <p>Rf 0,63</p>	3285 (N-H); 3058 (C-H _{arom.}); 2963, 2928 (C-H _{alif.}); 1612 (C=N); 1477 (C=C); 1243 (C-O-C);	8,02 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 6,98 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H); 4,76 (dd, <i>J</i> = 8,6 e 6,8 Hz, 1H); 3,87 (s, 3H); 3,48 (dd, <i>J</i> = 10,6 e 6,4 Hz 1H); 3,14 (dd, <i>J</i> = 10,4 e 9,2 Hz, 1H); 2,58 (s, 1H); 2,0-1,2 (m, 10H)	177,60; 167,93; 161,98; 129,07; 118,98; 114,18; 81,56; 58,12; 55,28; 40,68; 40,21; 39,03; 25,38; 25,14; 23,72

A título de exemplificação, pode-se observar no espectro de IV, Figura 23, para o composto **3aa**, a banda de deformação axial em 3.278 cm^{-1} , evidenciando a presença de ligação química N-H. Em 3.068 cm^{-1} , constata-se a banda de absorção da ligação $=\text{C-H}$, comprovando a presença do anel aromático. A formação do anel oxadiazólico, é evidenciada pela presença da banda de deformação da ligação C=N em 1.568 cm^{-1} . As vibrações de deformação axial atribuídas à ligação C-S ocorrem entre 700 e 600 cm^{-1} . A intensidade é baixa e a banda varia muito de posição, o que faz com que esta banda tenha pouco valor na determinação de estruturas.

No espectro de RMN ^1H , Figura 23, para o composto **3aa**, observa-se em $8,08\text{ ppm}$, um dubleto referente a 2 hidrogênios aromáticos e em $7,60\text{-}7,40\text{ ppm}$ um multipletto referente a 3 hidrogênios aromáticos. Na região compreendida em $4,72\text{ ppm}$, encontra-se um tripleto referente ao hidrogênio ligado ao átomo de carbono (CH). Em $4,44$ e $4,33\text{ ppm}$ observa-se 2 dubletos referentes a 2 hidrogênios do anel tiazolidínico (vizinhos ao N e S). Na região compreendida entre $3,46\text{-}3,41\text{ ppm}$ e $3,25\text{-}3,20\text{ ppm}$, observa-se 2 duplo dubletos referentes a 2 hidrogênios (vizinhos ao centro quiral). Em $2,68\text{ ppm}$ observa-se um singleto referente ao hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio (HN).

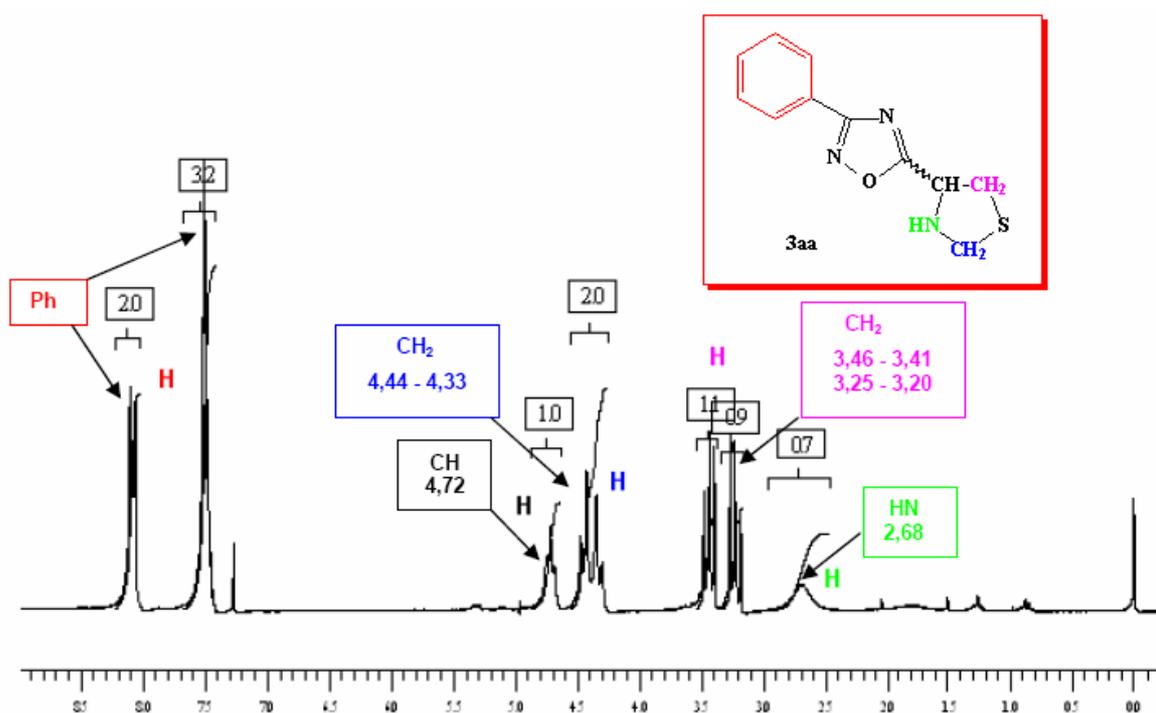
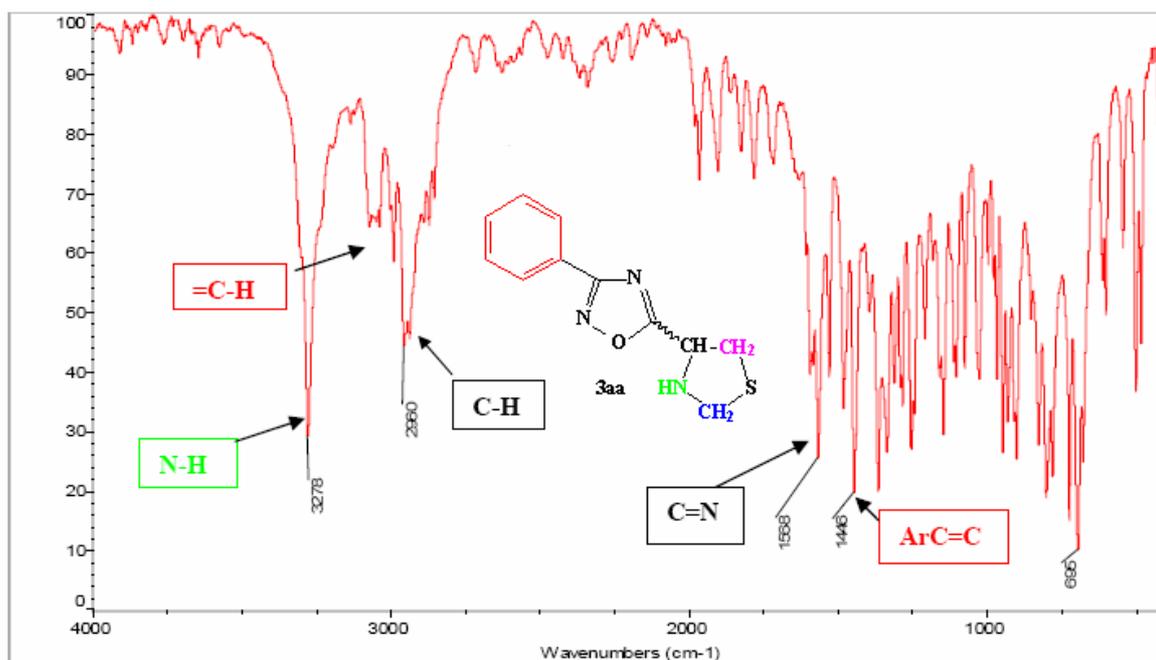


Figura 23 – Espectro de IV e RMN ^1H do composto **3aa**.

É importante ressaltar que os espectros de IV dos demais 1,2,4-oxadiazóis sintetizados, apresentaram sinais semelhantes ao espectro comentado, diferenciando apenas na frequência dos sinais, devido às características particulares de cada composto. Para os espectros de RMN ^1H , os sinais são bastante semelhantes, visto que as diferenças de

multiplicidade e/ou deslocamento químico, são efeitos provocados pela vizinhança de cada núcleo de hidrogênio. Os espectros de IV e RMN ^1H do 1,2,4-oxadiazóis (**3a-c**), podem ser observados nos ANEXOS H-S.

O uso da irradiação por micro-ondas em ausência de solvente é de grande importância, por ser um procedimento coerente com a filosofia da Química Verde no desenvolvimento de tecnologias que reduzem ou eliminem o uso ou a geração de substâncias nocivas ao meio ambiente.

Na Tabela 6 podem ser observados os impactos ambientais, através da identificação qualitativa, na síntese do 1,2,4-oxadiazóis em presença de solvente e por irradiação de micro-ondas.

Tabela 6 – Identificação qualitativa de impactos ambientais na síntese do 1,2,4-oxadiazóis com e sem solvente.

Itens de Avaliação	Método A (Reação com solvente)	Método B (Reação sem solvente – micro-ondas)
Número de etapas (reação)	Maior	Menor
Tempo reacional	Maior (24 horas)	Menor (5-10 minutos)
Uso de solventes	Sim	Não
Geração de resíduos	Sim	Sim
Geração de efluentes	Sim	Não
Consumo de energia	Médio	Pequeno
Consumo de água	Sim	Não
Rendimento da síntese	Maior	Menor

Através da análise dos dados apresentados na Tabela 6, observa-se que os dois métodos de síntese do 1,2,4-oxadiazóis apresentam ações impactantes diferenciadas. Na reação de síntese utilizando solvente observa-se que o impacto é maior quando relacionado com a que utiliza irradiação de micro-ondas, conforme a descrição a seguir:

- O número de etapas envolvidas na síntese é maior, pois existe a necessidade de evaporação do solvente para posterior purificação do produto, o que não ocorre na reação sem solvente;
- O tempo reacional é superior, além disso, envolve o consumo de água, o uso de solventes, a geração de efluentes e um maior consumo de energia comparado ao método sem solvente (micro-ondas).

O único fator positivo referente à reação utilizando solvente é que o rendimento é superior ao método sem solvente. No entanto, é possível a melhoria significativa nos rendimentos do método via micro-ondas, com aplicação de um equipamento específico para as reações de síntese.

4.3 Avaliação de citotoxicidade em *Aspergillus* sp.

4.3.1 Ensaio de difusão em disco

Através do ensaio de difusão em disco pode-se observar, na Figura. 24 como exemplo de uma das amostras investigadas, a presença de halo de inibição em torno dos discos. Todas as amostras apresentaram comportamento semelhante para a concentração de 1,2,4-oxadiazol analisada.



Figura 24 - Gabarito de triplicata de discos de cultura de *Aspergillus sp.* utilizada como modelo para demonstrar como foram gerados os diâmetros de crescimento micelial radial.

Esse método não é o método padrão indicado para quantificar a atividade citotóxica *in vitro* de isolados ambientais, segundo o Clinical Laboratory Standards Institute of the USA (CLSI), entretanto ele é um método muito utilizado em estudos iniciais de novos compostos com potencial fungistático ou de citotoxicidade de xenobióticos em função da sua praticidade (DEVILLERS et al., 1989). O resultado deste ensaio indicou a necessidade de estabelecer um ensaio que correlacionasse o efeito citotóxico com a concentração do 1,2,4-oxadiazol **3aa** em estudo sendo então realizado o ensaio do crescimento micelial radial.

4.3.2 Ensaio de crescimento micelial radial

Este método serve para avaliar o potencial inibitório de diferentes compostos frente a uma cepa fúngica bioindicadora. No caso, foram selecionadas amostras de *Aspergillus sp.*, um fungo de crescimento rápido, muito resistente a compostos tóxicos, ubíquo no meio ambiente.

Foi possível visualizar, após 24h de cultivo, o crescimento de todas as amostras de *Aspergillus* em todas as concentrações trabalhadas. Em nenhum dos discos inoculados foi observada ausência de crescimento, indicando que todos se encontravam viáveis e suscetíveis ao efeito do derivado 1,2,4-oxadiazol testado.

Também não se observaram alterações morfológicas macroscópicas no crescimento do fungo, sendo que o mesmo halo, em todos os discos, com aspecto homogêneo branco aveludado de centro amarelado, sem alterações de cor do meio de cultura. Estes dados sugerem que a presença do 1,2,4-oxadiazol, nas regiões de concentrações trabalhadas, não tenha interferido no metabolismo secundário do fungo.

Os padrões dose-resposta das curvas apresentadas foram classificados segundo o critério proposto a seguir, por Corbellini (2004) (Figura 25):

- a) Monofásico: curvas com inibição crescente do crescimento com aumento da concentração do composto em estudo.
- b) Bifásico: um aumento da atividade fungistática (I) até um ponto máximo de inibição (P1), após a atividade fungistática decresce, e estabiliza (II).
- c) Trifásico: um aumento da atividade fungistática (I) até o ponto de máxima inibição do crescimento (P1) seguido por perda momentânea da atividade fungistática (II) até o ponto de mínima atividade (P2), após ocorre a recuperação da atividade (III) com aumento da concentração do composto em estudo.

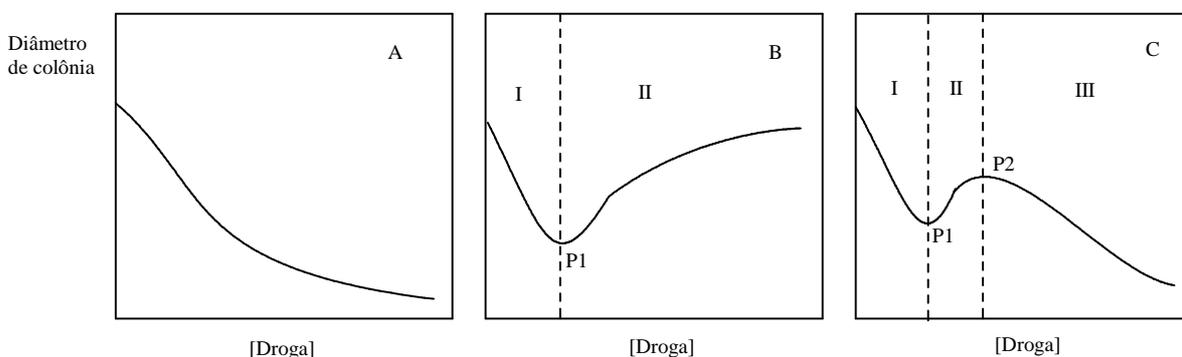


Figura 25 - Padrões de curvas de atividade fungistática dose-dependentes. A: monofásica; B: bifásica; C: trifásica. Adaptada de Corbellini, 2004.

Observando-se a Figura 26 pode-se ver que todas as concentrações apresentaram uma diminuição do crescimento micelial radial em relação ao controle. Cinco amostras, *Aspergillus niger* USP4 e USP898, *Aspergillus terreus* CMMI233-3, *Aspergillus sp.* CMMI15 e CMMILA1 apresentaram padrão trifásico enquanto que as demais apresentaram padrão monofásico.

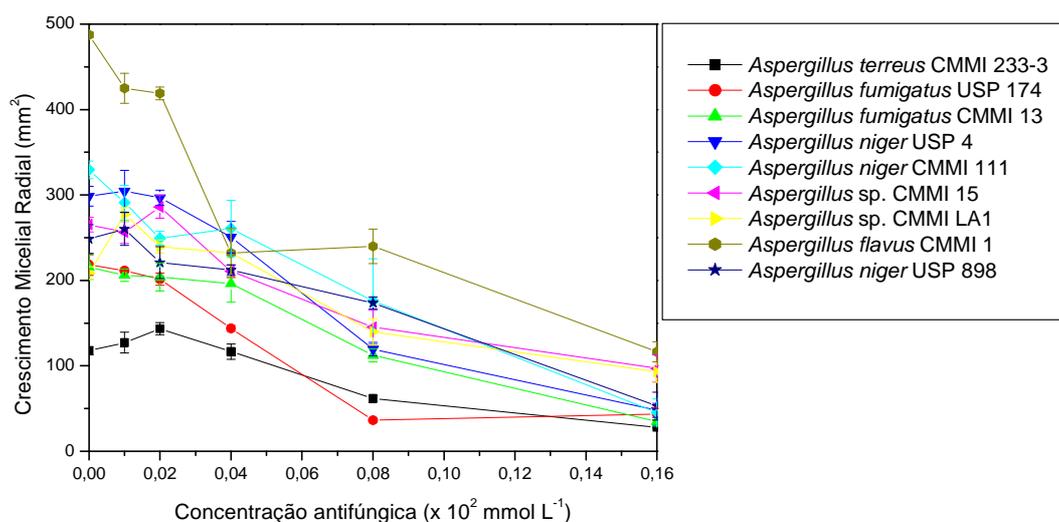


Figura 26 - Curvas de crescimento micelial radial de *Aspergillus*, sob diferentes concentrações de 1,2,4-oxadiazol.

Sendo assim, não houve um comportamento homogêneo e característico para cada fungo investigado, indicando diferentes mecanismos de ação inibitória dentro de uma mesma classe.

Segundo Griffin (1994) em situações onde ocorre uma adaptação do crescimento microbiano por indução de enzimas relacionadas com a assimilação ou a biodegradação de substrato que podem fornecer carbono e nitrogênio como nutrientes para material plástico intracelular, ocorrem curvas bifásicas ou trifásicas.

Segundo Corbellini (2004), compostos contendo grupos aromáticos podem ser metabolizados por diferentes rotas gerando compostos de mais fácil assimilação ou eventualmente tóxicos. A presença de curvas primárias e secundárias pode ser explicada por uma competição entre os mecanismos de estimulação e inibição do crescimento.

O resultado do teste foi consistente, em termos toxicológicos (maior concentração do agente químico, maior efeito), para as amostras de *Aspergillus* sp. em estudo que mostra uma grande variação em sua sensibilidade considerando o conceito de citotoxicidade apresentado por Nardone (1977). Segundo este autor, o conjunto de alterações da homeostase celular que leva a uma série de modificações que interferem na capacidade adaptativa das células, bem como sua sobrevivência, multiplicação e realização de suas funções metabólicas. A intensidade da lesão celular depende de vários fatores, tais como concentração do composto em estudo, o tempo de exposição, entre outras (HU e HSING, 1989).

Os testes para avaliação da citotoxicidade de 3-*aril-5-tiazolidinil-1,2,4-oxadiazol* contra *Aspergillus* sp. apresentaram sucesso, ou seja apresentou inibição para todos os fungos testados. O ensaio de atividade fungistática utilizado baseou-se na inibição do crescimento micelial radial, esta metodologia tem servido para avaliação de potencial inibitório de diferentes compostos, porém com algumas limitações, principalmente no caso de não ocorrer crescimento homogêneo na superfície do ágar que dará origem aos discos de cultura. Esta metodologia tem sido utilizada em experimentos de avaliação de diversos xenobióticos no crescimento micelial de fungos.

A literatura cita ainda diversos outros ensaios ecotoxicológicos em microrganismos tais como: contagem de unidade formadora de colônias (UFC/mL), métodos bioquímicos, entre outros (JOERGENSEN et al., 2005; DAWSON et al., 2005; VAUFLEURY et al., 2007; OLIVEIRA 2006).

Há ainda outro modo de se analisar a potência de um agente antifúngico. A maneira aqui discutida avalia o comportamento de *Aspergillus* sp. a uma determinada concentração da droga em estudo. Porém, de maior interesse para a produção de antifúngicos, para a qual é preciso saber a concentração mínima da droga a ser utilizada (para ser menos tóxico possível ao meio ambiente e principalmente para baratear custos), faz-se necessário relacionar a concentração de diferentes drogas referente a um mesmo efeito.

Assim, a título de exemplificação, utilizam-se normalmente os padrões MIC₈₀ e MIC₅₀, respectivamente relacionados a antifúngicos testados em humanos e microrganismos, referentes a 80 e 50% da inibição em relação ao crescimento do fungo na

ausência da droga. No caso em estudo todas as amostras alcançaram MIC₅₀ na faixa das concentrações avaliadas mostrando o potencial fungistático desta classe de derivados 1,2,4-oxadiazol.

Frente ao que foi discutido, pode-se afirmar que o teste de atividade antifúngica proposto por Butty (1995) e utilizado neste trabalho é rápido, confiável e de fácil reprodutibilidade, possibilitando determinação da menor concentração de antifúngico necessária para inibir o crescimento do fungo.

Apesar de serem amplamente difundidas na literatura as propriedades antifúngicas de 1,2,4-oxadiazol, estas não podem ser generalizadas para qualquer tipo de microrganismo, mostrando a importância de analisar diferentes amostras.

Os resultados discutidos e avaliados neste trabalho levantam questões quanto ao prosseguimento deste estudo. Em trabalhos futuros, poderia se ampliar a região de concentrações da solução antifúngica para se constatar a real atividade antifúngica deste 1,2,4-oxadiazol contra *Aspergillus* sp. E, possivelmente, ampliando-se a diversidade de radicais ligados ao anel 1,2,4-oxadiazol, outra linha de pesquisa também ganha incentivo, referente a estudo de QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*), onde se visa relacionar parâmetros estéricos, eletrônicos, com a maior ou menor atividade antifúngica de determinado composto.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando-se os objetivos propostos para o desenvolvimento da parte experimental e analisando os resultados obtidos, pode-se dizer que eles foram obtidos satisfatoriamente. É possível fazer algumas generalizações frente às reações estudadas.

Considerando as condições em que foram realizados os experimentos, pode-se concluir que os materiais de partida (arilamidoximas e tiazolidinas) sintetizados foram obtidos com bons rendimentos (64-91%).

Com referência à identificação dos materiais de partida e produtos sintetizados, as análises utilizando a espectroscopia no infravermelho IV e de ressonância magnética nuclear de hidrogênio RMN ^1H e carbono-13 RMN ^{13}C , auxiliaram na caracterização dos mesmos.

Foram propostas duas metodologias de síntese de 1,2,4-oxadiazóis **3a-c**, derivados de arilamidoximas e tiazolidinas em uma estratégia sintética flexível, permitindo o acesso a vários compostos inéditos.

Os melhores resultados da síntese foram obtidos partindo-se da tiazolidina esterificada **2ac**, apresentado no capítulo 3 Material e Métodos no item **3.5.1.1**, com a utilização de tolueno como solvente e sob refluxo. Também foram realizadas reações de obtenção do 1,2,4-oxadiazóis sob refluxo substituindo o tolueno por dioxano ou benzeno; estas substituições de solvente demonstraram a formação dos produtos, porém em menor rendimento.

A obtenção do 1,2,4-oxadiazóis, derivados da tiazolidina etil éster **2ac** e apresentado no capítulo 3 Materiais e Métodos no item **3.5.1.2**, foram obtidos com baixos rendimentos através da utilização de micro-ondas, demonstrando a necessidade de otimização da metodologia.

É importante destacar que tanto as metodologias que utilizam DMF como solvente item **3.5.2.1** e a sem solvente/micro-ondas item **3.5.2.2**, derivadas da tiazolidina **48a e 48b**, não apresentaram bons rendimentos na síntese do 1,2,4-oxadiazóis. Verificou-se que a reação com solvente ocorreu à formação de maior quantidade de subprodutos, quando comparada com a metodologia que utiliza o micro-ondas (sem solvente).

A reação de síntese, realizada por irradiação de micro-ondas, é uma forma quimicamente mais limpa e promissora em conduzir reações orgânicas, pois proporcionou: uma redução no tempo de reação, meio reacional livre de solventes, uma eficiência energética nas reações propostas, a não geração de efluentes e controle na formação de subprodutos.

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que o 1,2,4-oxadiazol **3aa** apresenta um grau de citotoxicidade predominantemente dose-dependente e que a estrutura apresentada pode apresentar potencial para futuras investigações como um novo antifúngico. Por outro lado, do ponto de vista de ecotoxicologia, o composto investigado comporta-se como um xenobiótico com necessidade de outros ensaios ecotoxicológicos para avaliar seu impacto sobre o meio ambiente.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOURASHED; E. A.; CLARK, A. M.; HUFFORD, C. D. *Microbial models of mammals of xenobióticos: An updated review*. Current Medicinal Chemistry, 1999, 6, 359-374.
- AFIATPOUR, P. et al. *Analgesic and anti-inflammatory effects of 3-[3-(phenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl] propionic acid*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 1994, 27, 1403-1406.
- ALDOUS, D. J. et al. PCT Int. Appl. WO9531, 452 (Cl.C07D403/12), 23 Nov. 1995, US Appl. 242, 752, 13 May 1994, 74pp; Chemical Abstracts, 1996, 124, 232462j.
- ANASTAS, P. T.; WILLIAMSON, T. C. *Green Chemistry: Designing Chemistry for the Environment*. ACS Symposium Series 626, American Chemical Society, Washington, 1996.
- ANASTAS, P. T.; WARNER, J. *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press: Oxford, 1998, 152.
- ANASTAS, P. T.; KIRCHHOFF, M. M. *Origins, current status, and future challenges of green chemistry*. Accounts of Chemical Research, 2002, 35, 686-694.
- ANTUNES, R. et al. *Synthesis, characterization and interaction mechanism of new oxadiazolo-phthalimides as peripheral analgesics. IV*. Journal Molecular Structure. 2003, 660, 1-13.
- ARIGA, M. et al. *Facile synthesis of 3-carbamoyl-1,2,4-oxadiazoles*. Synthesis, 2006, 20, 3453-3461.
- AZERA, R. *Microbial models for drugs metabolism*. Advances Biochemical Engineering/Biotechnology, 1999, 63, 169-218.
- BARREIRO, E. J.; SILVA, J. F. M. da; FRAGA, C. A. M. *Noções básicas do metabolismo de fármacos*. Química Nova, 1996, 19, 641-650.
- BORG, S. et al. *Synthesis of 1,2,4-oxadiazole-, 1,3,4-oxadiazole-, and 1,2,4-triazole-derived dipeptidomimetics*. Journal Organic Chemistry, 1995, 60, 3112-3120.
- BORG, S. et al. *Design, synthesis, and evaluation of phe-gly mimetics: heterocyclic building blocks for pseudopeptides*. Journal Medicinal Chemistry, 1999, 42, 4331-4342.
- BOSSCHE, H. V.; KOYMANS, L. *Review articles cytochromes P450 in fungi*. Mycoses, 1998, 41, 32-38.
- BRINK, H. J. M. V. D et al. *Cytochrome P-450. Enzyme systems in fungi*. Fungal Genetic and Biology. 1998, 23, 1-17.

- BUCHANAN, J. L. et al. *Structure-activity relationships of a novel class of Src SH2 inhibitors*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 1999, 9, 2359-2364.
- BUTTY, P. et al. *Evaluation of the susceptibility of dermatophytes to fungal drugs: a new technique*. Journal of Medical Mycology, [S.I] 1995, 33, 403-409.
- CANN, Michael C. *Bringing State-of-the-Art, Applied, Novel, Green Chemistry to the Classroom by Employing the Presidential Green Chemistry Challenge Award*. Journal Chemical Education, 1999, 76, 1639-1641.
- CEBALLOS; B. S. O; König, A. *Manual de técnicas de laboratório*. Campinas Grande, PB, 1997, 231
- CONEGLIAN, Cassiana Maria R. *Micrologia Aplicada. Biodegradação*. Universidade Estadual de Campinas. Centro Superior de Educação Tecnológica. 2007.
- CORBELLINI, Valeriano A. *Síntese e avaliação de propriedades fotofísicas e biológicas de 2-(2'-hidroxifenil) benzoxazolas e cumarinas em fungos de interesse clínico*. Tese (doutorado)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004, 269.
- CLAPP, L. B. In *Comprehensive heterocyclic chemistry*, vol. 6; Katritzky, A. R., Ed. Pergamon Press: Oxford, 1984, 365-391.
- CLARK, J. H; MACQUARRIE, D. J. *Environmentally friendly catalytic methods*. Chemical Society Reviews, 1996, 25, 303-310.
- CLARK, J. H; MACQUARRIE, D. J. *Catalysis of liquid phase organic reactions using chemically modified mesoporous inorganic solids*. Chemical Communications, 1998, 853-860.
- CLARK, J. H. *Green Chemistry: Challenges and Opportunities*. Green Chemistry, 1999, 1-8.
- DAWSON J.C., GRAEME I. P., VIVENTSOVA E. R., KUMPENE J., WILSON M. J., WEITZ, H. J. *An ecotoxicity assessment of contaminated forest soils from the Kola Peninsula*. Science of the Total Environment 355 (2006) 106– 117.
- DEEGAN, T. L. et al. *Parallel synthesis of 1,2,4-oxadiazoles using CDI activation*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1999, 9, 209-212.
- DEVILLERS, J.; STEIMAN, R.; SEIGLE- MURANDI, F. *The usefulness of the agar-well diffusion method for assessing chemical toxicity to bacteria and fungi* Chemosphere; 1989, 19, 1693-1700.
- DIANA, G. D.; NITZ, T. J. *U.S. Pat. 5,464,848 (C1.514-364; C07D413/12)*, 7 Nov.1995, US Appl. 869,287, 15 Apr. 1992, 34pp; Chemical Abstracts 1996, 24, 176114h.

DOCTOR Fungus, 2009: Fungi, fungus, fungal. Disponível em: www.doctorfungus.org/mycoses/human/blastomycosis.htm. Acessado Maio de 2009.

DOLENC, M. S.; JAKOPIN, Z.; ROSKAR, R. *Synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles as peptidomimetic building blocks*. Tetrahedron Letters; 2007, 48, 1465-1468.

DONATO, M. T.; BLASCO O'CONNOR, J. E. *Métodos de evaluación del citocromo P-450 y de su papel em metabolismo de fármacos*. Espanha, 2004. Disponível em: <http://www.uv.es/jcastell/métodos-deevaluacion-del-citocromo-P450.pdf>. Acessado em Maio de 2009.

DORNELLES, L. et al. *One-Pot Synthesis of chiral N-protected α -amino acid-derived 1,2,4-oxadiazoles*. Synthesis; 2004, 10, 1589-1593.

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

EVANS, M. D. et al. *The accelerated development of an optimized synthesis of 1,2,4-oxadiazoles: application of microwave irradiation and statistical design of experiments*. Tetrahedron Letters, 2003, 44, 9337-9341.

FACÒ, A. M. et al. *Tratamento biológico de percolado de aterro sanitário através de processo biológico com fungos*. III Encontro de Pesquisa e Pós Graduação do CEEET. Fortaleza-CE – Brasil, 2003.

GABRIEL, C. et al. *Dielectric parameters relevant to microwave dielectric heating*. Chemistry Society Reviews, 1998, 27, 213-224.

GARCIA, I. G. et al. *Removal of phenol compound from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum**. Process Biochemistry; 2000, 35, 751-758.

GEDYE, R. et al. *The use of microwave ovens for rapid organic synthesis*. Tetrahedron Letters 1986, 27, 279-282.

GIFFONI, D. A. *Filtros biológicos aplicado ao tratamento de águas residuárias sintéticas de laticínios*. Fortaleza. Dissertação Mestrado em Engenharia Civil, área de concentração em saneamento Ambiental. Universidade Federal do Ceará, 2002, 159.

GIGUERE, R. J et al. *Application of commercial microwave ovens to organic synthesis*. Tetrahedron Letters., 1986, 27, 4945-4948.

GRAEDEL, Thomas *Green Chemistry in an Industrial Ecology Context*. Green Chemistry, 1999, 1, G126-G128.

GRIFFIN, C. E. *Fungal physiology*. In: CORBELLINI, Valeriano Antonio. *Síntese e avaliação de propriedades fotofísicas e biológicas de 2-(2'-hidroxifenil) benzoxazolas e cumarinas em fungos de interesse clínico*. Tese (doutorado)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004, 269.

GUO, Q-X ; XU, Y. *Syntheses of Heterocyclic Compounds under Microwave Irradiation*. Heterocycles, 2004, 63, 903-974.

HAMZÉ, A. et al. *Synthesis of various 3-substituted 1,2,4-oxadiazole-containing chiral β - and α -amino acids from fmoc-protected aspartic acid*. Journal Organic Chemistry, 2003, 68, 7316-7321.

HJERESSEN, D.L; SCHUTT, D. L; BOESE, J. M. *J. Chemical Education*, 2000, 12, 1403.

HU J. M.; HSING G. D. *Evaluation of new antiviral agents: I. In vitro perspectives*. Antiviral Research; 1989, 11, 5-6, 217-232.

HUANG, C. HUANG, G. P. *Application of Aspergillus oryzae and Rhizopus oryzae for Cu (II) removal*. Water Resources. 1996, 30, 1985-1990.

JESCHKE, P. et al. *Ger.Offen.DE 4; 401,107 (Cl.C07D271/06)*, 20 Jul 1995, Appl. 17 Jan 1994, 40pp; Chemical Abstracts; 1995, 123, 340135t.

JOERGENSEN G. R.; RAUBUCH. M.; CAMPOS A. *Impact of cycloheximide addition on adenylates in soil*. Soil Biology & Biochemistry 38 (2006) 222–228.

JESCHKE, P. et al. *Ger.Offen.DE 4; 401,108 (Cl.C07D271/06)*, 20 Jul 1995, Appl. 17 Jan 1994, 35pp; Chemical Abstracts; 1995, 123, 340136u.

JONES, D. H. et al. *Antiviral chemotherapy. I. activity of pyridine and quinoline derivatives against neurovaccinia in mice*. Journal Medical Chemistry, 1965, 8, 676-680.

KANG, S-F.; LIAO, C-H.; HUNG, H. *Peroxidation treatment of dye manufacturing wastewater in the presence of ultraviolet light and ferrous ions*. Journal Hazardous Materials. 1999, 65, 317-333.

KAPPOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. *Fungal biosorption an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewater review*. Bioresource Technology; 1995, 53, 195-206.

KATRITZKY, A. R.; SHESTOPALOV, A. A.; SUZUKI, K. *A convenient synthesis of chiral 1,2,4-oxadiazoles from N-protected (α -aminoacyl) benzotriazoles*. *Arkivoc*. 2005, vii, 36-55.

KINGSTON, H. M.; JASSIE, L. B., eds.; *Introduction to Microwave Sample Preparation*, ACS: Washington, 1988, 263.

LEITE, A. C. L. et al. *Synthesis, anti-inflammatory and antimicrobial activities of new 1,2,4-oxadiazoles peptidomimetics*. *Il Farmaco*. 2000, 55, 719-724.

LIANG, G.-B; FENG, D. D. *An Improved oxadiazole synthesis using peptide coupling reagents*. *Tetrahedron Letters*, 1996, 37, 6627-6630.

MELO, S. J. de. et al. *Synthesis of some 3-aryl-1,2,4-oxadiazoles carrying a protected L-alanine side chain*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 1998, 9, 465-468.

MEYER, E.; JOUSSEF, A. C; GALLARDO, H. *Synthesis of new 1,2,4- and 1,3,4-oxadiazole derivative*. *Synthesis. Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry*, 2003, 6, 899-905.

MOMANY, M.; BREAKSPEAR, A. *Aspergillus nidulans conidiation genes dew A, flu G, and stu A. Are. Differentially regulated in early vegetative growth*. Department of Plant Biology, the University of Georgia, Athens, Georgia 30602. 2007, 1697-1700.

NARDONE, R. N. *Toxicity testing in vitro*. In: ROTBBLAT, G. H.; CRISTOFALO, V. J. (Ed). *Growth, nutrition and metabolism of cell in culture*. New York: Academic, 1977, 471-495.

NIEWEGLOWSKI, A. M. A.; SILVA, E. M. de F. M. Da. *Importância dos parâmetros ecotoxicológicos em estudos ambientais*. In: *Manual de avaliação de impactos ambientais*, Curitiba: SUREMA; 1999 6.

OLIVEIRA, M. C. D. (2002). Disponível em: <http://www.cetesb.gov.br>. Acessado em: Maio de 2009.

OLIVEIRA A.; PAMPULHA M. E. *Effects of Long-Term heavy metal contamination on soil microbial characteristics*. *The Society for Biotechnology, Japan* Vol. 102, No. 3, 157–161. 2006 DOI: 10.1263/jbb. 102.157.

- ORZECHAWSCHI, M. *Contaminação do ar por Aspergillus em ambiente de reabilitação de animais marinha*. 2008, 174-179. Disponível no site: www.funvest.com.br/novo/revista/45/n3/174-179.
- PALAZZO, G. et al. *1,2,4-Oxadiazole-IV. Synthesis and pharmacological properties of a series of substituted aminoalkyl-1,2,4-oxadiazoles*. Journal Medicinal Pharmaceutical Chemical, 1961, 4,351-367.
- POLIAKOFF, M. et al. *Green Chemistry: Science and Politics of Change*. Science, 2002, 297, 807-810.
- PORCO Jr., J. A. et al. *Parallel synthesis of 1,2,4-oxadiazoles using CDI activation*. Bioorganic Medicinal Chemistry Letters 1999, 9, 209-212.
- PRINCE, M. S.; CLASSEM, J. J.; PAYNE, G. A. *Aspergillus niger absorbs copper and zinc from swine wastewater*. Bioresource Technology. 2001, 77, 41-49.
- PURANIK, P., R.; TEJOMYEE, B. S. *Microbial degradation of monocrotophos by Aspergillus oryzae*. International Biodeterioation & Biodegradation. 2009, 1-6.
- RAMALINGAM, T.; DESHMUKH, A. A.; SATTUR, P. B. *Synthesis an pharmacology of 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazoles*. Journal Indian Chemical Society; 1981, 58, 269-271.
- REN, Xia-W. ET AL. *Biological leaching of heavy metals from a contaminated soil by Aspergillus niger*. Journal of Hazardous Materials; 2009, 1-6.
- RICE, K. D.; NUSS, J. M. *An improved synthesis of 1,2,4-oxadiazoles on solid support*. Bioorganic Medicinal Chemistry Letters; 2001, 11, 753-755.
- RODRIGUES; K. A. et al. *Redução da concentração de fenol em água residuária sintética em reatores biológicos com fungos*. VI Simpósio Luso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2004.
- RUDOLPH, J. et al. *Seco-cyclothialidines: New concise synthesis, inhibitory activity toward bacterial and human DNA topoisomerases, and antibacterial properties*. Journal Medicinal Chemistry, 2001, 44, 619-626.
- SÁ, I. M. B. *Biotratamento de efluentes de uma indústria de laticínios por ação de fungos decompositores*. Dissertação (mestrado), 1997. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 83.
- SAMPAIO, G. M. M. S. et al. *Pós tratamento de efluentes de um reator UASB através de um reator biológico com fungos*. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. 2004, 9, 1, 73-81.

- SAMS, C.K; LAU, J. *Solid-phase synthesis of 1,2,4-oxadiazoles*. Tetrahedron Letters; 1999, 40, 9359-9362.
- SANSON, R. A. et al. *New ochratoxin A or sclerotium producing species in Aspergillus section nigri*. Studies in Mycology; 2004, 50.
- SANTAELLA, S. T. *Estudos de tecnologias apropriadas para tratamento de efluentes da indústria de castanha de caju*. Fortaleza: UFC. Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, 1997, 31 (Relatório de Pesquisa).
- SANTAELLA, S. T. *Estudos de tecnologias apropriadas para tratamento de efluentes da indústria de castanha de caju*. Fortaleza: UFC. Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, 1999, 31 (Relatório de Pesquisa).
- SANTOS, E. V. M. *Tratamento biológico de águas residuárias de uma indústria têxtil em reatores de leito fixo e fluxo ascendente com Aspergillus niger*. Monografia do Centro Federal de Educação Tecnológica. Distrito Federal. 2006, 78.
- SARIASLANI, F. S. *Microbial cytochrome P-450 and xenobiotic metabolism*. Advances Applied Microbiology, 1991, 36, 133-178.
- SHARMA, P.; SINGH, L., DILBAGHI; N. *Response surface methodological approach for the decolorization of simulated dye effluent using Aspergillus fumigatus fresenius*. Journal of Hazardous Materials; 2008, 1081-1086.
- SINGH, H.; YADAV, L. D. S. *Studies in oxadiazole. Synthesis of some amido (or imido) methyl-derivatives of 2-amino-mercapto-5-aryl-1,3,4-oxadiazoles as potential fungicides*. Journal Indian Chemistry Society, 1977, 54, 1143-1147.
- SINGH; D. K.; VIG; K.; GOSWAMI, S. *Biodegradation of α and β endosulfan by Aspergillus Sydoni*. Chemosphere, 2009, 883-888.
- SMITH, R.V. ROSAZZA, J. P. *Microbial models for drug metabolism*. Advances Applied Microbiology. 1979, 25, 169-208.
- SMITH, R.V.; ROSAZZA, J. P. *Microbial models of mammalian metabolism*. Journal of Natural Products, 1983, 46, 1, 79-91.
- SOKOLOV, S. D. et al. *Method of obtaining 5-(2-hydroxyphenoxy methyl)-1,2,4-oxadiazoles*. Khim-Farm. Zh, 1995, 29, 36; Chemical Abstracts 1996, 124, 76195s.
- SRIVASTAVA, R. M. et al. *Antiinflammatory property of 3-Aryl-5-(n-propyl)-1,2,4-oxadiazoles and antimicrobial property of 3-aryl-5-(n-propyl)-4,5-dihydro-1,2,4-*

oxadiazoles: Their syntheses and spectroscopic studies. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2003, 11, 1821-1827.

SRIVASTAVA, R. M. et al. *Synthesis of 3-ary-5-decapentyl-1,2,4-oxadiazole possessing antiinflammatory and antitumor properties.* Il Farmaco; 2005, 60, 955-960.

SRIVASTAVA, R. M. et a. *Microwave-induced one-pot synthesis of 4-[3-(aryl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-butan-2-ones under solvent free conditions.* Tetrahedron Letters, 2007, 48, 6195-6198.

SUMAN, S. P.; BAHTEL, S. C. *5-Substituted-1,3,4-oxadiazoles and related compounds as possible fungicides.* Journal Indian Chemistry Society, 1979, 56, 712-715.

TIXIER, C. et al. *Fungal biodegradation of a phenylurea herbicide; diuron: structure and toxicity of metabolites.* Pest. Management Sciences, 2000, 56, 455-462.

THORNTON, Joe *Implementing green chemistry. An environmental policy for sustainability.* Pure and Applied Chemistry, 2001, 73, 1231-1236.

TROST, B. M. *On atom economy.* Angewandte Chemie International. Ed.; 1995, 34, 259-281.

TUNDO, P. et al. *Special topic issue on green chemistry – synthetic pathways and processes in green chemistry. Introductory overview.* Pure and Applied Chemistry, 2000, 72, 1207-1230.

VARMA, R. S.; SAINI, R. K. *Wet alumina supported chromium (VI) oxide: Selective oxidation of alcohols in solventless system.* Tetrahedron Letters; 1998, 39, 1481-1482.

VARMA, Rajender S. *Solvent-free organic syntheses using supported reagents and microwave irradiation.* Green Chemistry, 1999, 1, 43-55.

VAUFLEURY, A., KRAMARZ E. P., BINET, P. CORTET, J. CAUL, S.; ANDERSEN, M. N. PLUMEY, E.; COEURDASSIER, M.; KROGH, H. P. *Exposure and effects assessments of Bt-maize on non-target organisms (gastropods, microarthropods mycorrhizal fungi) in microcosms.* Pedobiologia 51 (2007) 185-194.

VOLESKY, B.; HOLAN, Z. R. *Biosorption of heavy metals.* Biotechnology Progress, 1995, 11, 235-250.

VU, C. B. et al. *Discovery of potent and selective SH2 inhibitors of the tyrosine kinase ZAP-70.* Journal Medicinal Chemistry; 1999, 42, 4088-4098.

WILLIAMS, S. A.; LEMKE, T. L.; FOYE, W. O. *Principles of Medicinal Chemistry.* 4ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1995.

WINTERTON, Neil. *Twelve More Green Chemistry Principles*. *Green Chemistry*, 2001, 3, G73-G75.

WOOLFOLK, C. A. *Procedure for the transfer of small discs of ágar- containg media under sterile conditions and some applications of this technique (agar disc auxanography)*. *Applied Microbiology*, 1971, 933-936. American Society for Microbiology.

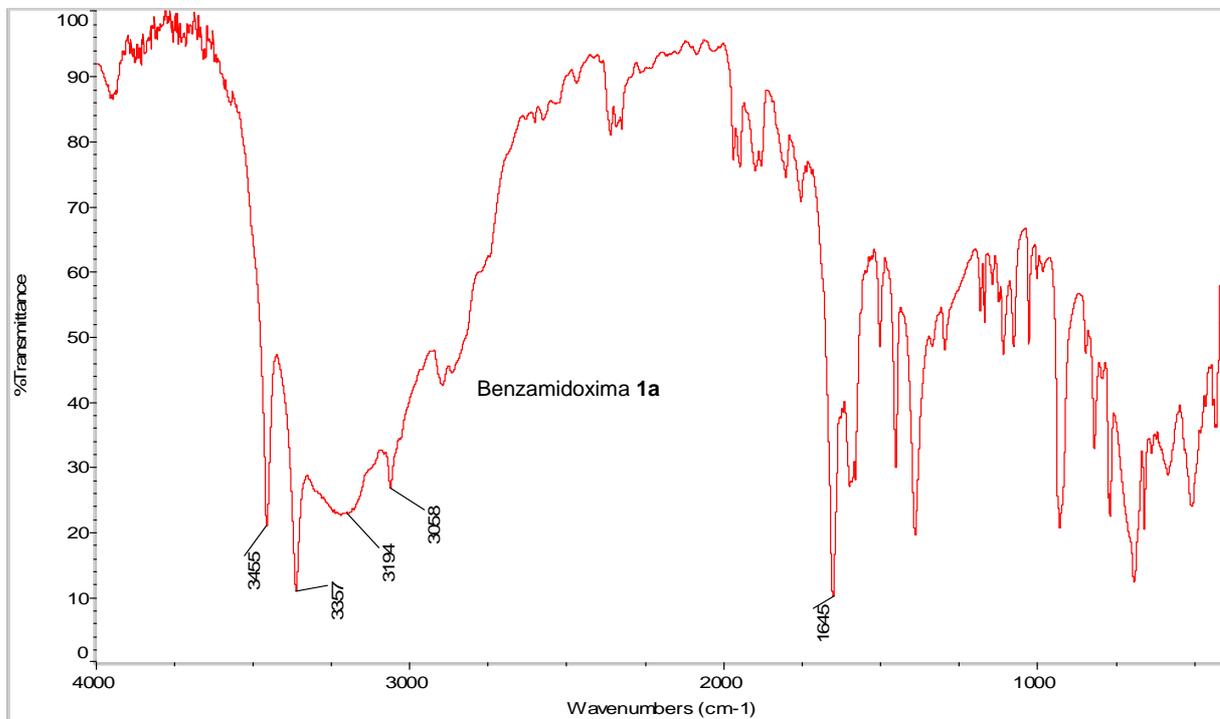
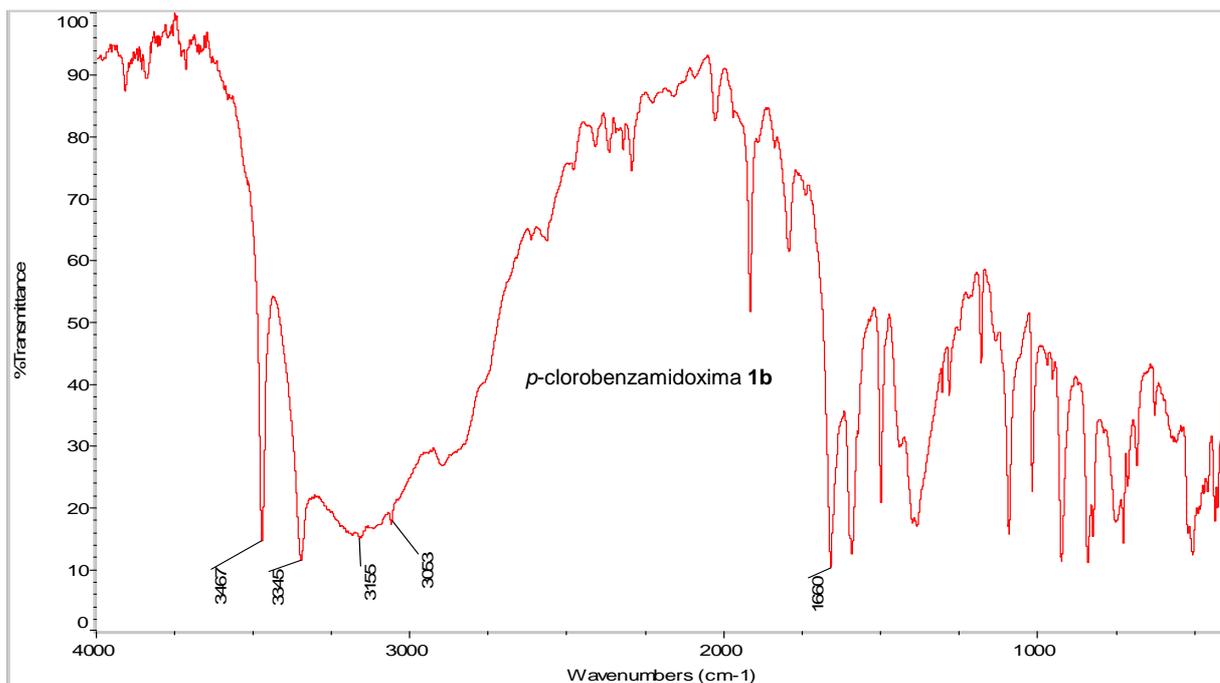
YAKUBU, N. A.; DUDENEY, A. W. L. *Biosorption of uranium with Aspergillus niger: In: Eccles, H. H.; Hunt, s. (Eds), Immobilization of Ions by Biosorption*, Ellis Harwood, Chichester, UK; 1986, 183-200.

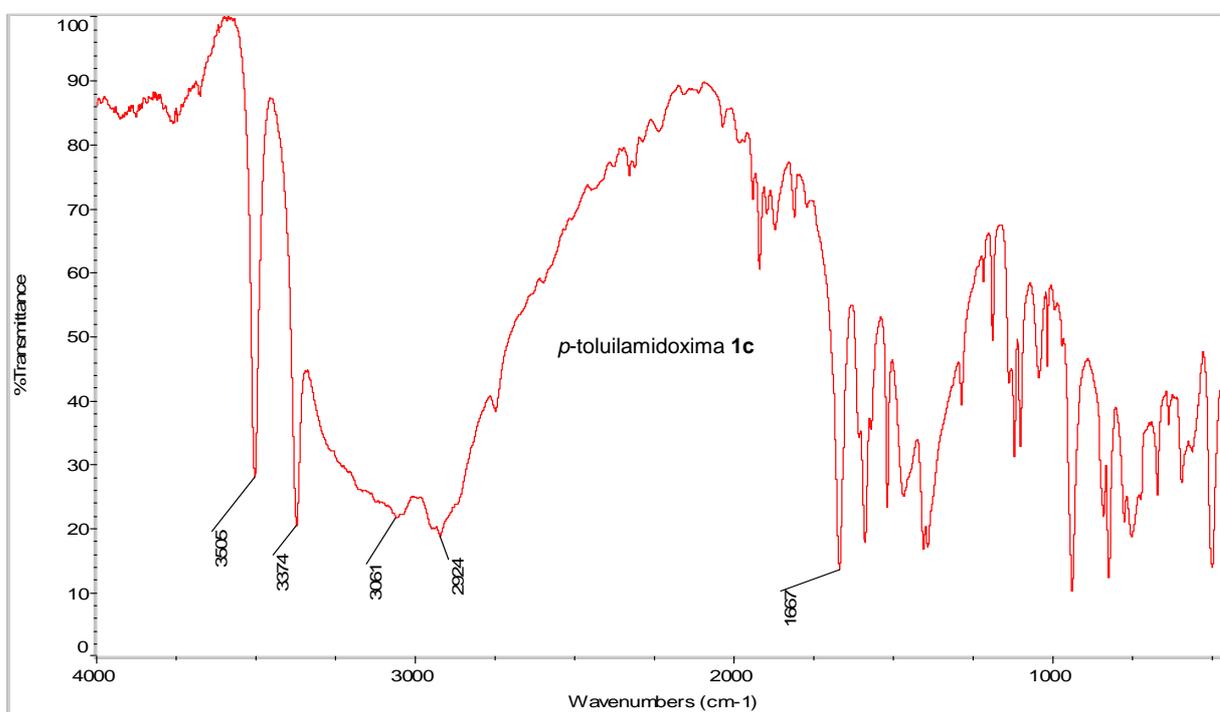
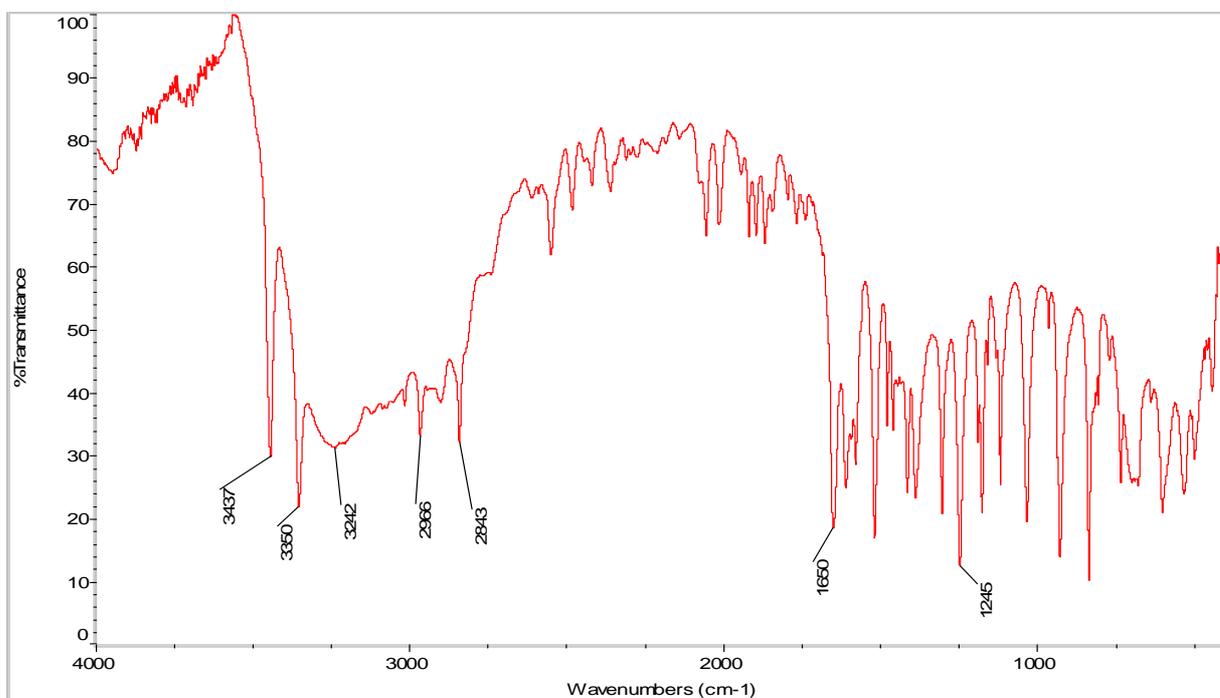
YAROVENKO, V. N. et al. *Synthesis of 3-carbamoyl-1,2,4-oxadiazoles*. *Russian Chemical Bulletin*, 2002, 47, 1857-1861.

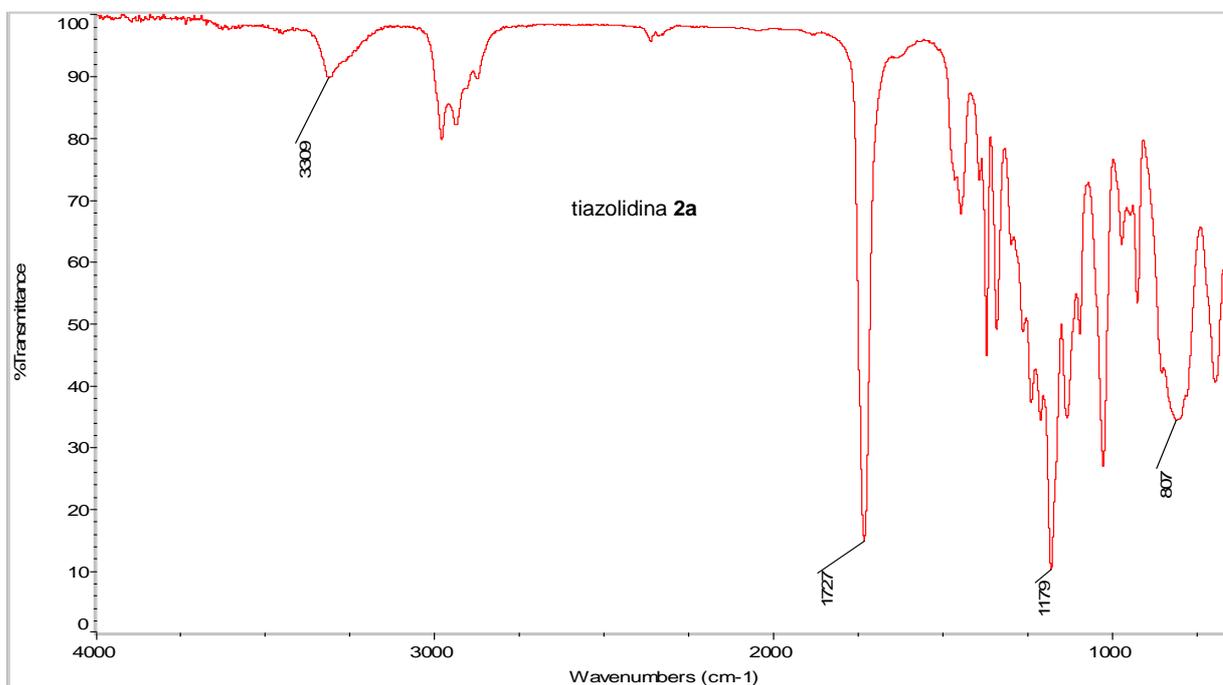
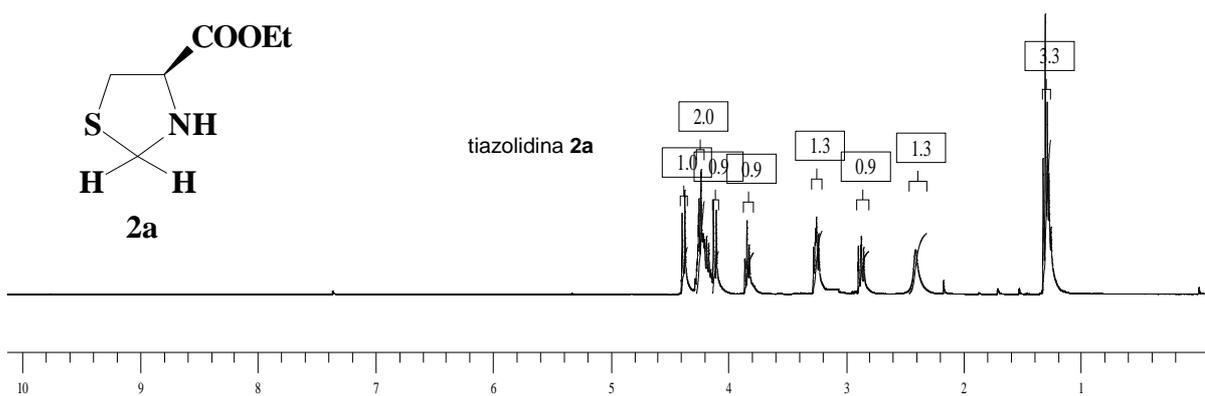
YOUNG, J. R.; De VITA, R. J. *Novel synthesis of oxadiazoles v/palladium catalysis*. *Tetrahedron Letters*, 1998, 39, 3931-3934.

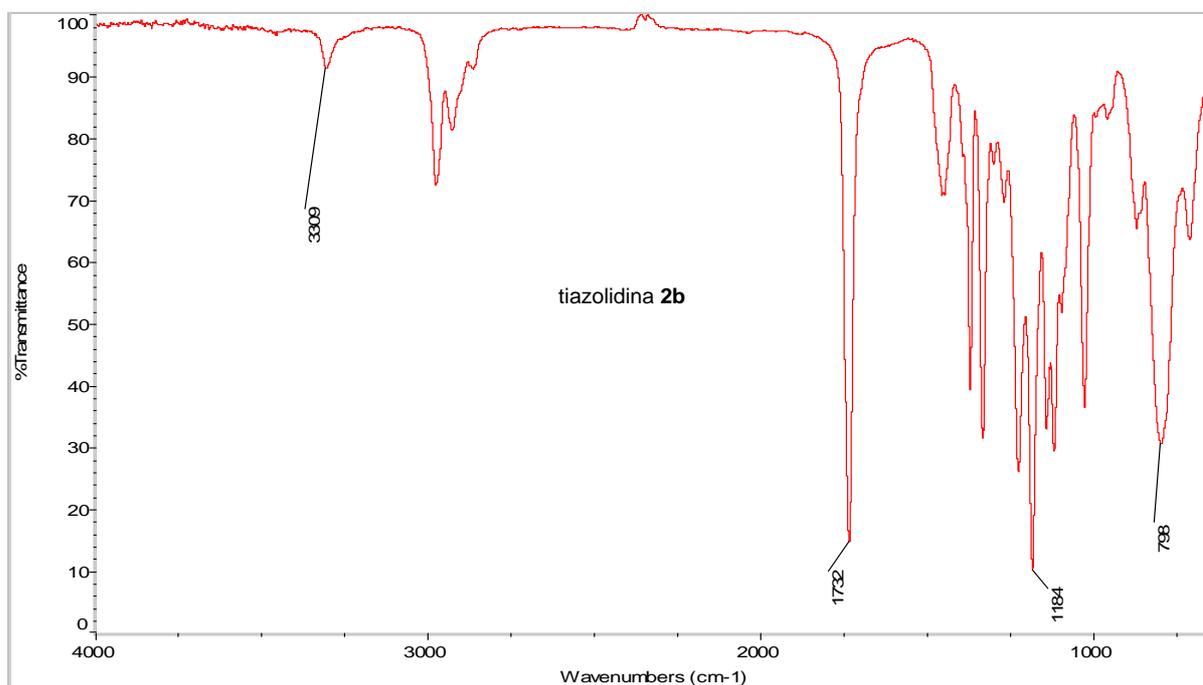
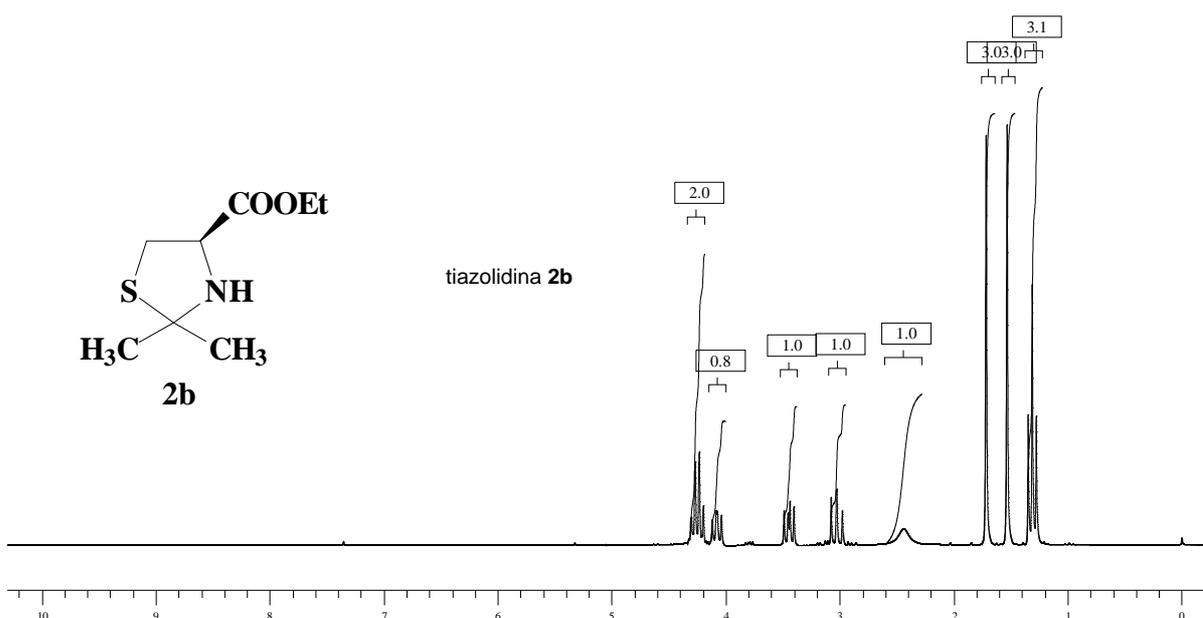
ZLOTORZYNSKI, A. *The application of microwave radiation to analytical and environmental chemistry*. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 1995, 25, 43-76.

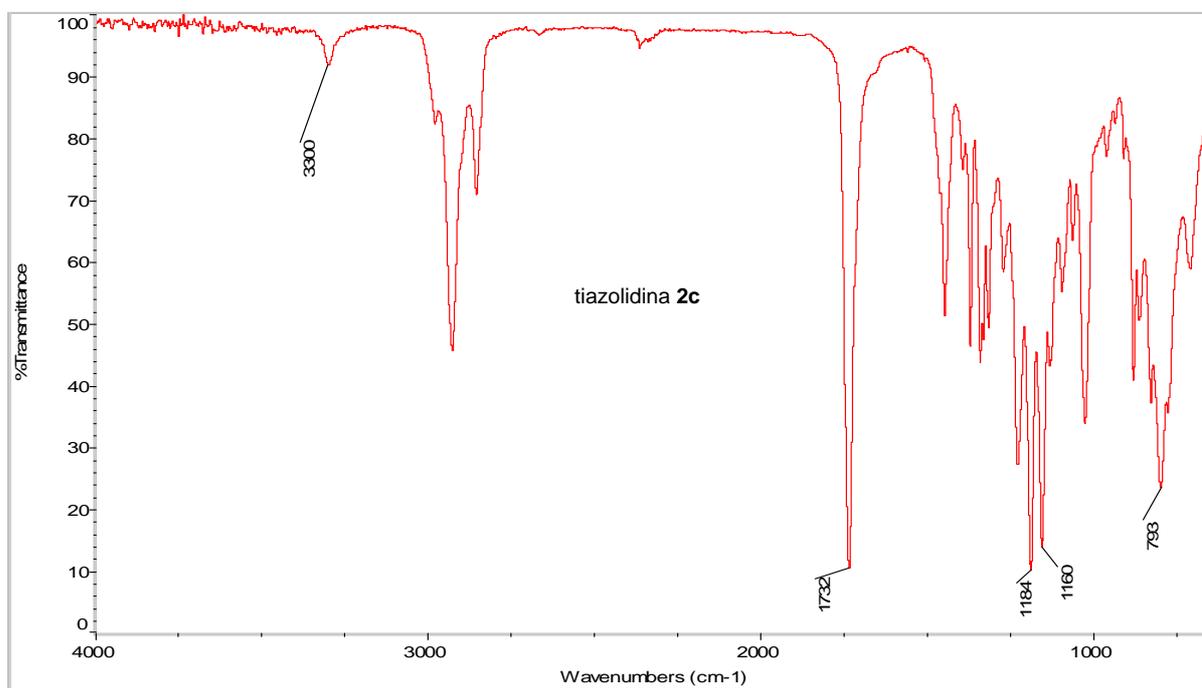
ANEXOS

ANEXO A - Espectro de IV da Benzamidoxima **1a** em KBr (drifts).ANEXO B - Espectro de IV da *p*-clorobenzamidoxima **1b** em KBr (drifts).

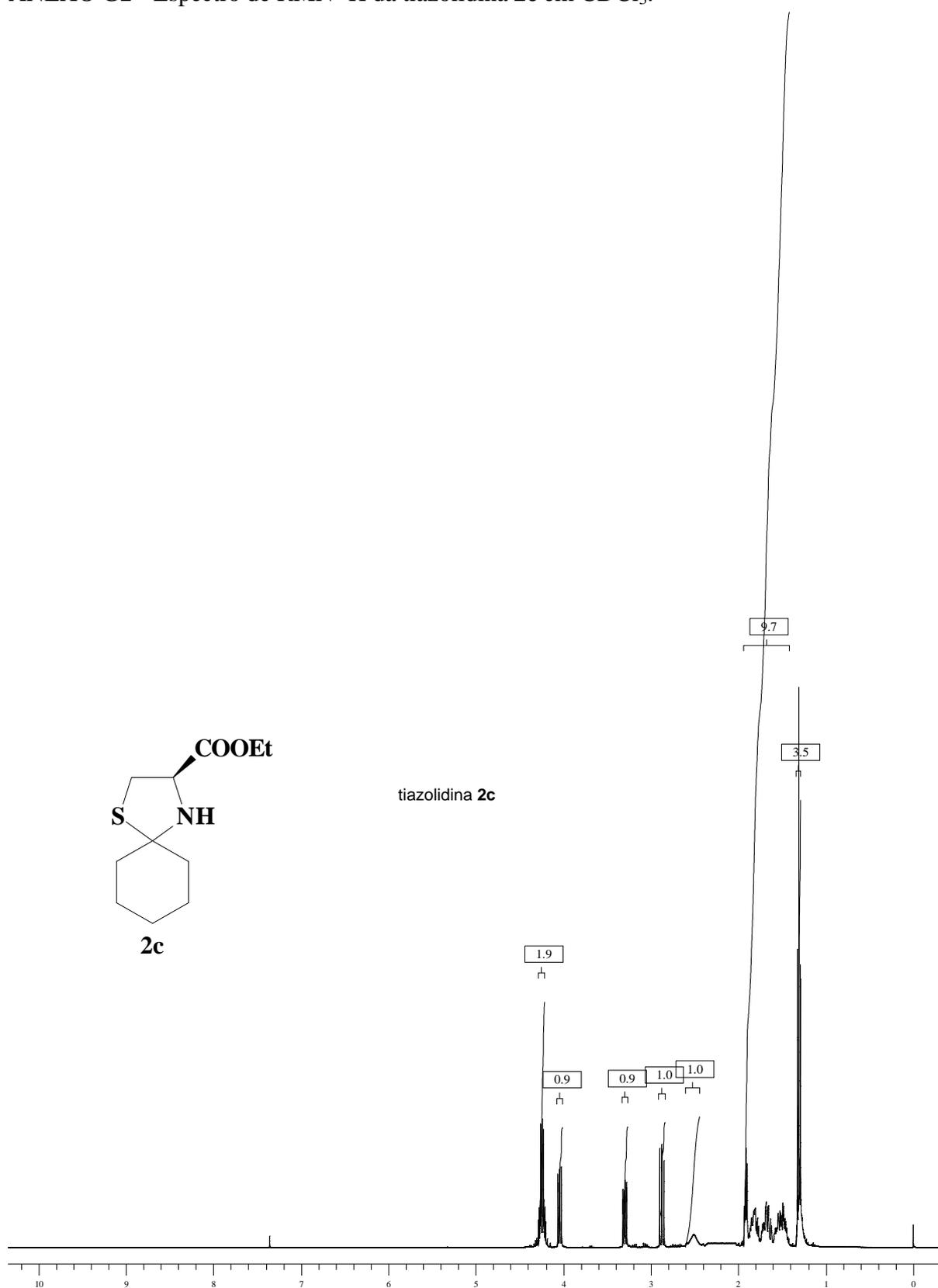
ANEXO C - Espectro de IV da *p*-toluilamidoxima **1c** em KBr (drifts).ANEXO D - Espectro de IV da *p*-metoxibenzamidoxima **1d** em KBr (drifts).

ANEXO E1 - Espectro de IV da tiazolidina **2a** (ATR).ANEXO E2 - Espectro de RMN ¹H da tiazolidina **2a** em CDCl₃.

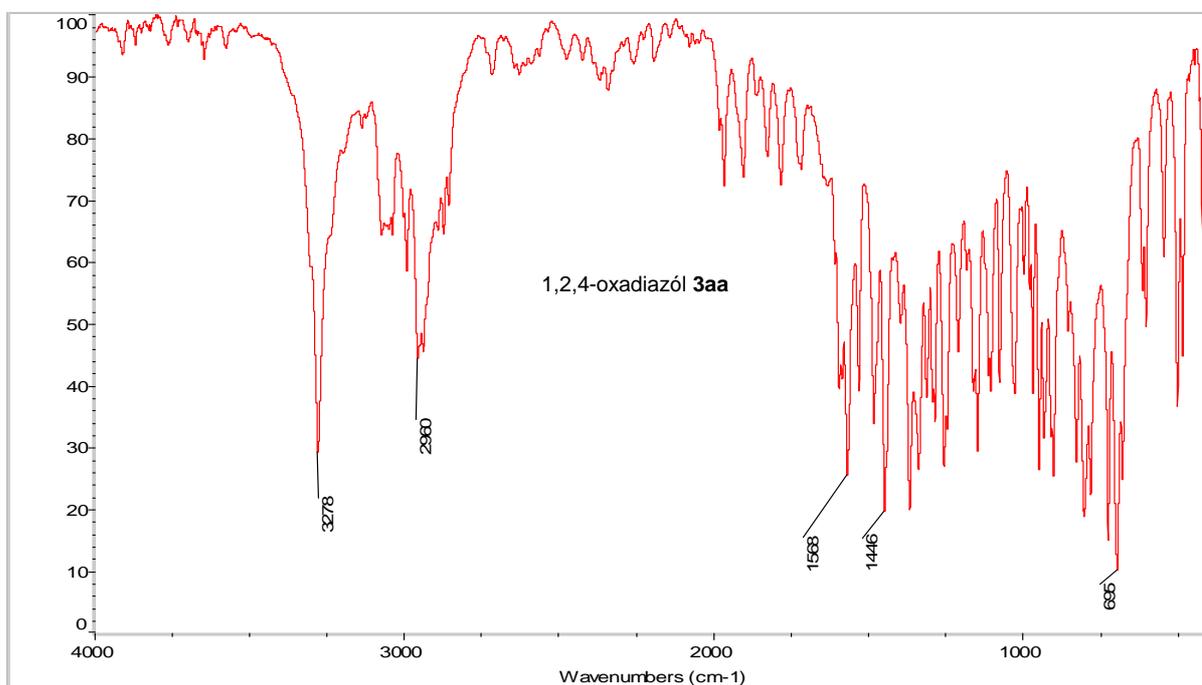
ANEXO F1 - Espectro de IV da tiazolidina **2b** (ATR).ANEXO F2 - Espectro de RMN ¹H da tiazolidina **2b** em CDCl₃.

ANEXO G1 - Espectro de IV da tiazolidina **2c** (ATR).

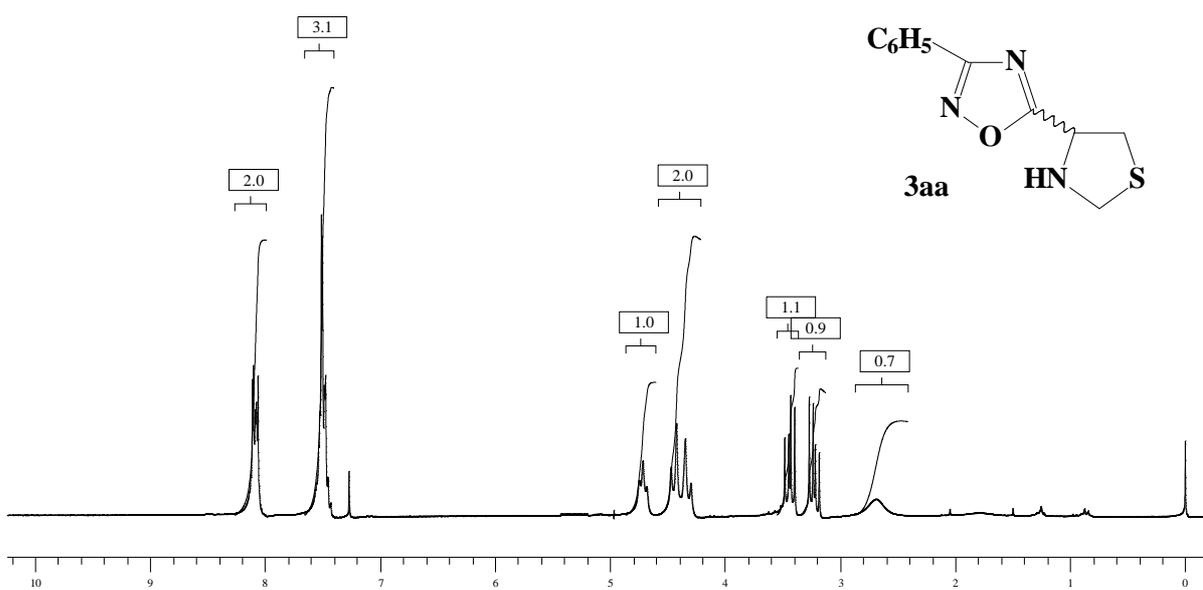
ANEXO G2 - Espectro de RMN ^1H da tiazolidina **2c** em CDCl_3 .

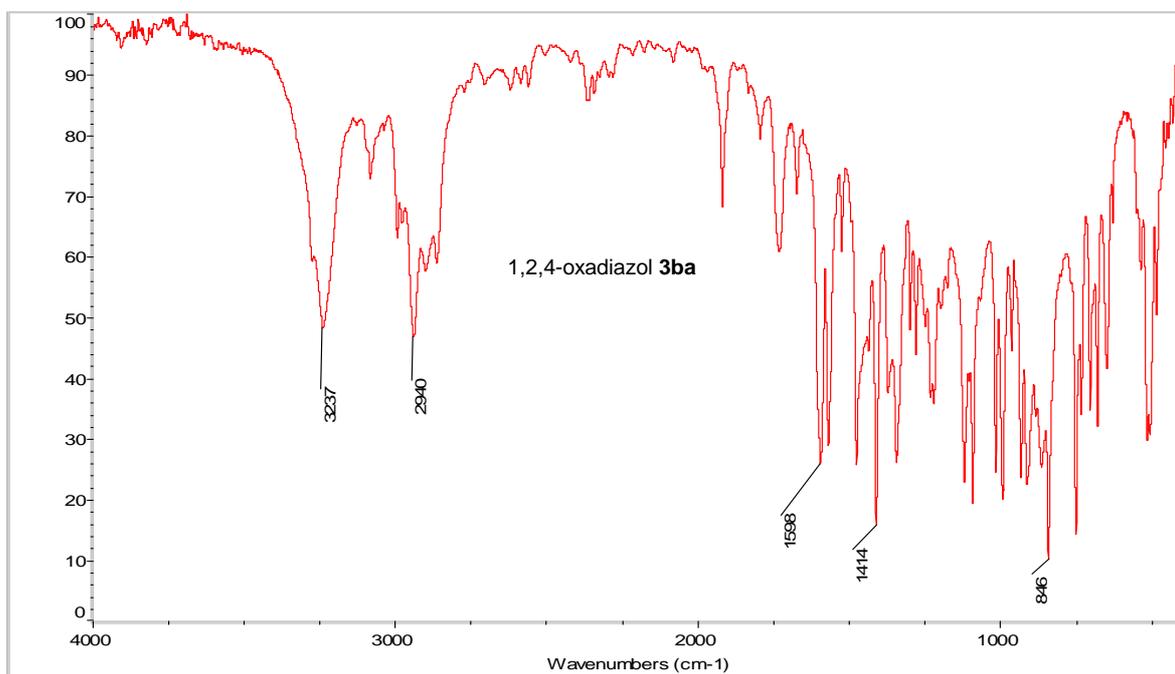
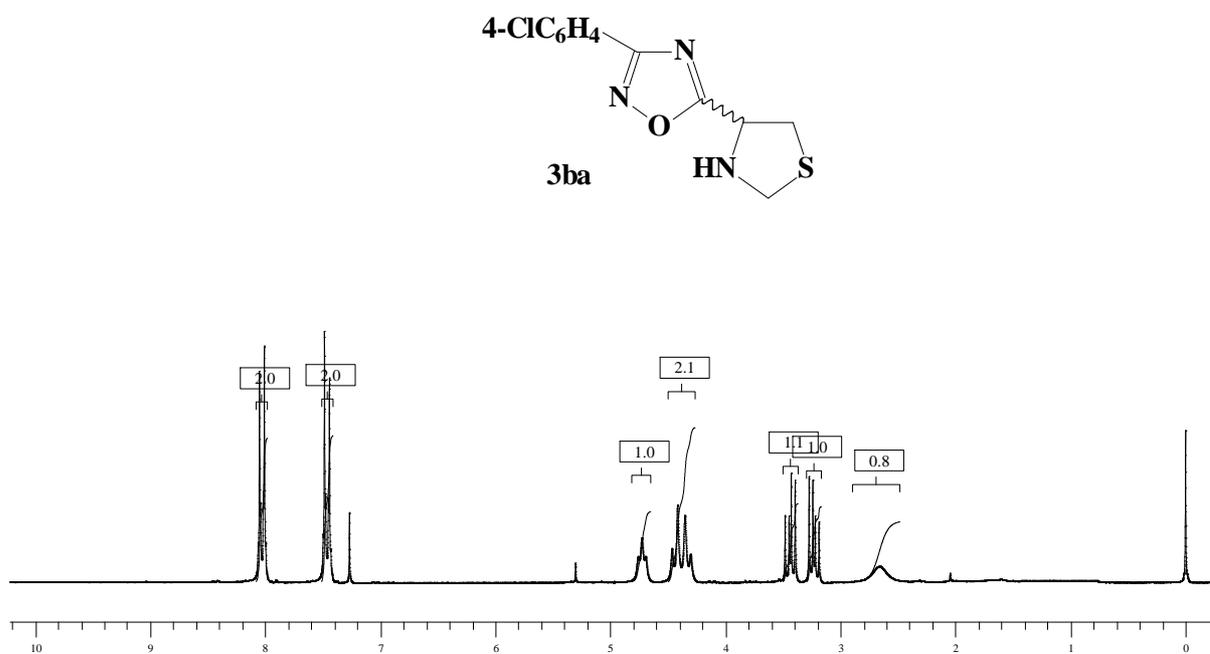


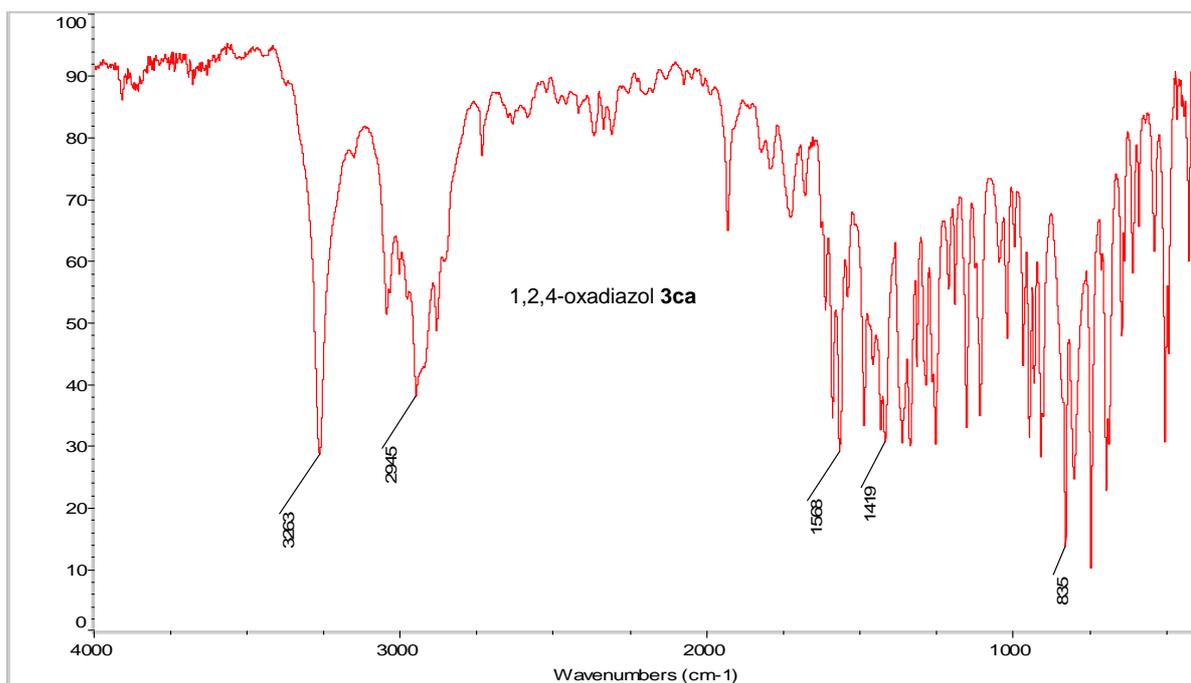
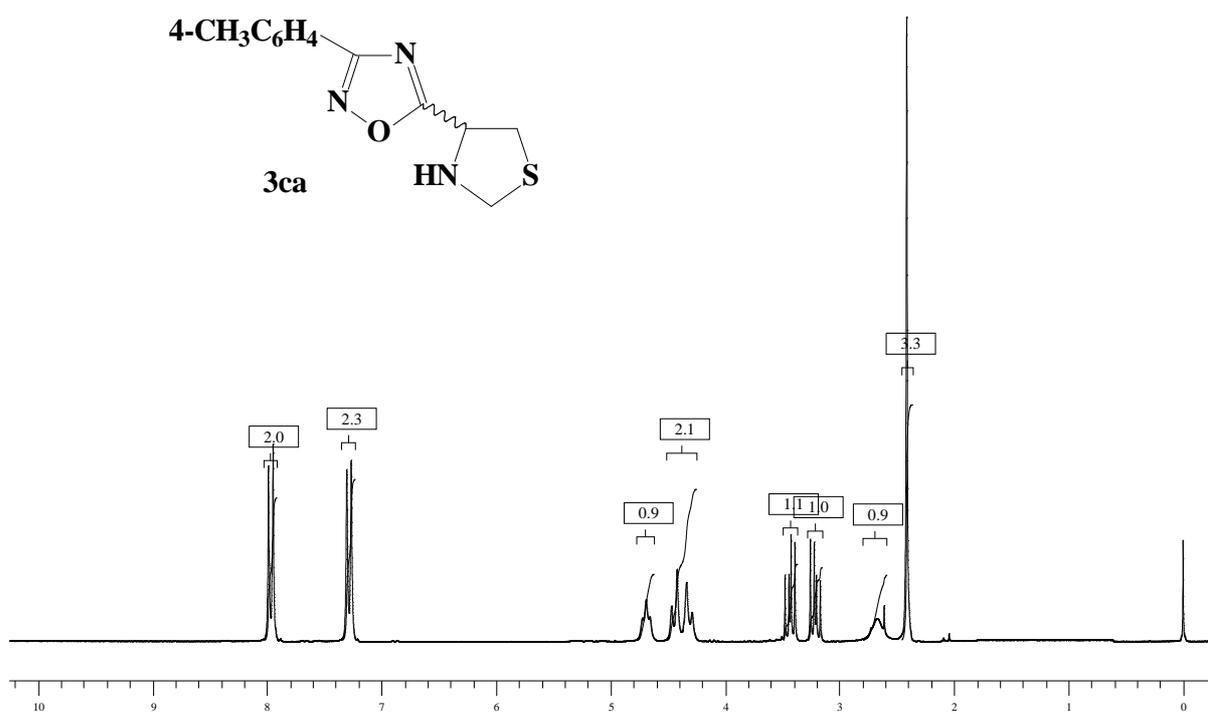
ANEXO H1 - Espectro de IV do 1,2,4-oxadiazol **3aa** em KBr (drifts).

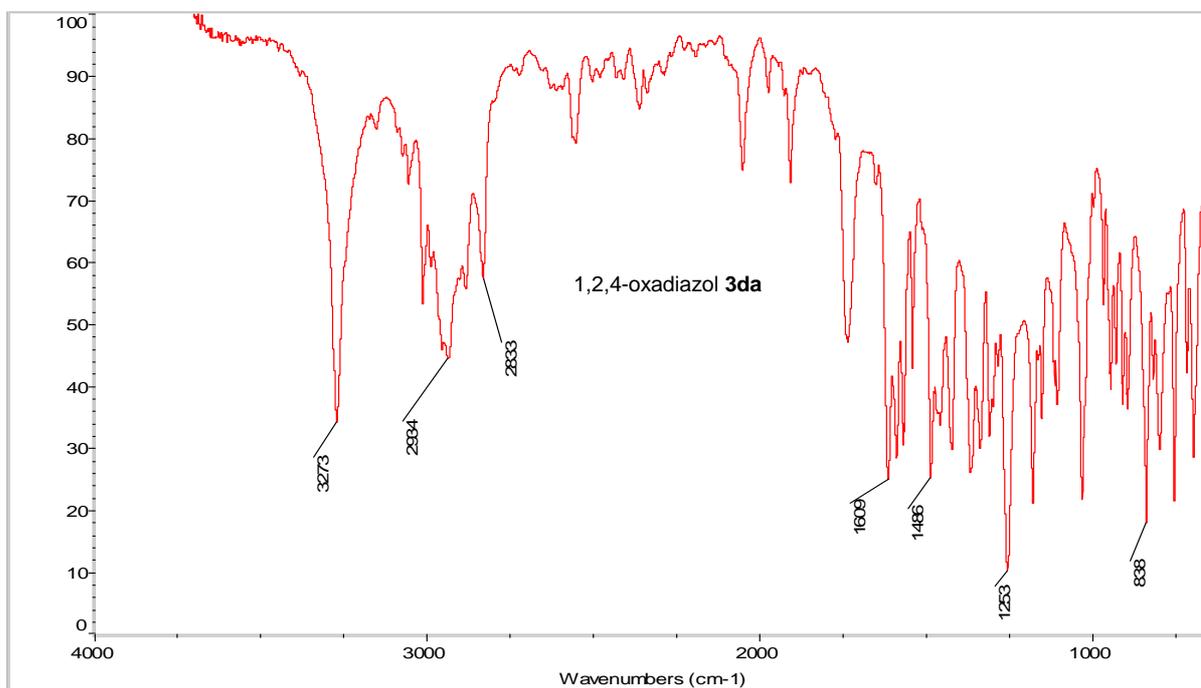
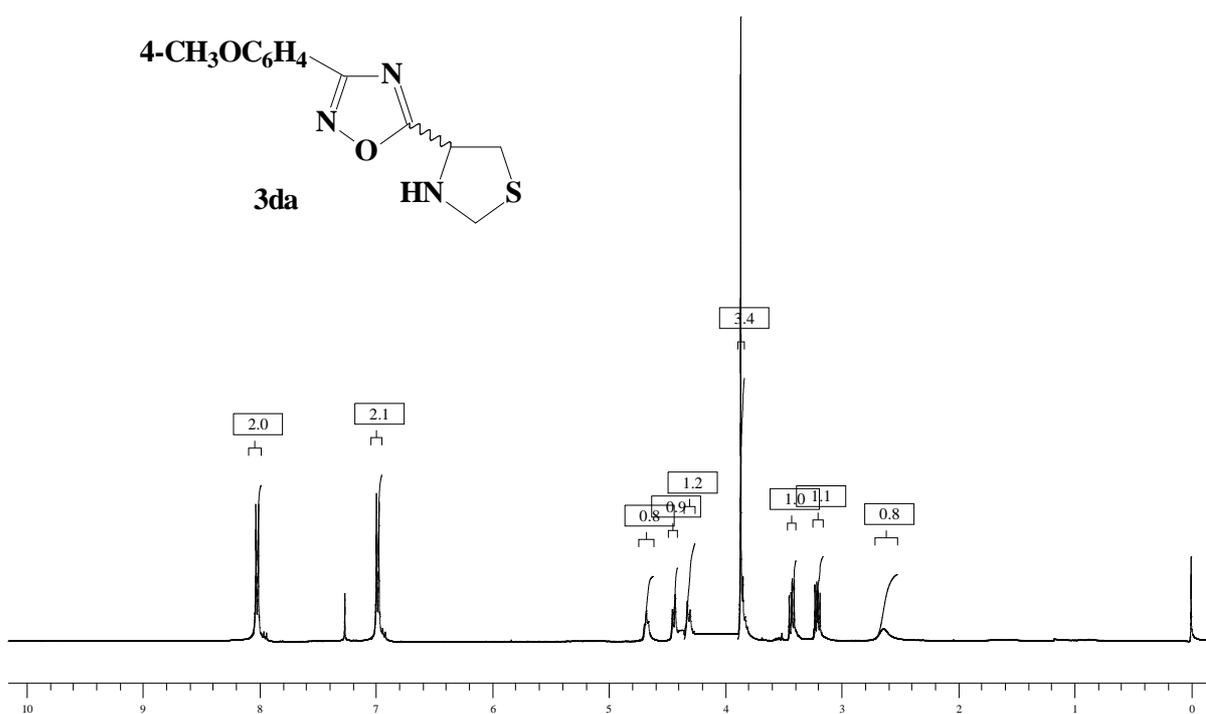


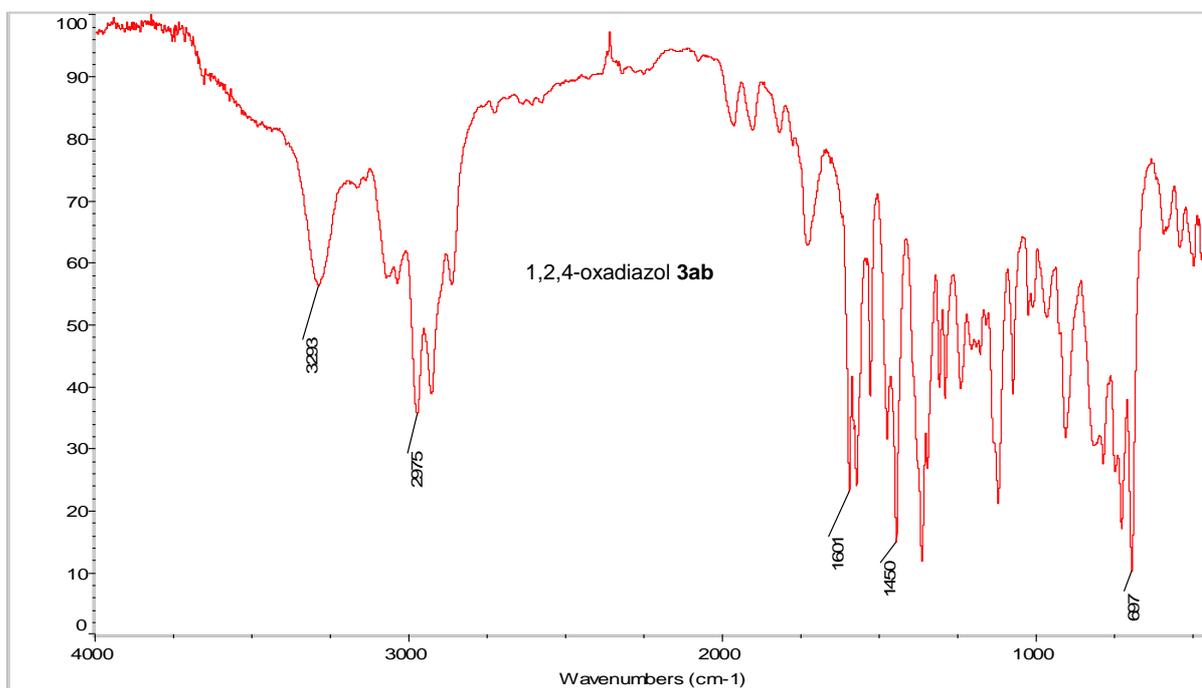
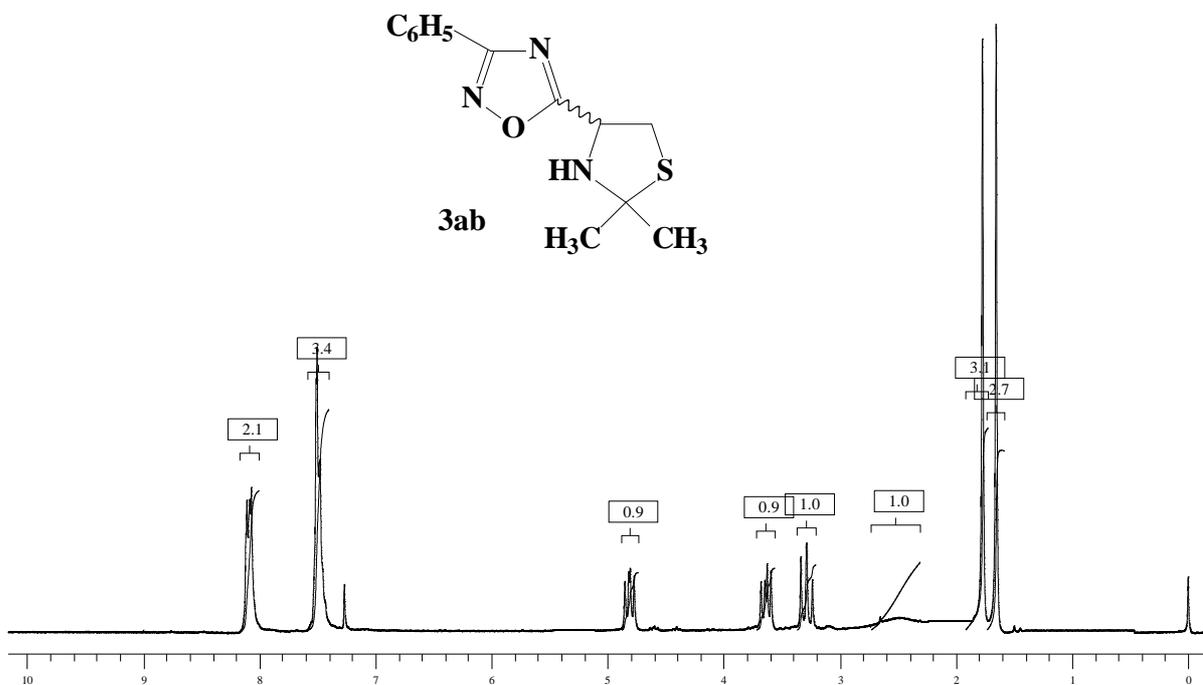
ANEXO H2 - Espectro de RMN ¹H do 1,2,4-oxadiazol **3aa** em CDCl₃.

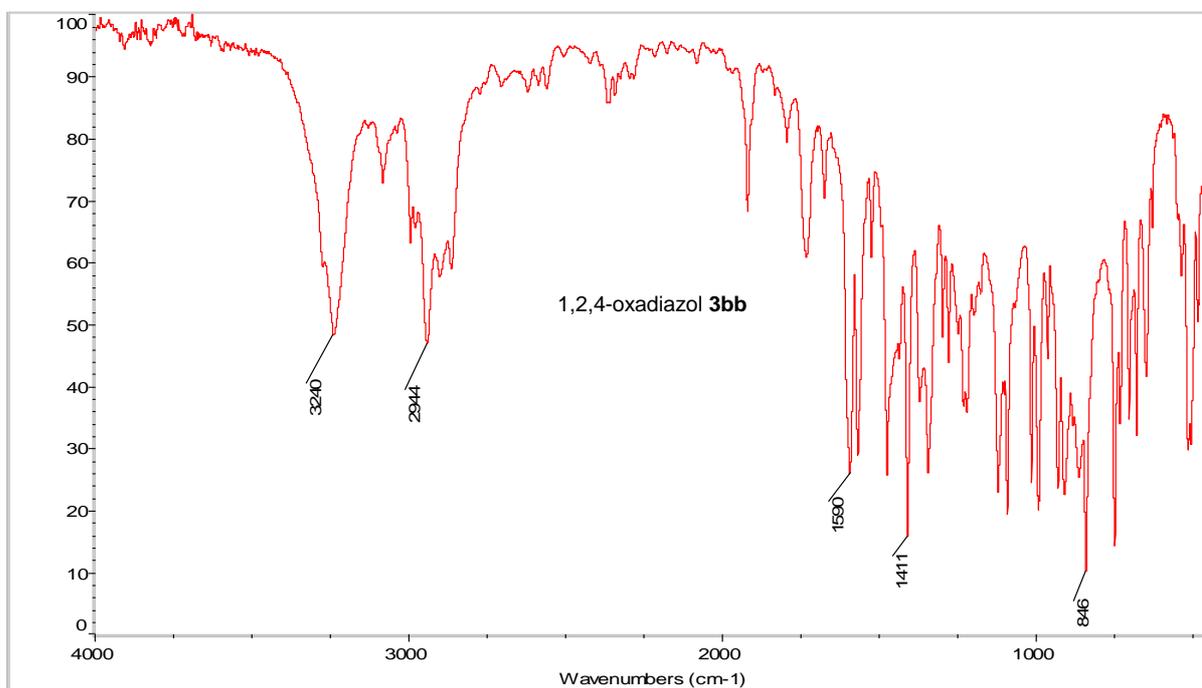
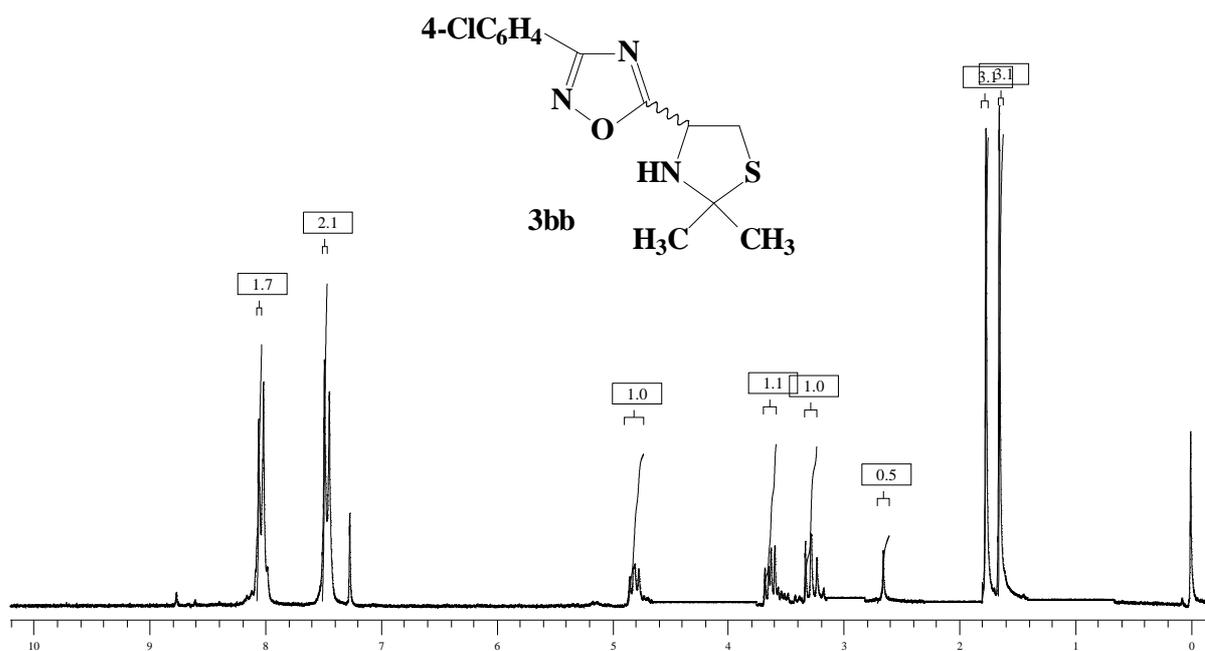


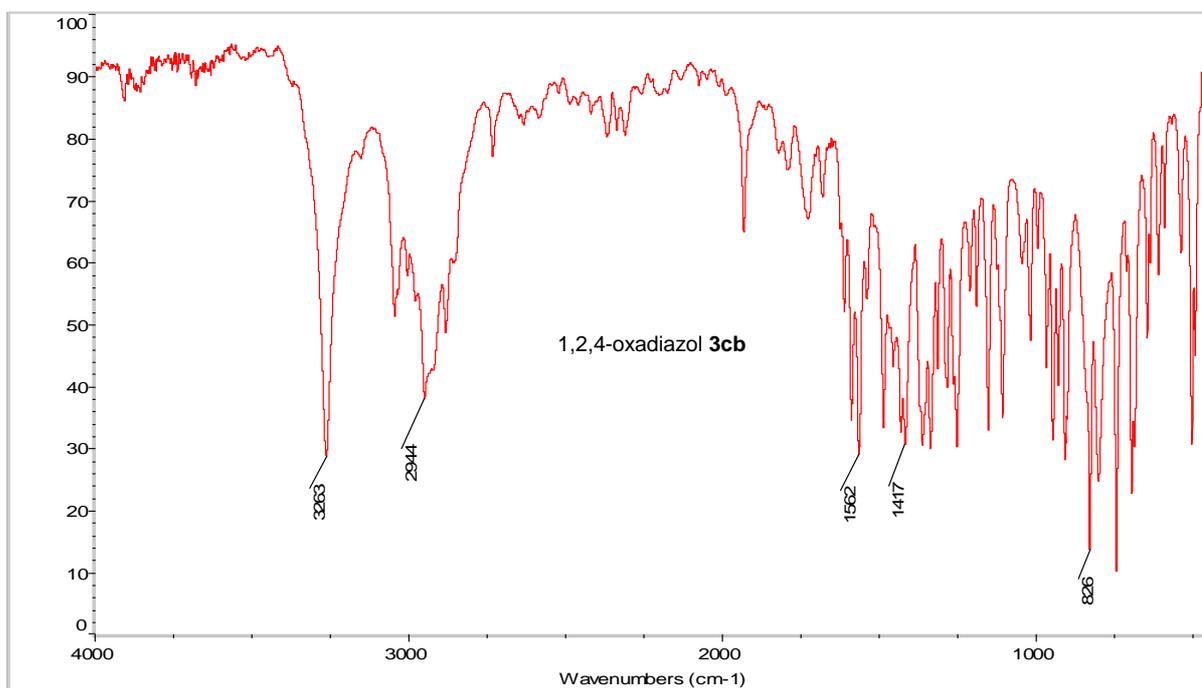
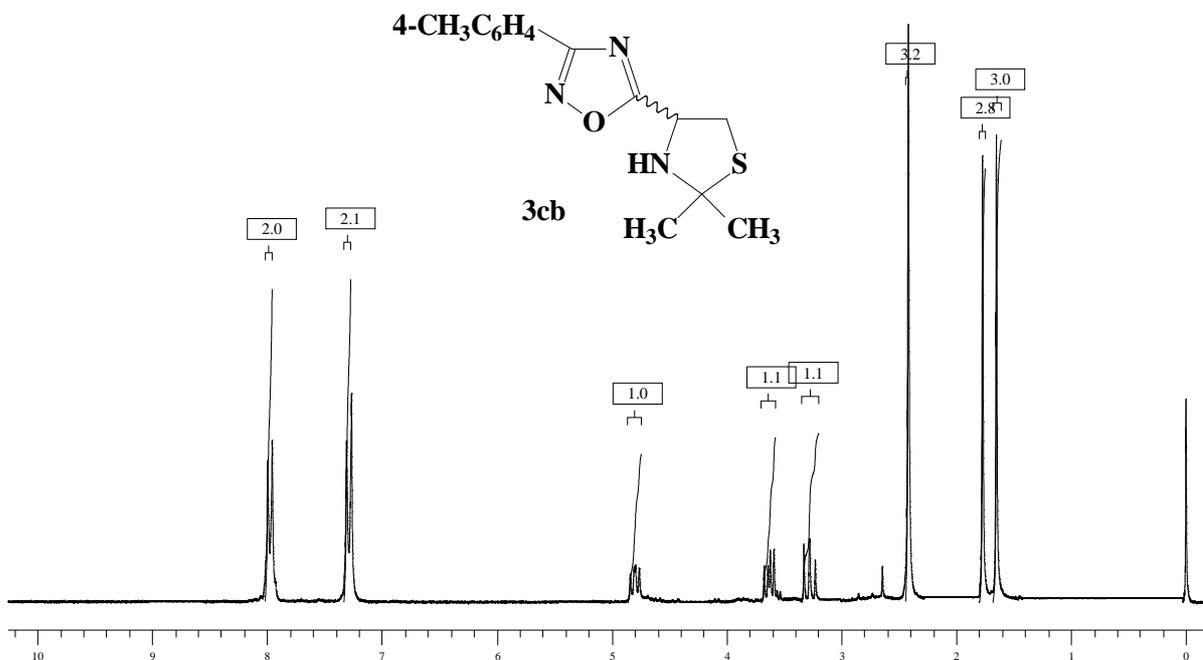
ANEXO I1 - Espectro de IV do 1,2,4-oxadiazol **3ba** em KBr (drifts).ANEXO I2 - Espectro de RMN ¹H do 1,2,4-oxadiazol **3ba** em CDCl₃.

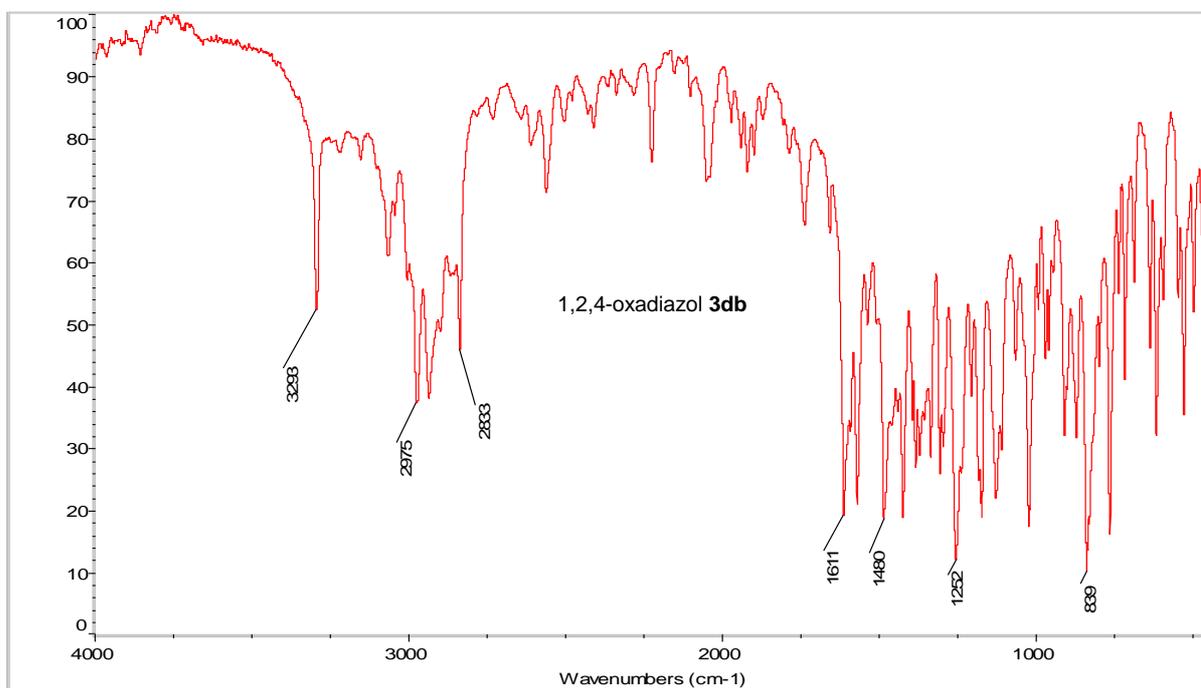
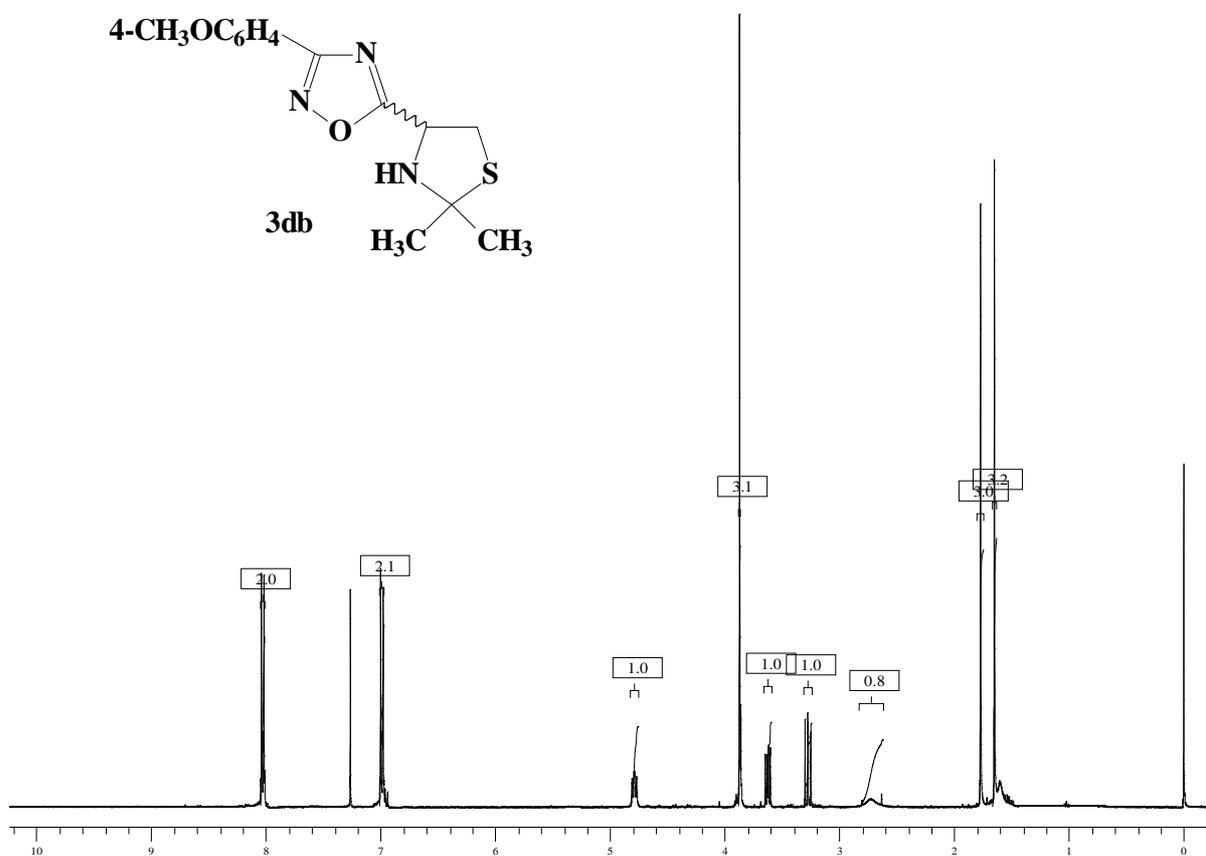
ANEXO J1 - Espectro de IV do 1,2,4-oxadiazol **3ca** em KBr (drifts).ANEXO J2 - Espectro de RMN ¹H do 1,2,4-oxadiazol **3ca** em CDCl₃.

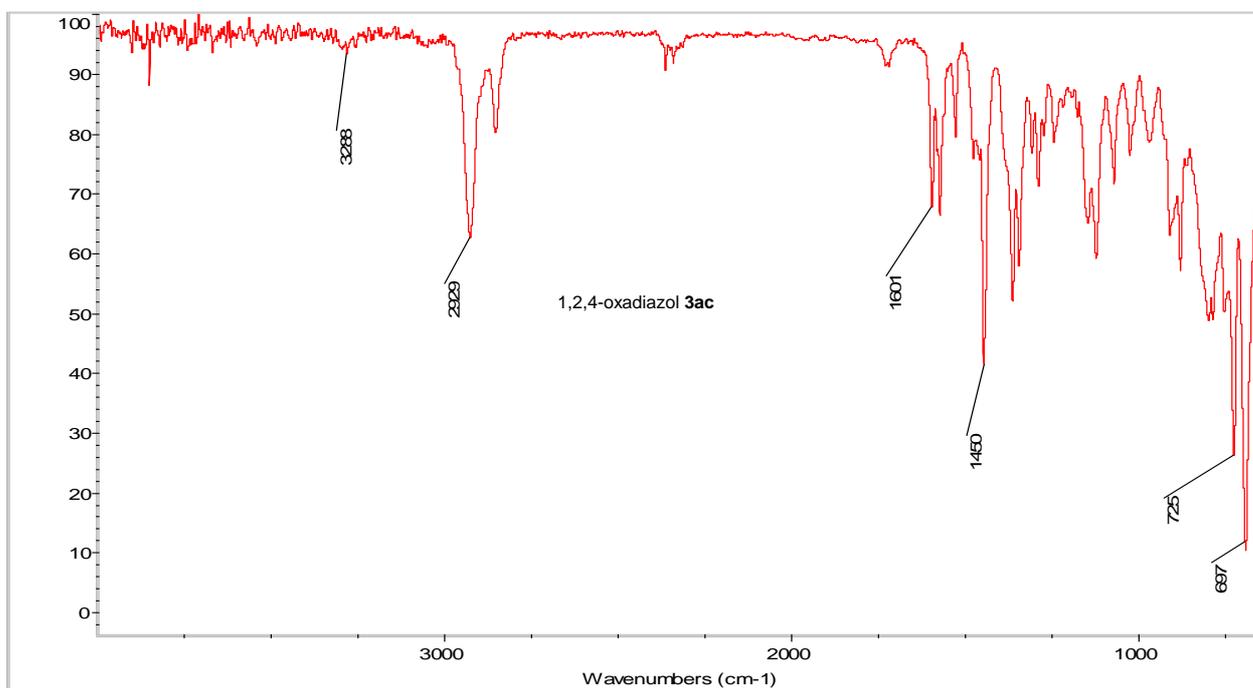
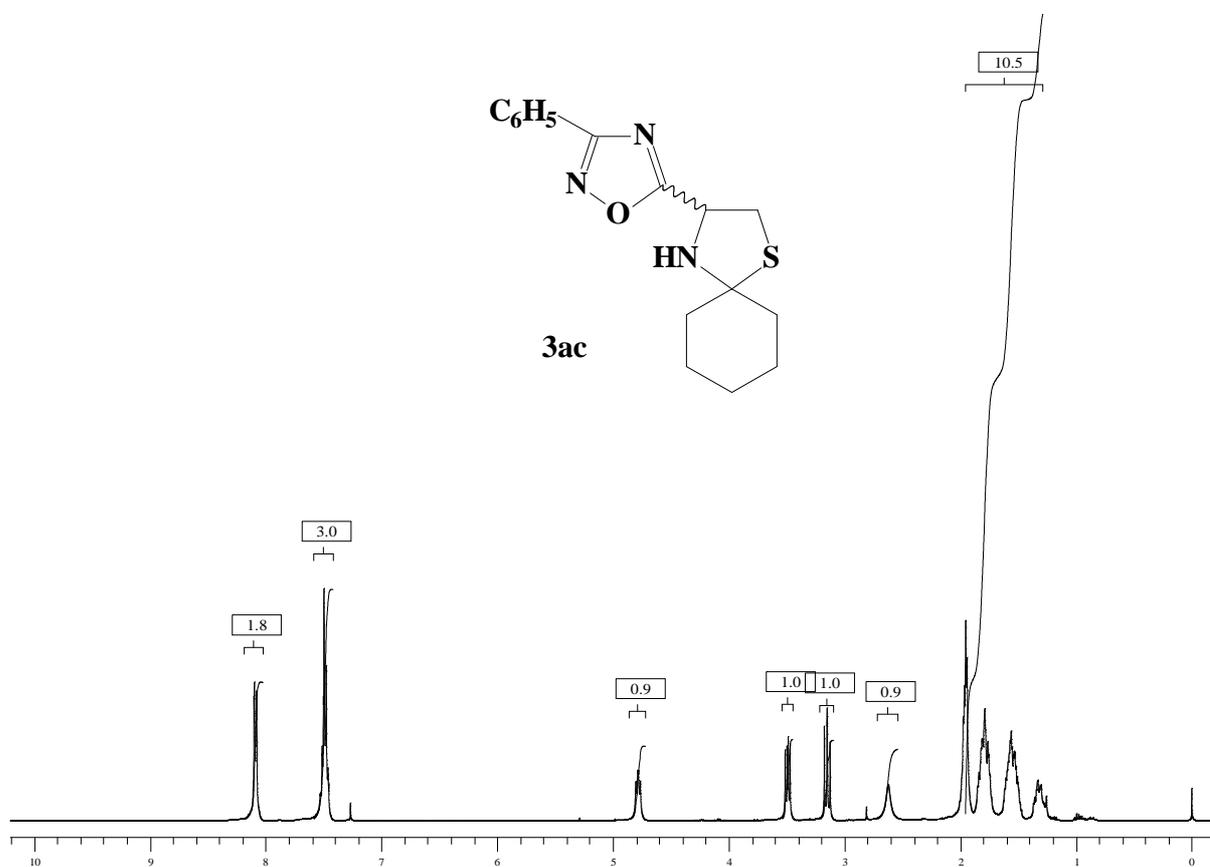
ANEXO K1 - Espectro de IV do 1,2,4-oxadiazol **3da** em KBr (drifts).ANEXO K2 - Espectro de RMN ¹H do 1,2,4-oxadiazol **3da** em CDCl₃.

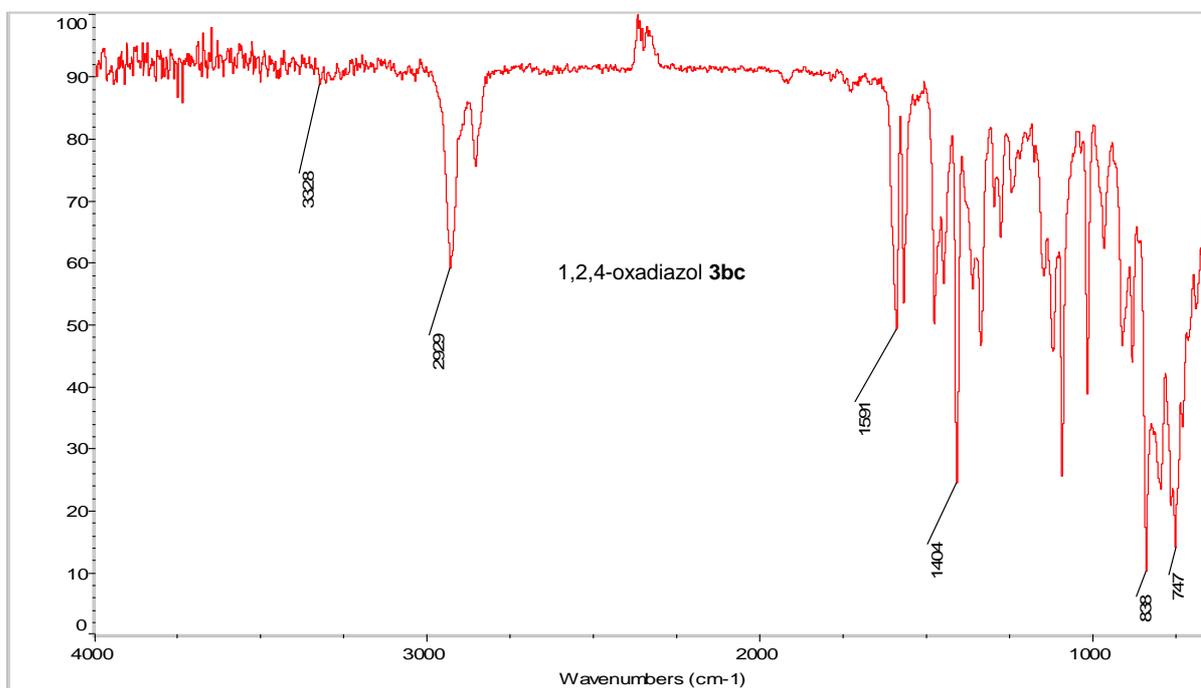
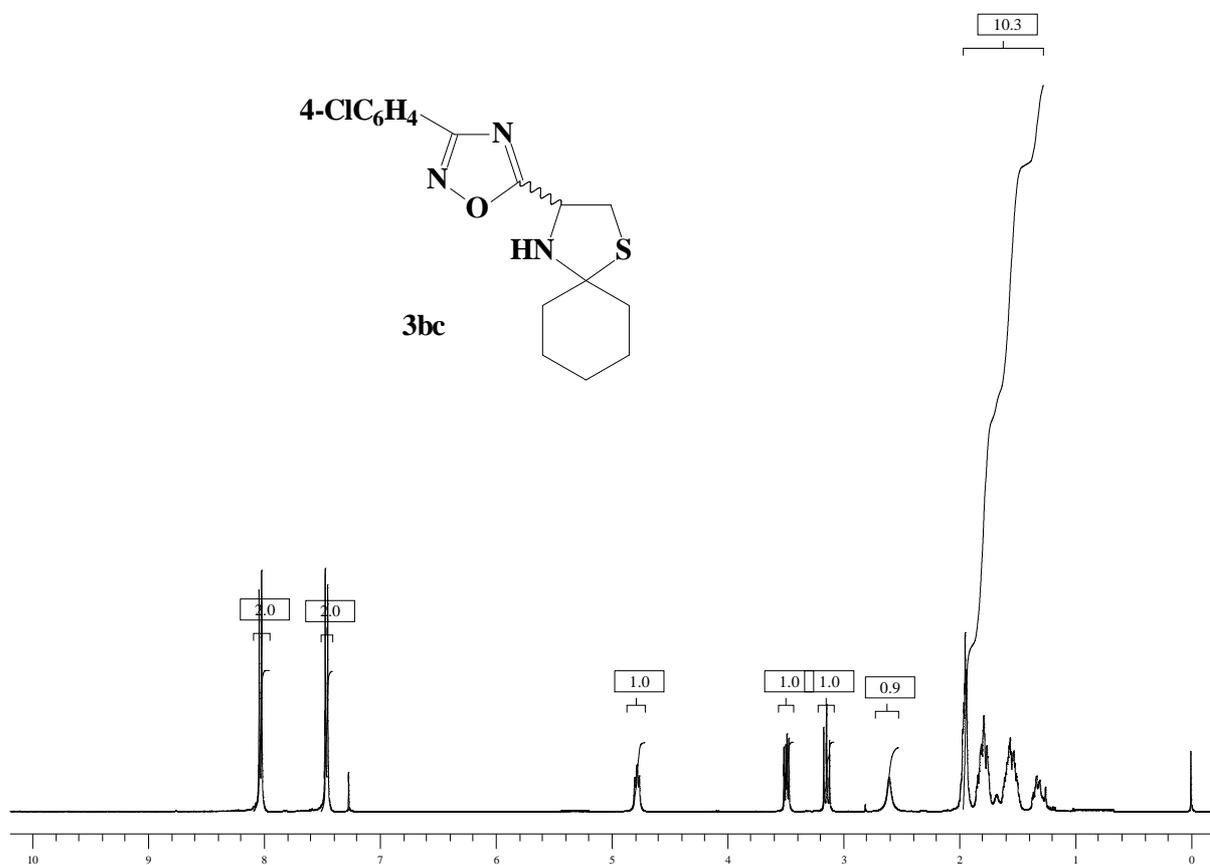
ANEXO L1 - Espectro de IV do 1,2,4-oxadiazol **3ab** (ATR).ANEXO L2 - Espectro de RMN ¹H do 1,2,4-oxadiazol **3ab** em CDCl₃.

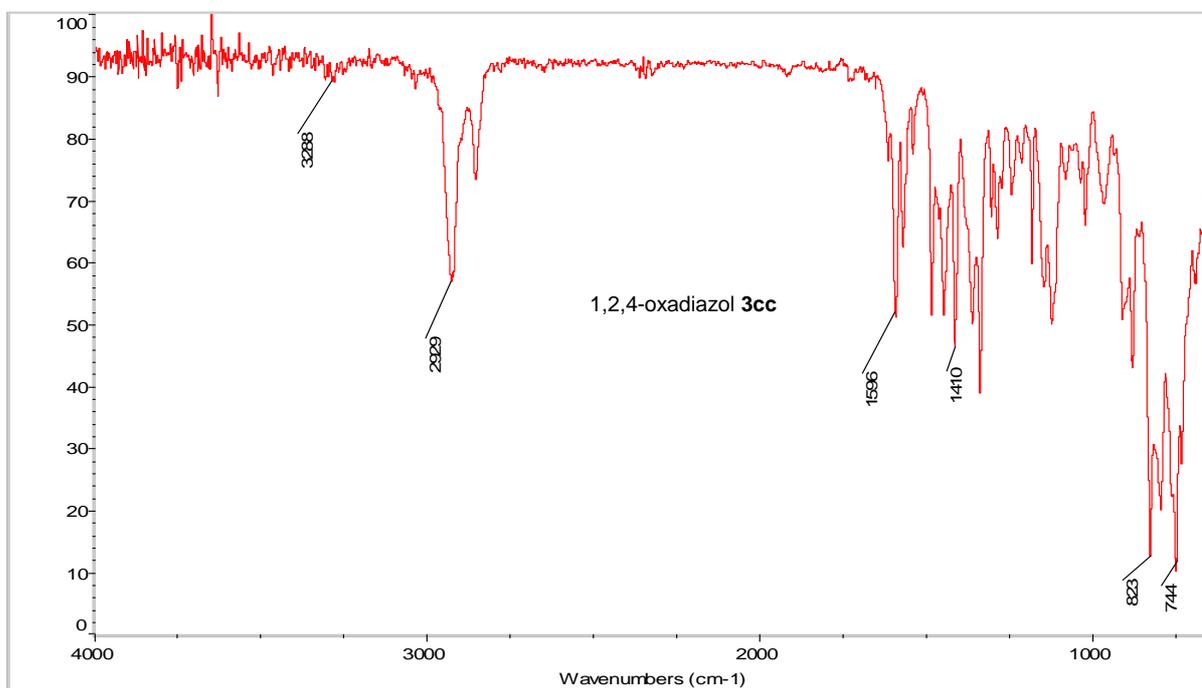
ANEXO M1 - Espectro de IV do 1,2,4-oxadiazol **3bb** (ATR).ANEXO M2 - Espectro de RMN ¹H do 1,2,4-oxadiazol **3bb** em CDCl₃.

ANEXO N1 - Espectro de IV do 1,2,4-oxadiazol **3cb** (ATR).ANEXO N2 - Espectro de RMN ¹H do 1,2,4-oxadiazol **3cb** em CDCl₃.

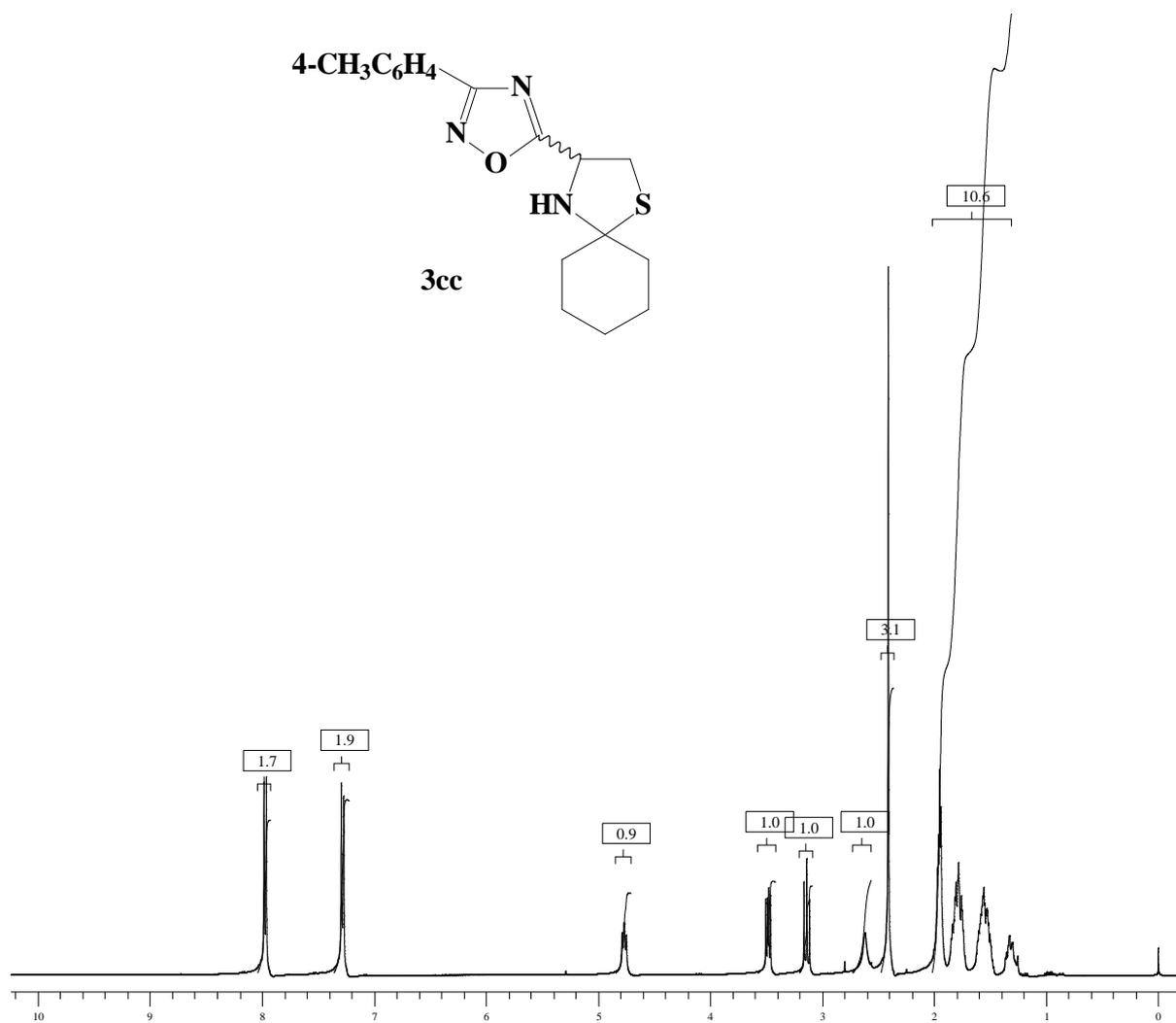
ANEXO O1 - Espectro de IV do 1,2,4-oxadiazol **3db** em KBr (drifts).ANEXO O2 - Espectro de RMN ¹H do 1,2,4-oxadiazol **3db** em CDCl₃.

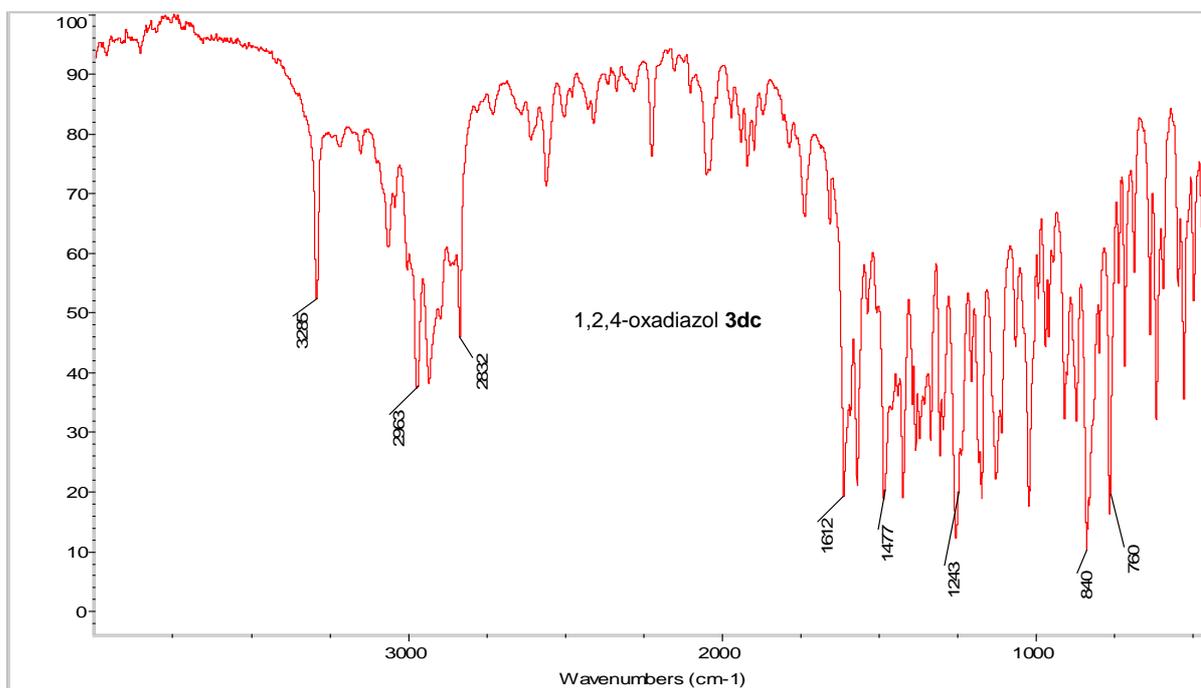
ANEXO P1 - Espectro de IV do 1,2,4-oxadiazol **3ac** (ATR).ANEXO P2 - Espectro de RMN ¹H do 1,2,4-oxadiazol **3ac** em CDCl₃.

ANEXO Q1 - Espectro de IV do 1,2,4-oxadiazol **3bc** (ATR).ANEXO Q2 - Espectro de RMN ¹H do 1,2,4-oxadiazol **3bc** em CDCl₃.

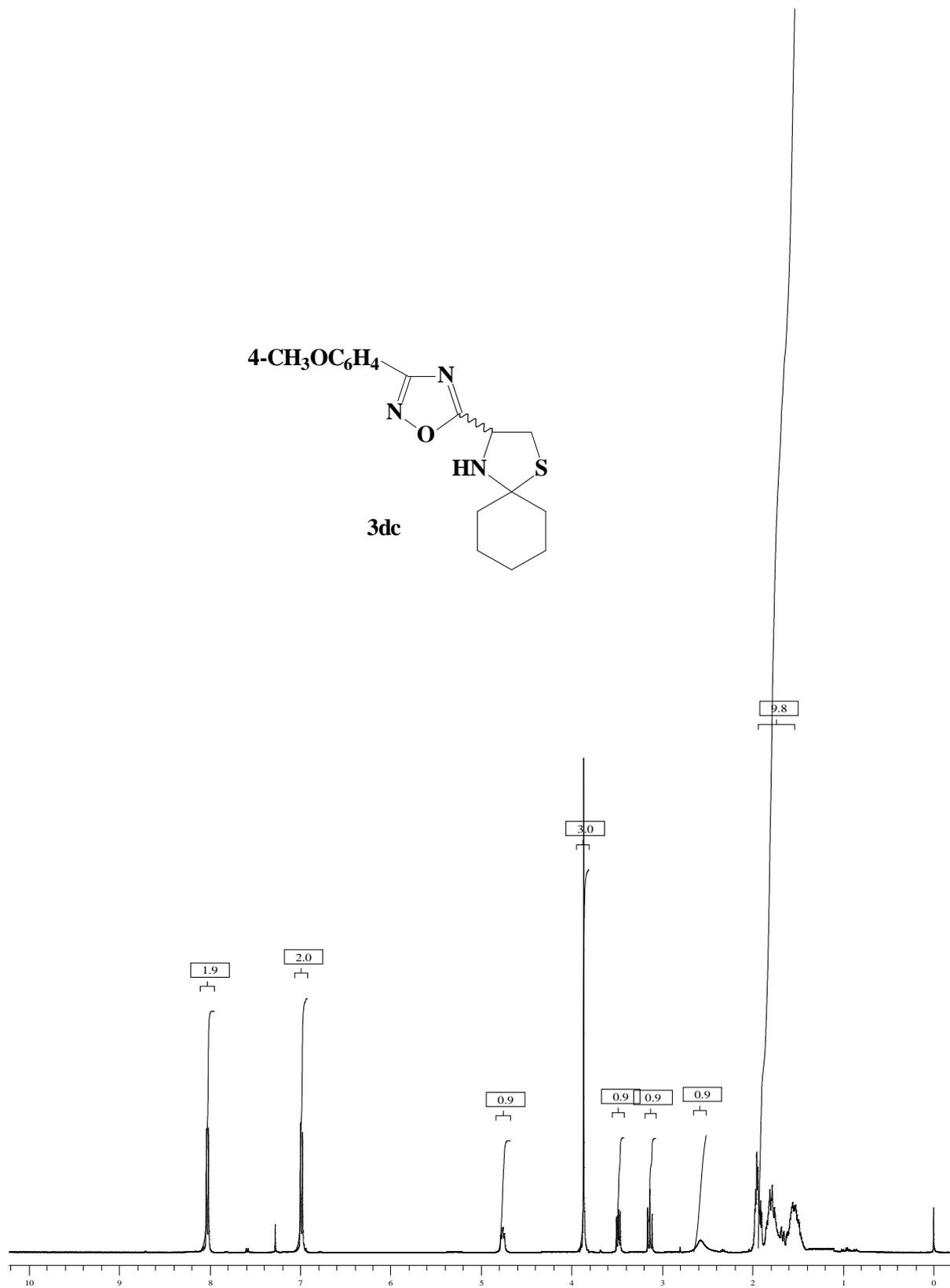
ANEXO R1 - Espectro de IV do 1,2,4-oxadiazol **3cc** (ATR).

ANEXO R2 - Espectro de RMN ^1H do 1,2,4-oxadiazol **3cc** em CDCl_3 .



ANEXO S1 - Espectro de IV do 1,2,4-oxadiazol **3dc** (ATR).

ANEXO S2 - Espectro de RMN ^1H do 1,2,4-oxadiazol **3dc** em CDCl_3 .



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)