



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA**



**RYAN HENRIQUE GOMES DA SILVA**

**SÍNTESE E *DOCKING* MOLECULAR DE 1,2,4-OXADIAZOL COMO POTENCIAL  
AGENTE ANTIOXIDANTE**

RECIFE

2024

RYAN HENRIQUE GOMES DA SILVA

**SÍNTESE E *DOCKING* MOLECULAR DE 1,2,4-OXADIAZOL COMO POTENCIAL  
AGENTE ANTIOXIDANTE**

Monografia apresentada ao departamento de química, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE – Campus de Recife como um dos requisitos para obtenção do título de licenciado em química.

Área de atuação: Ensino de ciências e química/química orgânica.

Orientador: Prof. Dr. João Rufino de Freitas Filho.

RECIFE

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Bibliotecário(a): Ana Catarina Macêdo – CRB-4 1781

S586s Silva, Ryan Henrique Gomes da  
Síntese e docking molecular de 1,2,4-oxadiazol como  
potencial agente antioxidante / Ryan Henrique Gomes  
da Silva. – Recife, 2024.  
67 f.; il.

Orientador(a): João Rufino de Freitas Filhos.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) –  
Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Licenciatura Plena em Química, Recife, BR-PE, 2024.

Inclui referências e apendice(s).

1. Antioxidantes 2. Radicais livres (Química)  
3. Estresse oxidativo I. Freitas Filhos, João Rufino de,  
orient. II. Título

CDD 540

RYAN HENRIQUE GOMES DA SILVA

**SÍNTESE E DOCKING MOLECULAR DE 1,2,4-OXADIAZOL COMO POTENCIAL  
AGENTE ANTIOXIDANTE**

Monografia apresentada ao departamento de química, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE – Campus de Recife como um dos requisitos para obtenção do título de licenciado em química.

Área de atuação: Ensino de ciências e química/química orgânica.

Aprovado em: 30/07/2024

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. João Rufino de Freitas Filho  
(Depto. de Química – UFRPE)  
Orientador

---

Jucleiton José Rufino de Freitas (UACSA – UFRPE)  
Primeiro Examinador

---

Lidiane Macedo Alves de Lima (Depto. de Química – UFRPE)  
Segundo Examinador

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre me guiando nessa longa caminhada da vida, em especial durante todo esse período de cinco anos de graduação.

A minha família, minha mãe Roseane, minha guerreira, que sempre me apoiou, me deu forças para continuar, minha irmã Rayse, por todo o apoio e conselhos, meu pai Severino, que mesmo distante, me deu forças para me ajudar nessa longa caminhada. E aos demais membros da família, obrigado pelo apoio.

Ao meu orientador, prof. Dr. João Rufino, por ter me ofertado a bolsa de iniciação científica da FACEPE, por me orientar durante esse período no laboratório, na apresentação da jornada científica, e o desenvolvimento deste trabalho de conclusão de curso.

A todos os professores do curso, por todos os ensinamentos e experiências passadas, em especial a profa. Dra. Flávia Guinhos, profa. Dra Maria José e profa. Dra Suely Alves. E os professores de química orgânica, prof. Dr. Cláudio, prof. Dr. Bogdan, prof. Dr Celso, prof. Dr. Clécio e o prof. Dr. André Liesen.

Aos professores Dr. Alex France, pelo auxílio com o *docking* molecular, e Dr. Luciano Azevedo, por disponibilizar o programa HyperChem. Ao doutorando Mabson Henrique, por realizar as atividades antioxidantes. Ao LPNBio. As centrais analíticas LABMAQ, CENAPESQ e do DQF. Aos órgãos de auxílio a pesquisa, FACEPE e CNPq.

A minha amiga e aluna de IC Catarina Santos, por me acompanhar em todo processo das sínteses. E aos amigos do LEQS, Caio, Gilton, Isaac, Matheus, Jonatas, Juliana, Dayseane, Daniele, Leonardo, Leandro, Fabrícia e André. Obrigado por todo apoio e companheirismo.

Aos meus amigos da graduação, Micherlane e José Gouveia, que estão comigo desde o primeiro período, obrigado por todo suporte. As minhas amigas Taís e Ana Gabriela, as quem tive prazer de conhecer durante esse tempo, obrigado por toda força. E aos meus amigos que conheci durante a graduação, Maria Eduarda, Beatriz, Emerson, Mikaeli, Edla, Erika, Raffael e os demais. Vocês são incríveis, muito obrigado.

“Superar é sempre possível!!! É acreditar no impossível, mesmo que as chances sejam mínimas!!”

(Lázaro Ramos)

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo sintetizar e caracterizar 1,2,4-oxadiazóis **29a-c**, e avaliar sob métodos *in vitro* e computacionais a sua capacidade antioxidante. Para isso, realizou-se a síntese de um importante precursor, as arilamidoximas **27a-c** sob o método de agitação magnética, obtendo excelentes rendimentos (84,9% – 95,7%). Em seguida, foi descrita a síntese dos 1,2,4-oxadiazóis **29a-c** sob um método livre de solvente, o qual não faz usos de solventes, bases ou sais, obtendo de baixos a moderados rendimentos (30,6% – 56,2%). E ainda, esses heterocíclicos foram caracterizados por IV, RMN de  $^1\text{H}$  e ponto de fusão. E assim, com a aplicação do teste de eliminação de radicais livres de DPPH $^{\bullet}$  e ABTS $^{\bullet+}$  verificou-se que, os 1,2,4-oxadiazóis apresentaram melhor resultado de redução desses radicais no método de ABTS $^{\bullet+}$  do que em DPPH $^{\bullet}$ , com destaque para o composto **29b** ( $\text{CE}_{50} = 4,055 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), que apresentou capacidades de eliminação de radicais livres promissoras muito semelhante ao antioxidante padrão o TROLOX ( $\text{CE}_{50} = 4,1 \mu\text{g.mol}^{-1}$ ), usado como controle positivo. Quanto aos procedimentos computacionais, utilizou-se o método de *docking* molecular para verificar a estabilidade energética e os tipos de interação dos complexos formados com os compostos **29a-c** e uma enzima pró-oxidante, a Xantina Oxidoreductase (PDB ID: 1N5X) que está envolvida no processo de liberado de superóxidos, logo, partindo dos cálculos de LGA do programa AutoDock 4.2.6, observou-se que os 1,2,4-oxadiazóis utilizados como ligantes formaram complexos estáveis com a enzima alvo, ressaltando o composto **29c** ( $\Delta\text{H} = -7,69 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ) que gerou um complexo com energia mais estável próximo do ligante inibidor original, Tei-6720 ( $\Delta\text{H} = -8,63 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ), indicando esses compostos como potenciais antioxidantes.

**Palavras-chaves:** 1,2,4-oxadiazol; Antioxidante; Radicais livres; *Docking* molecular; Estresse oxidativo.

## ABSTRAC

The present work aimed to synthesize and characterize 1,2,4-oxadiazoles **29a-c**, and to evaluate their antioxidant capacity using in vitro and computational methods. For this purpose, the synthesis of an important precursor, the arylamide oximes **27a-c**, was carried out using the magnetic stirring method, obtaining excellent yields (84.9% - 95.7%). Then, the synthesis of 1,2,4-oxadiazoles **29a-c** was described using the solvent-free method, which does not use solvents, bases or salts, obtaining low to moderate yields (30.6% - 56.2%). Furthermore, these heterocyclics were characterized by IR, <sup>1</sup>H NMR and melting point. Thus, with the application of the DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup> free radical scavenging test, it was found that the 1,2,4-oxadiazoles presented better results in reducing these radicals in the ABTS<sup>•+</sup> method than in DPPH<sup>•</sup>, with emphasis on compound **29b** (EC<sub>50</sub> = 4.055 μg.mL<sup>-1</sup>), which presented promising free radical scavenging capabilities very similar to the standard antioxidant TROLOX (EC<sub>50</sub> = 4.1 μg.mol<sup>-1</sup>), used as a positive control. Regarding the computational procedures, the molecular docking method was used to verify the energetic stability and the types of interaction of the complexes formed with compounds **29a-c** and a pro-oxidant enzyme, Xanthine Oxidoreductase (ID PDB: 1N5X), which is involved in the superoxide release process. Therefore, based on the LGA calculations of the AutoDock 4.2.6 program, it was observed that the 1,2,4-oxadiazoles used as ligands formed stable complexes with the target enzyme, highlighting compound **29c** (ΔH = -7.69 kcal.mol<sup>-1</sup>), which generated a complex with more stable energy close to the original inhibitor ligand, Tei-6720 (ΔH = -8.63 kcal.mol<sup>-1</sup>), indicating these compounds as potential antioxidants.

**Keywords:** 1,2,4-oxadiazole; Antioxidant; Free radicals; Molecular docking; Oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01.</b> Estrutura molécula de alguns antioxidantes naturais.....	19
<b>Figura 02.</b> Isômeros constitucionais dos oxadiazóis.....	20
<b>Figura 03.</b> Estrutura molecular dos heterocíclicos cristalizados em solvente orgânico.....	23
<b>Figura 04.</b> Estrutura e porcentagem de inibição do composto <b>22</b> sintetizado.....	24
<b>Figura 05.</b> Estrutura molecular dos flavona 1,2,4-oxadiazol <b>23a-o</b> .....	24
<b>Figura 06.</b> Estrutura molecular do composto <b>24a,b</b> e os valores de CE <sub>50</sub> .....	25
<b>Figura 07.</b> Estrutura molecular dos 1,2,4-oxadiazóis utilizados como ligantes.....	27
<b>Figura 08.</b> (A) forma de ligação 3D (em verde) e (B) diagrama 2D de <b>25a</b> , (C) modo de interação 3D (em ciano) e (D) diagrama 2D de <b>25c</b> no sítio ativo da NADPH oxidase (PDB ID: 1K4U).....	28
<b>Figura 09.</b> Estrutura cristalina da XOR (PDB ID: 1N5X).....	34
<b>Figura 10.</b> Espectro de IV do composto <b>26<sup>a</sup></b> (A) e do composto <b>27a</b> (B) por ATR.....	37
<b>Figura 11.</b> Espectro de IV do composto <b>29a</b> por ATR.....	40
<b>Figura 12.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (90 MHz) em CDCl <sub>3</sub> do composto <b>29a</b> .....	41
<b>Figura 13.</b> Sobreposição entre o ligante gerado pelo AutoDock (cinza) e o ligante original co-complexado com a enzima (amarelo), com RMSD de 0,34 Å.....	46
<b>Figura 14.</b> Interações do ligante original co-complexado (A) e o ligante gerado pelo programa (B), com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima.....	47
<b>Figura 15.</b> Interação do complexo XOR-ligante <b>29c</b> em visualização 3D (A) e 2D (B).....	49
<b>Figura 16.</b> Interação do complexo XOR-ligante <b>29b</b> em visualização 3D (A) e 2D (B).....	50
<b>Figura 17.</b> Espectro de IV do composto <b>27b</b> por ATR.....	62
<b>Figura 18.</b> Espectro de IV do composto <b>27c</b> por ATR.....	62
<b>Figura 19.</b> Espectro de IV do composto <b>29b</b> por ATR.....	63
<b>Figura 20.</b> Espectro de IV do composto <b>29c</b> por ATR.....	63
<b>Figura 21.</b> Interação do complexo XOR-ligante <b>29a</b> em visualização 3D (A) e 2D (B).....	64
<b>Figura 22.</b> Complexo LGA da enzima XOR e o ligante <b>29a</b> (em amarelo).....	64
<b>Figura 23.</b> Complexo LGA da enzima XOR e o ligante <b>29b</b> (em amarelo).....	65
<b>Figura 24.</b> Complexo LGA da enzima XOR e o ligante <b>29c</b> (em amarelo).....	65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01.</b> Classificação de alguns exemplos de espécies reativas de oxigênio (ERO).....	17
<b>Tabela 02.</b> Rendimento, tempo reacional e ponto de fusão dos compostos <b>27a-c</b> sintetizados.....	36
<b>Tabela 03.</b> Rendimentos, tempo reacional e ponto de fusão dos produtos <b>29a-c</b> sintetizados.....	39
<b>Tabela 04.</b> Atividade antioxidante ( $CE_{50}$ $\mu$ g/ml) dos compostos <b>29a-c</b> .....	43
<b>Tabela 05.</b> Compostos de 1,2,4-oxadiazóis na literatura que demonstraram resultados positivos para atividade antioxidante.....	45
<b>Tabela 06.</b> Energia de ligação e os tipos de interações para os complexos formados com os ligantes <b>29a-c</b> e o alvo XOR.....	48

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 01.</b> Rotas sintéticas gerias A e B da obtenção de 1,2,4-oxadiazóis 3,5-dissubstituído.....	21
<b>Esquema 02.</b> Obtenção de 1,2,4-oxadiazol 3,5-dissubstituído partindo de um $\beta$ -ceto éster.....	22
<b>Esquema 03.</b> Síntese de arilamidoximas a partir de arilnitrilas, sob o método de agitação magnética.....	31
<b>Esquema 04.</b> Síntese de 1,2,4-oxadiazol via arilamidoximas e acetoacetato de etila, sob o método <i>solvente-free</i> .....	32
<b>Esquema 05.</b> Proposta de mecanismo de reação da obtenção das arilamidoximas.....	38
<b>Esquema 06.</b> Proposta de mecanismo de reação de 1,2,4-oxadiazol partindo do éster acetoacetato de etila, sob o método <i>solvente-free</i> .....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABTS** - Ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
- ATR** - Reflexão Total Atenuada
- ATP** - Adenosina Trifosfato
- CE<sub>50</sub>** - Concentração Efetiva Média necessária para sequestrar 50% dos radicais
- CI<sub>50</sub>** - Concentração Inibitória para eliminar até 50% dos radicais livres
- CCD** - Cromatografia em Camada Delgada
- COX-2** - Ciclo-oxigenase-2
- DPPH** - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
- ERO** - Espécies Reativas de Oxigênio
- GSH** - Glutathiona reduzida
- IV** - Infravermelho
- LGA** - Algoritmo Genético Lamarckiano (do inglês, *Lamarckian Genetic Algorithm*)
- NADPH** - Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NOXs** - NADPH Oxidase
- Nrf2** - Fator Nuclear Eritróide 2
- PDB** - Banco de Dados de Proteínas (do inglês, *Protein Data Bank*)
- RMN de <sup>1</sup>H** - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1
- RMSD** - Desvio Padrão Médio da Raiz (do inglês, *Root Mean Standart Deviation*)
- t.a.** - Temperatura ambiente
- tBuOH** - *Terc*-butanol
- TEI-6720** - Ácido 2-(3-ciano-4-isobutoxil-fenil)-4-metil-5-tiazol-carboxílico
- TROLOX** - Ácido 6 hidraxi-2,5,7,8 tetrametilcromano-2-carboxílico
- UV-Vis** - Ultravioleta-Visível
- XOR** - Xantina Oxidoreductase

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>16</b>
2.1 ASPECTOS GERAIS DE ANTIOXIDANTES .....	16
<b>2.1.1 Radicais livres e estresse oxidativo</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1.2 Ação antioxidante</b> .....	<b>18</b>
2.2 1,2,4-OXADIAZOL .....	20
<b>2.2.1 Definição e propriedades farmacológicas</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2.2 Método de obtenção do 1,2,4-oxadiazol</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2.3 Atividade antioxidante</b> .....	<b>23</b>
2.3 DOCKING MOLECULAR .....	25
<b>2.3.1 Aspectos gerais do docking</b> .....	<b>25</b>
<b>2.3.2 Simulação contra enzimas pró-oxidantes</b> .....	<b>26</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>30</b>
4.1 MATERIAIS E INSTRUMENTOS .....	30
4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	31
<b>4.2.1 Síntese de arilamidoximas</b> .....	<b>31</b>
<b>4.2.2 Síntese de 1,2,4-oxadiazol</b> .....	<b>31</b>
4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	32
<b>4.3.1 Teste com radicais livres DPPH<sup>•</sup></b> .....	<b>32</b>
<b>4.3.2 Teste com radicais livres ABTS<sup>•+</sup></b> .....	<b>33</b>
4.4 PROCEDIMENTOS COMPUTACIONAIS .....	33
<b>4.4.1 Preparo do alvo e dos ligantes</b> .....	<b>33</b>
<b>4.4.2 Procedimento redocking</b> .....	<b>35</b>
<b>4.4.3 Docking molecular</b> .....	<b>35</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>
5.1 ARILAMIDOXIMAS .....	36
5.2 1,2,4-OXADIAZÓIS .....	39
5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	43

5.4 DOCKING MOLECULAR .....	46
5.4.1 Validação do método por <i>redocking</i> .....	46
5.4.2 Ancoragem receptor-ligante .....	47
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	52
7. PERSPECTIVAS .....	54
REFERÊNCIAS .....	55
APÊNDICES .....	62

## 1. INTRODUÇÃO

Os agentes antioxidantes são muito relevantes para a conservação da vida animal e vegetal, uma vez que, são bem aproveitados na indústria de alimentos, e também tem sido objeto de análises em várias áreas do conhecimento (Carrijo, 2023). Esses antioxidantes podem atuar de diversas formas para preservar as células contra a tensão oxidativa. Nessa perspectiva, podem doar elétrons aos radicais livres, causando a neutralização do estresse oxidativo impedindo que prejudiquem proteínas, lipídios, carboidratos, e entre outros compostos que atuam no organismo (Flieger *et al.*, 2021).

Os radicais livres são elementos residuais formados pelo organismo como consequência de ações metabólicas. A insuficiência do nosso corpo de aferir e retirar esses radicais em excesso com eficácia, pode ocasionar um estresse oxidativo que danifica as células e o funcionamento do organismo (Tian; Wang; Zhang, 2017). Esse processo pode gerar efeitos maléficos, como doenças degenerativas, cardíacas e crônicas (Ramos *et al.*, 2024; Oliveira; Souza, 2024). Além dos agentes antioxidantes atuarem no impedimento dessas doenças, eles podem recuperar outros agentes já oxidados, restabelecendo a sua atividade, e também, são capazes de modular sistemas de sinalização celular associadas ao estresse oxidativo e estimular a expressão de genes envolvidos da ação antioxidante (Flieger *et al.*, 2021).

É válido ressaltar a relevância de estudos sobre o papel da atividade antioxidante, que vem crescendo mais gradativamente nos últimos anos (Shahidi, 1996; Podsedek, 2007; Carrijo, 2023). Logo, nota-se uma busca progressiva por compostos que possuam atividade antioxidante, em especial compostos que apresentem grupos fenólicos, carotenoides, e vitamina A, C e E, os quais são aptos a agirem como inibidores dos radicais livres e suas reações oxidativas. Nesse sentido, os compostos heterocíclicos sintéticos podem atuar como agentes antioxidantes da mesma maneira que compostos naturais, devido a colaboração dessas substâncias na busca por novos fármacos, os quais podem ser sintetizados dado a fácil modificação em suas estruturas e apresentam um papel essencial para o metabolismo de células vivas (Menegatti; Fraga; Barreiro, 2001; Monteiro, 2021).

Dentre os variados compostos heterocíclicos, destacam-se os 1,2,4-oxadiazóis 3,5-dissubstituídos por serem utilizados tanto em indústrias na fabricação de polímeros, quanto na química medicinal. A biocompatibilidade e atividades farmacoterapêuticas do seu núcleo de cinco membros, contendo dois átomos de nitrogênio e um átomo de oxigênio, aumentando ações como atividade antifúngica (Krishna *et al.*, 2015), a antioxidante (Yatam *et al.*, 2018),

antiasmática (De Aguiar; Cunha, 2015), antimicrobiana (Freitas *et al.*, 2021), antitumoral (Reddy; Sreenivasulu; Raju, 2019), e entre outras (Pace; Pierro, 2009).

A literatura dispõe de alguns trabalhos que relatam a síntese de derivados de 1,2,4-oxadiazóis como potenciais agentes antioxidantes. O projeto de Yatam *et al.* (2018), consistiu na síntese de uma série de quinze 2-mercapto benzoxazol ligado a aril-(1,2,4-oxadiazol), os quais foram submetidos a um método de reação com a 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), afim de verificar as capacidades dos compostos de eliminarem radicais livres. Entre os oxadiazóis sintetizados, quatro apresentaram maior inibição de radicais livres, com concentração inibitória de eliminação de até 50% dos radicais livres (CI<sub>50</sub>) de 34,5 µM a 60,7 µM, além de porcentagens de inibição a 100 µM que variaram de 60,72% a 78,14%. Nesse caso, os autores concluíram que os oxadiazóis contendo os grupos nitro, flúor, metóxi e metilcarboxilato na posição *para* no fenil, apresentaram atividade antioxidante promissoras em testes com DPPH (Yatam *et al.*, 2018).

Outrossim, os mesmos autores também realizaram estudos de acoplamento molecular desses aril-1,2,4-oxadiazóis como potenciais inibidores de COX-2, que além da sua relação com causas inflamatórias, é uma enzima que possui um papel no desenvolvimento de tumores, por meio da oxidação de xenobióticos por exemplo, que consequentemente, acarreta no progresso de mutagênicos no organismo (Divvela; Challa; Tagaram, 2010). Dessa forma, após a realização do *docking* molecular, foi verificado que esses compostos podem exercer uma função significativa na seletividade do COX-2, uma vez que, apresentaram interações essenciais com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima (Yatam, *et al.*, 2018).

Por outro lado, o trabalho de Ayoup *et al.* (2021) dedicou-se à precaução do estresse oxidativo e da carcinogênese por meio da ativação indireta do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2). Para isso, os pesquisadores analisaram a capacidade antioxidante de derivados de 1,2,4-oxadiazóis como terapia do câncer, utilizando métodos que incluíam a eliminação de radicais livres de DPPH, quelantes de ferro com 1,10-fenantrolina e espécies reativas de oxigênio (ERO) intracelular. Os resultados indicaram que os compostos mais eficazes da série eram aqueles que apresentavam um grupo fenólico ligado diretamente ao anel heterocíclico. Considerando que, os radicais livres são os principais responsáveis pela carcinogênese e metástase, os oxadiazóis com fenóis dissubstituídos demonstraram resultados significativos na eliminação desses radicais nos testes realizados. Dessa forma, esses compostos possuem o potencial de inibir o desenvolvimento tumoral, devido à sua elevada capacidade de reduzir essas espécies radicais (Ayoup *et al.*, 2021).

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo realizar a síntese, caracterização estrutural, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e acoplamento molecular de 1,2,4-oxadiazóis 3,5-dissubstituídos partindo de um  $\beta$ -ceto-éster, obtido na sua forma comercial.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 ASPECTOS GERAIS DE ANTIOXIDANTES

#### 2.1.1 Radicais livres e estresse oxidativo

Para entender os processos de estresse oxidativo ocasionados pelo aumento de radicais livres no organismo, deve-se compreender inicialmente, que reações de oxirredução (redox) são ações metabólicas importantes que ocorrem nos sistemas biológicos, em que há uma transferência de elétrons de uma espécie molecular para outra, e dentre essas reações a molécula de oxigênio é utilizada para oxidação, e no fornecimento de energia na forma de ATP (Gulcin, 2012).

Em virtude disso, o oxigênio molecular é uma substância frequentemente incluída em ações enzimáticas e de processos redox nos organismos, onde atuam na transferência de elétrons, e desempenham um papel fundamental na vida aeróbica e no nosso metabolismo. O oxigênio é o último aceptor de elétrons no agrupamento de fluxos de elétrons que gera energia na forma de ATP (Elmastas *et al.*, 2018; Gulcin, 2020).

Entretanto, quando esse fluxo de elétrons se desfaz, o processo de transferência de elétrons únicos desemparelhados é interrompido, acarretando na formação de radicais livres. Sendo assim, os radicais livres são átomos, moléculas ou íons com elétrons desemparelhados, extremamente instáveis, muito reativos, gerados no interior das mitocôndrias como componente natural do seu metabolismo, e derivados geralmente de três elementos químicos, o oxigênio, o nitrogênio e o enxofre (Gulcin, 2020).

Dentre os exemplos, os radicais livres direcionados aos oxigênios são denominados como espécies reativas de oxigênio (ERO), que ocorrem no metabolismo celular de seres vivos, e também podem ser biomoléculas predominantes e nocivas a outras classes como os lipídios, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos (Cakmak; Gulcin, 2019; Martemucci, 2022). Existem algumas espécies de oxigênio radicalares e não radicalares (Tabela 01), que prejudicam as moléculas nos sistemas biológicos (Gulcin, 2020). Sendo assim, os organismos estão regularmente perceptíveis as ERO, que são ocasionados como subprodutos do metabolismo, da respiração, da auto-oxidação de xenobióticos, ou como consequências do estresse que conduz uma série de doenças (Anraku *et al.*, 2018).

**Tabela 01.** Classificação de alguns exemplos de espécies reativas de oxigênio (ERO).

<b>Classificação</b>	<b>Espécies reativas de oxigênio (ERO)</b>
<b>Espécies radicais</b>	Superóxido ( $\text{O}_2^\bullet$ ), hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ), hidroperóxil ( $\text{OOH}^\bullet$ ), peróxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ), peróxil lipídico ( $\text{LOO}^\bullet$ ), alcóxila ( $\text{RO}^\bullet$ ) e óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ).
<b>Espécies não-radicaais</b>	Peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), ozônio ( $\text{O}_3$ ), hidroxiperóxido lipídico ( $\text{LOOH}$ ), hipoclorito ( $\text{HOCl}$ ) e peroxinitrito ( $\text{ONOO}^\bullet$ ).

Fonte: Adaptado de Gulcin (2020).

Dessa maneira, os estresses oxidativos são causados pelo desequilíbrio entre as ERO e as defesas antioxidantes existentes nos sistemas biológicos. Esse estresse oxidativo desajusta um conjunto de funções celulares, provocando inúmeras condições patológicas, conduzindo às alterações oxidativas das biomoléculas decisivas como as supracitadas, além de lesões teciduais e morte celular acelerada, causando envelhecimento, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e crônicas como o câncer e Alzheimer (Sindhi *et al.*, 2013; Apak *et al.*, 2016; Gulcin, 2020; Martemucci, 2022).

Em suma, o estresse oxidativo é o resultado de dois meios principais: a redução da concentração de antioxidantes devido a modificação de enzimas antioxidantes que fazem parte da defesa nos organismos aeróbicos, toxinas e a diminuição no consumo de antioxidantes naturais; o aumento da quantidade de ERO decorrentes de fatores internos na mitocôndria por meio de peroxissomos, fagocitose, processos inflamatórios, atividades físicas e fatores externos como tabagismo, poluentes ambientais, pesticidas ou solventes industriais (Somogyi *et al.*, 2007; Gulcin, 2012; Gulcin 2020). Dessa maneira, a utilização de antioxidantes naturais ou sintéticos são empregados para minimizar as ações dessas espécies, uma vez que, podem ser oxidados no lugar de biomoléculas, anulando os efeitos prejudiciais dessas espécies reativas, ou evitando as suas formações (Kowalczyk *et al.*, 2021).

### 2.1.2 Ação antioxidante

Os antioxidantes são substâncias com a capacidade de inibição de oxidação de moléculas alvo, eliminando de forma direta as ERO, ou age de forma indireta no ajuste das defesas antioxidantes do organismo. Nesse sentido, os antioxidantes podem atuar na proteção dos sistemas biológicos contra radicais livres e dos efeitos das espécies reativas, por exemplo, podem deter o desenvolvimento de muitas doenças crônicas causadas por esses processos (Gulcin, 2020).

O próprio corpo humano dispõe de proteções antioxidantes naturais identificados como endógenos, que podem ocorrer via enzimática (alteração das espécies reativas por meio de uma sequência de reações) ou não-enzimáticas (impedido as reações em cadeia pela presença de radicais livres), anulando os efeitos negativos dessas espécies (Akdemir, *et al.*, 2016; Moussa; Judeh; Ahmed, 2019).

Dentre os exemplos de agentes antioxidantes endógenos, apresentam-se as seguintes enzimas e substrato: superóxido dismutase (SOD), a qual provoca a dismutação do radical  $\cdot\text{O}_2^-$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$  com a função de combater a hipertensão e lesão pulmonar; a catalase (CAT) decompõe  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água e oxigênio combatendo a cardiomiopatia e sepse; a ferritina que converte metais em quelatos, como o quelato de ferro, bloqueando reações com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , reduzindo os hidroperóxidos; a glutathione peroxidase (GPx), que também causa a decomposição de peróxidos para água, e quebra dos mesmos em lipídios, atuando na defesa de inflamações; e a glutathione reduzida (GSH) substrato da enzima GPx contribuindo na reestruturação das vitaminas C e E (Pisoschi *et al.*, 2021; Silva, 2023).

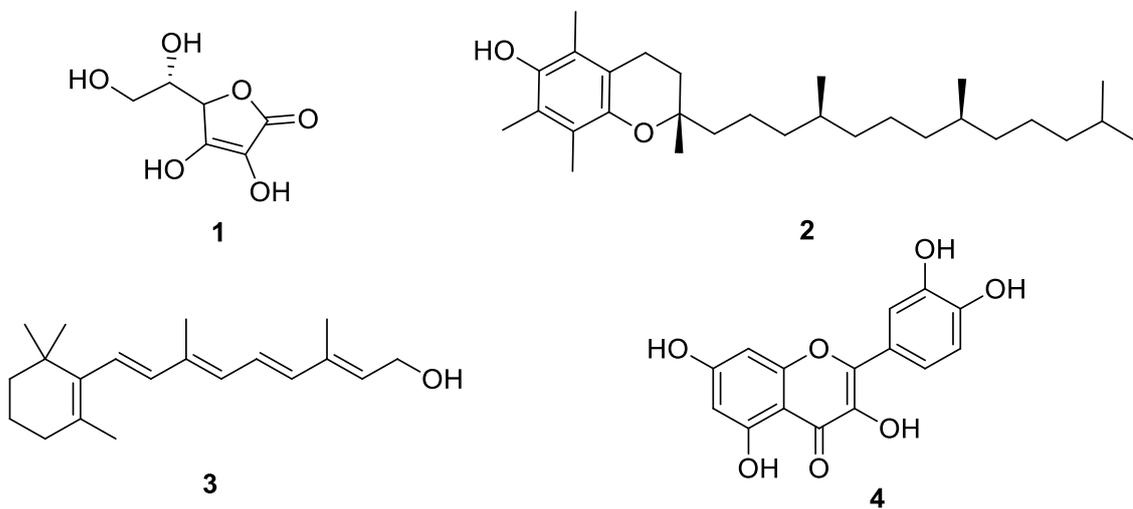
Apesar da existência dessas defesas dentro do organismo para a redução de espécies reativas, há também a aplicação dos antioxidantes exógenos com o intuito de amenizar as doenças patológicas geradas, em virtude de fatores externos já mencionados que aumentam a quantidade de ERO no corpo (Neha *et al.*, 2019).

Tendo em vista que, a atividade antioxidante produzida no organismo pode sofrer redução com o passar do tempo, assim, especialistas têm sugerido o consumo de alimentos saudáveis como frutas e vegetais, que possuem em sua composição, agentes antioxidantes naturais. Além disso, a ingestão de medicamentos desenvolvidos por esses compostos ou produzidos sinteticamente, uma vez que, são analisados devido a contribuição na atividade dos antioxidantes endógenos e estabilidade redox do corpo (Shils *et al.*, 2009; Stoia; Oancea, 2022).

De acordo com Carrijo (2023), as classes essenciais de antioxidantes naturais são as vitaminas (A, C e E), carotenoides (carotenos e xantofilas) e polifenóis (flavonoides, ácidos

fenólicos, lignanas e estilbenos). Na Figura 1 são apresentados os seguintes compostos: o ácido ascórbico **1** (vitamina C), onde atua no processo de redução dos cátions  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , são altamente oxidados pela maioria das ERO, e os produtos obtidos após o redox não são muito reativos; o  $\alpha$ -tocoferol **2** (vitamina E), opera contra a peroxidação lipídica, doando H para o radical peroxil devido a reatividade da região fenólica; o  $\beta$ -caroteno **3** (uma abundante forma de carotenoide e provitamina A natural), atuando na desativação da espécie  $^1\text{O}_2$  e retêm os radicais peroxil; e a quercetina **4** (um flavonoide, antioxidante polifenólico), agindo na doação de H, e é um forte eliminador de radicais livres (Neha *et al.*, 2019; Pisoschi *et al.*, 2021; Silva, 2023).

**Figura 01.** Estrutura molécula de alguns antioxidantes naturais.



Fonte: Autor, 2024.

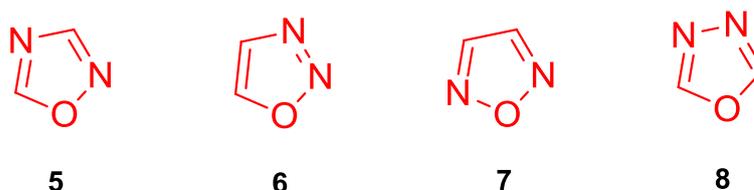
Embora esses compostos hajam de forma eficiente na proteção do organismo contra estresses oxidativos, encontra-se na literatura o desenvolvimento de pesquisas que buscam novos compostos ou derivados dos naturais com propriedades antioxidantes correlacionadas, devido a perspectiva de determinar novos sistemas de redução das ERO, considerando que as moléculas apresentadas acima são usadas em situações específicas, como descrito no parágrafo anterior. Nessa concepção, destaca-se os apresentados antioxidantes sintetizados em laboratórios, com o propósito de expandir seu campo de atuação na habilidade pretendida (Silva, 2023). Nesse contexto, os 1,2,4-oxadiazóis 3,5-dissubstituídos sintéticos podem apresentar capacidade antioxidante em diferentes testes biológicos.

## 2.2 1,2,4-OXADIAZOL

### 2.2.1 Definição e propriedades farmacológicas

Os sistemas de oxadiazóis são tidos na literatura como heterocíclicos de cinco membros composto por um átomo de oxigênio, dois de nitrogênio e dois de carbono, o qual apresenta pouco caráter aromático em razão da ligação dos dois heteroátomos, logo, sendo melhor retratado como um sistema conjugado. No geral, existem quatro isômeros constitucionais dos oxadiazóis, com a reorganização dos heteroátomos em sua estrutura, estes são o 1,2,4-oxadiazol (**5**), 1,2,3-oxadiazol (**6**), 1,2,5-oxadiazol (**7**) e o 1,3,4-oxadiazol (**8**) (Figura 02) (Freitas *et al.*, 2012; Regueira; Freitas; Filho, 2016).

**Figura 02.** Isômeros constitucionais dos oxadiazóis.



Fonte: Adaptado de Regueira, Freitas e Filho, 2016.

Vale ressaltar que, os compostos heterocíclicos podem apresentar uma vasta gama de atividades farmacológicas e por isso, continuam a gerar novos agentes farmacoterapêuticos. A atividade biológica desses sistemas é atribuída a sua capacidade de ligação com diversas enzimas, tanto no sítio ativo quanto nas estruturas de bolsas enzimáticas. Isso ocorre devido a ampla variedade de interações intermoleculares incluindo forças de Van Der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Dessa maneira, esses compostos são tidos como vínculos de coordenação, o que os torna um importante substrato na química medicinal (Pearce, 2017).

Assim, em determinados casos os 1,2,4-oxadiazóis são utilizados como componentes essenciais do grupo farmacóforo, auxiliando de forma direta para a interação da molécula com o sítio ativo de uma enzima. Em outras situações, esse heterocíclico é empregado como um ligante plano aromático para situar substituintes característicos da molécula na orientação apropriada. E ainda, esse composto quando posicionado na extremidade das substâncias, funciona como um articulador das propriedades biológicas (Bostrom *et al.*, 2012).

Todavia, os 1,2,4-oxadiazóis monosubstituídos são significativamente pouco estáveis que os dissustituídos. Esse último é capaz de suportar ácidos fortes, como o ácido sulfúrico

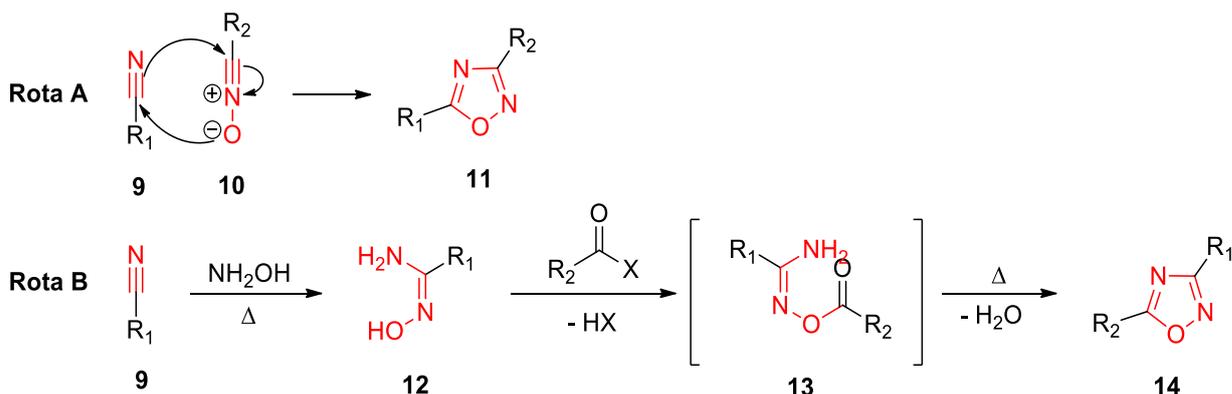
concentrado, e também bases fortes. Apesar das posições 3 e 5 serem passíveis a formação de 1,2,4-oxadiazol 3,5-dissubstituído por ataque nucleofílico, essas posições são quase inativas à substituição eletrofílica. Portanto, os dissubstituídos são os derivados mais frequentemente sintetizados (Atmaram; Roopan, 2022).

A partir disso, de acordo com Cunha e Aguiar (2015), os 1,2,4-oxadiazóis 3,5-dissubstituídos são correlacionados a diversas atuações terapêuticas, tais como antiasmática, antidiabética, anti-inflamatória, antimicrobiana, anticâncer, sobretudo, atividade antioxidante.

### 2.2.2 Método de obtenção do 1,2,4-oxadiazol

Os 1,2,4-oxadiazóis 3,5-dissubstituídos dispõem de duas rotas sintéticas clássicas apresentadas no Esquema 01, e descritas a seguir: **Rota A**) ocorre uma reação de cicloadição 1,3-dipolar de óxido de nitrila **10** à nitrilas **9**, formando o produto desejado **11**; **Rota B**) acontece a formação do intermediário amidoxima **12**, partindo da reação entre a hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) com a nitrila **9**, em seguida, processa-se a acilação para formação do intermediário *O*-acilamidoxima **13**, podendo ser isolada em determinados casos, após a ciclização, obtendo-se 1,2,4-oxadiazol **14** ao final do método (Santo; Santiago; Lima, 2018).

**Esquema 01.** Rotas sintéticas gerias A e B da obtenção de 1,2,4-oxadiazóis 3,5-dissubstituído.



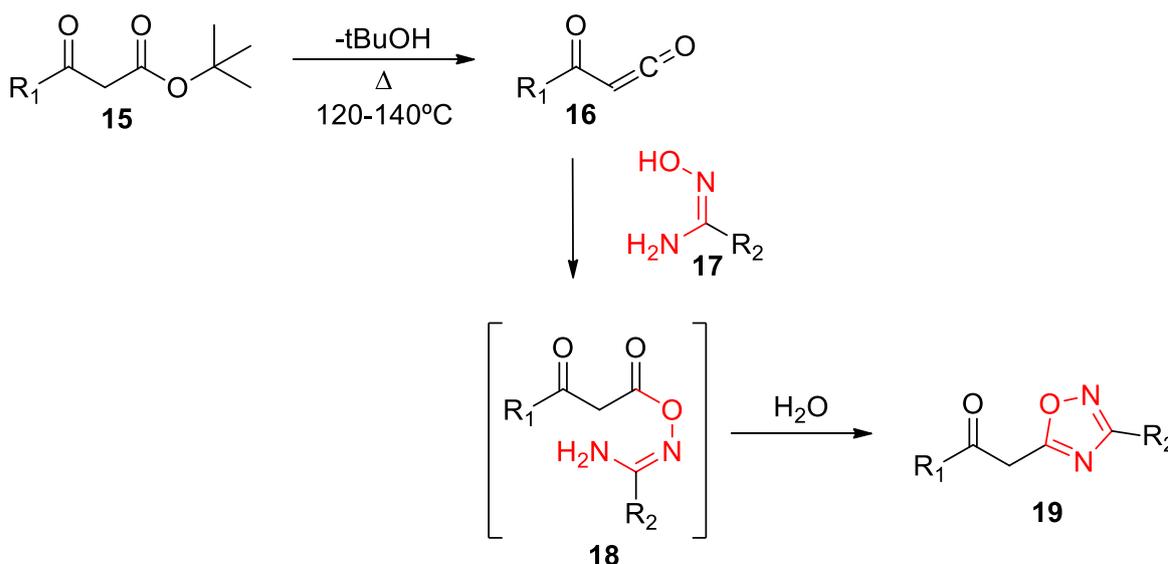
Fonte: Adaptado de Atmaram e Roopan, 2022.

Com base nisso, muitas das estratégias sintéticas utilizadas para a obtenção desse composto estão relacionadas a uma dessas duas rotas tradicionais. Esses meios empregados são tidos como variantes das rotas predominantes, assim, os pesquisadores fazem uso de diferentes agentes de acilação, catalizadores, agentes de acoplamento e até mesmo a *O*-acilação antecipada da amidoxima com o objetivo de suportar as condições de reação, contribuir na ciclização e

aumento do rendimento. Além disso, são frequentemente utilizados procedimentos mais ecológicos, que fazem uso dos meios de irradiação por micro-ondas ou ultrassom (Atmaram; Roopan, 2022).

Diante disso, verifica-se na literatura o desenvolvimento de sínteses mais eficientes desses compostos em uma única etapa, dentre os exemplos, o trabalho relatado por Du *et al.* (2007) faz uso da condensação de ésteres ou diésteres malônicos com amidoximas sob condições isentas de solvente ou base. Logo, os autores utilizam um  $\beta$ -ceto éster (o *tercbutil*- $\beta$ -ceto éster **15**) para *O*-acilação de amidoximas, uma vez que, sob condições térmicas os  $\beta$ -ceto ésteres sofrem uma eliminação de um álcool formando o intermediário  $\alpha$ -ceto ceteno **16**, o qual é altamente reativo e versátil no processo da síntese, usado para reagir com amidoxima **17** e gerar *O*-acilamidoxima **18**, obtendo o 5- $\beta$ -ceto-1,2,4-oxadiazol **19** com altos rendimentos de 84-100% (Esquema 02) (Du *et al.*, 2007).

**Esquema 02.** Obtenção de 1,2,4-oxadiazol 3,5-dissubstituído partindo de um  $\beta$ -ceto éster.



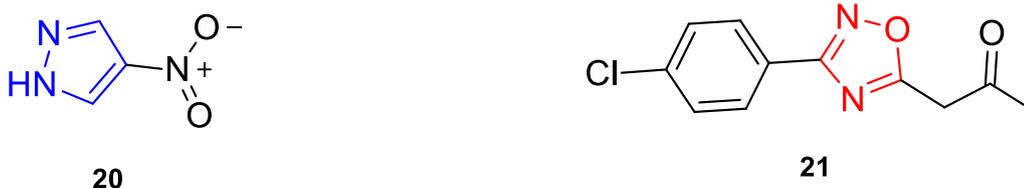
Fonte: Adaptado de Du *et al.*, 2007.

Sob essa perspectiva, os autores Silva *et al.* (2020) e Da Silva *et al.* (2020), realizaram a síntese de 1,2,4-oxadiazol 3,5-dissubstituído, onde reagiram 2,5 mmol de diferentes arilamidoximas e 3,9 mmol de um  $\beta$ -ceto éster, nesse caso o éster acetoacetato de etila, sob banho de óleo à uma variação de temperatura de  $120-140^\circ\text{C}$  durante um tempo de 2 a 5 horas, e após a reação e isolamento do produto por cromatografia em coluna, obtiveram excelentes rendimentos de 70% a 88% sem qualquer uso de solvente, base ou sal, sendo um procedimento denominado pelos autores como livre de solvente, do inglês *solvent-free*.

No entanto, há na literatura a existência de outros métodos de isolamento e purificação de compostos orgânicos além de cromatografia em coluna, como a cristalização de compostos heterocíclicos em solventes orgânicos, como o metanol, etanol, acetona e entre outros. Liu e Guo (2021) avaliaram a solubilidade e termodinâmica de cristalização de um outro composto heterocíclico, o 4-nitropirazol **20** em diferentes solventes orgânicos, devido a esse procedimento desempenhar um papel essencial na regulação e melhoria da morfologia cristalina do composto.

Enquanto que, o autor Silva (2020) utilizou metanol gelado para obter o composto [3-(4-clorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propan-2-ona **21** um dos 1,2,4-oxadiazóis sintetizados nesse trabalho. A formação dos cristais desse composto é resultado do resfriamento causado pela adição do solvente gelado na reação que foi aquecida, obtendo um rendimento de 85,47% do produto. As estruturas moleculares desses dois compostos são apresentadas na Figura 03.

**Figura 03.** Estrutura molecular dos heterocíclicos cristalizados em solvente orgânico.



Fonte: Autor, 2024.

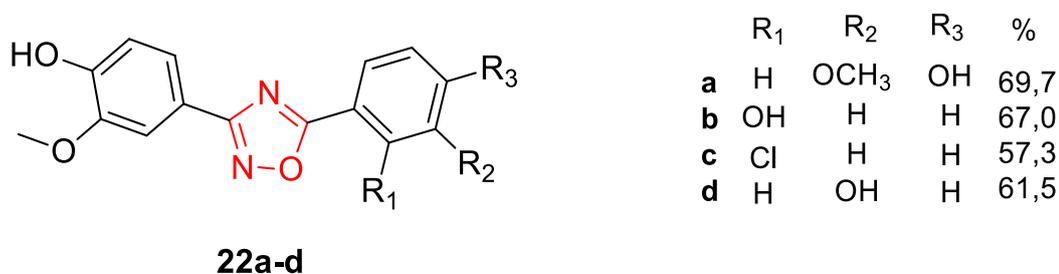
### 2.2.3 Atividade antioxidante

Diante do que foi relatado no item 2.1, a oxidação de biomoléculas como o DNA causada pela ação de radicais livres está associada ao desenvolvimento de algumas doenças. Logo, o efeito de inibição na oxidação dessas classes e a capacidade de deter radicais são os principais métodos de se avaliar o potencial de um antioxidante (Cunha; Aguiar, 2015). Os autores Zhao e Liu (2013) sintetizaram derivados de 1,2,4-oxadiazol para comparar as suas capacidades de eliminar os radicais livres e defesa do DNA contra a oxidação provocada por espécies oxidativas, para isso realizaram testes com oxidação induzidas por  $\cdot\text{OH}$  e  $\text{Cu}^{2+}/\text{GSH}$  contra o DNA e eliminação de DPPH e  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ .

Os autores concluíram que, um agente antioxidante com um núcleo ramificado deve-se pelo fato de que poucos grupos hidroxilas atuam de forma eficiente na proteção do DNA contra radicais os eliminando, e ainda um que possua o átomo de cloro indicou uma boa capacidade de inibição. Logo, os derivados de 1,2,4-oxadiazol **22a-d** apresentaram resultados significativos

nos testes realizados, como por exemplo, os estresses oxidativos no DNA (100%) causados por  $\cdot\text{OH}$ , foram reduzidos em 57,3 a 69,7% dependendo da distribuição dos substituintes nas ramificações (Figura 04) (Zhao; Liu, 2013).

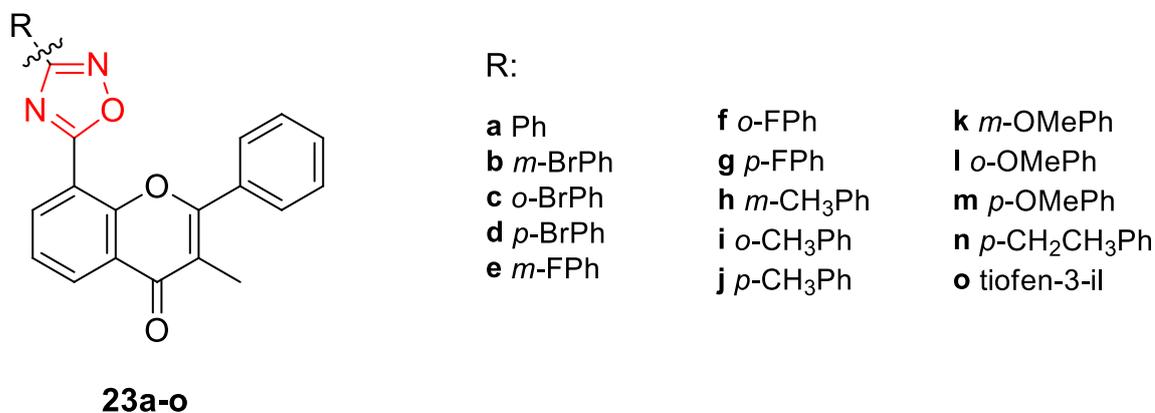
**Figura 04.** Estrutura e porcentagem de inibição do composto **22** sintetizado.



Fonte: Adaptado de Zhao e Liu (2013).

Sob outra perspectiva, Shen *et al.* (2023) realizaram a síntese de derivados de flavona 1,2,4-oxadiazol **23a-o** (Figura 05) e analisaram a relação estrutura atividade dos mesmos, para isso, avaliaram a capacidade antioxidante desses compostos em testes contra liberação de ERO e  $\text{NO}^\cdot$  induzidas por lipopolissacarídeos (LPS) em células BV2 ( $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Os autores constataram que os derivados **23b,c,d,f,g,h,i,n** apresentaram uma variação de 41,6% a 64,2% de inibição da produção de  $\text{NO}^\cdot$ , com destaque para o composto **23h** que apresentou a maior taxa de inibição dentro dessa faixa. Ademais, com exceção dos compostos **23k**, **23l** e **23m**, todos os outros derivados mostraram atividade inibitória significativa contra a produção de ERO.

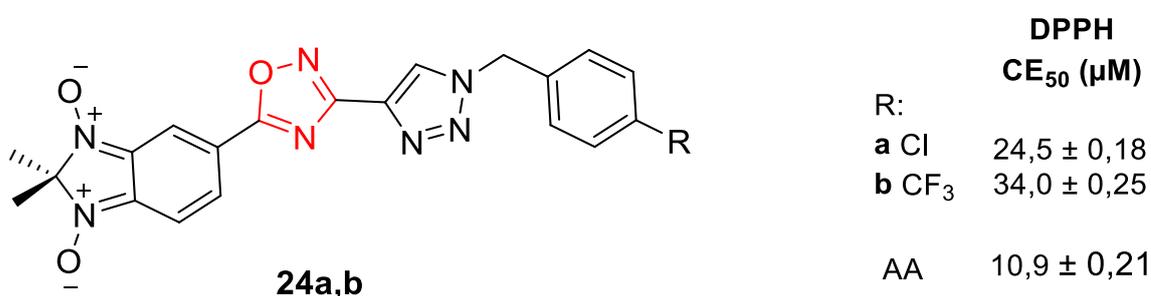
**Figura 05.** Estrutura molecular dos flavona 1,2,4-oxadiazóis **23a-o**.



Fonte: Adaptado de Shen *et al.* (2023).

Ainda por cima, o trabalho de Mayer *et al.* (2024) relatou a síntese e estudos das propriedades antioxidantes de benzofurano e de 2,2-dimetil-2H derivados de 1,3-dióxido de benzimidazol conjugados pelo sistema 1,2,3-triazol-1,2,4-oxadiazol. Assim, os autores realizaram ensaios de eliminação de radicais livres por análise UV-Vis de absorção usando DPPH<sup>•</sup> a 200 µg.mL<sup>-1</sup>, como resultado verificaram que os derivados **24a** e **24b** apresentaram melhor atividade próximo ao potencial de eliminação do ácido ascórbico (AA) usado como antioxidante de referência (Figura 06).

**Figura 06.** Estrutura molecular do composto **24a,b** e os valores de CE<sub>50</sub>.



Fonte: Adaptado de Mayer *et al.* (2024).

## 2.3 DOCKING MOLECULAR

### 2.3.1 Aspectos gerais do *docking*

O *docking* molecular é uma técnica fundamentada na afinidade de ligação entre um potencial ligante derivado de um protótipo e um alvo molecular (receptor), esse último podendo ser uma enzima ou um ácido nucléico. Dessa forma, esse procedimento computacional possui a capacidade de prever a interação, a energia de ligação, e também, caracterizar os modos de ligação. À vista disso, são inclusas duas etapas essenciais que abrangem a previsão da conformação e orientação do ligante, chamado de pose, e a avaliação da afinidade de ligação, o que permite preparar novos derivados com base nos resultados desse método, considerando a estrutura do receptor e do ligante estabelecido (Cavasotto; Aucar; Alder, 2019).

Para isso, diferentes programas foram desenvolvidos nos últimos anos para realização dessa técnica, dentre os mais utilizados estão o AutoDock 4, AutoDock Vina, GOLD e outros que são de acesso livre, e outros de acesso não-livre, ocorrendo mudanças nos parâmetros usados para cada um desses softwares (Silva, 2023).

Os procedimentos de acoplamento realizados nesses programas tornaram-se fundamentais no reconhecimento de novos fármacos, tendo em vista, o crescente progresso da biologia molecular e o aprimoramento de técnicas de cristalografia de raio-X, purificação de proteínas e espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Com base nisso, existem bancos de dados com estruturas moleculares, como exemplo o *protein data bank* (PDB), que disponibilizam estruturas cristalografadas por essas técnicas em formato 3D de diversos receptores biológicos, como proteínas e ácidos nucleicos a serem utilizados no *docking* (Meng, *et al.*, 2011).

Diante disso, esse trabalho utiliza o programa Autodock 4, o qual é constituído de uma espécie de caixa, chamada de *Grid Box*, com a finalidade de reduzir o custo digital, onde essa caixa é elaborada por meio de um pré-cálculo correspondente a energia de interação entre os átomos do receptor no sítio de ligação e do ligante, para que assim, o software determine a energia total dessa interação do complexo ligante-receptor formado (Kitchen *et al.*, 2004).

Esses parâmetros de cálculos do *docking* são definidos com base na físico-química, onde a estabilidade do complexo é dada em níveis de energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ), a qual refere-se à quantidade de energia livre no sistema que pode ser transformada em trabalho não-expansivo, e é resultado da contribuição de condições termodinâmicas como a variação de entalpia ( $\Delta H$ ), variação da entropia ( $\Delta S$ ), e a temperatura (T) (Equação 1) (Santos; Freitas, 2018).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

Dessa forma, quanto mais baixa for a energia de ligação, mais estável será o complexo formado, dado que, haverá pouca energia disponível para realização de trabalho cinético. Em razão disso, esse método de acoplamento molecular propõe orientações especiais do ligante de modo que potencializem essas interligações, para que a energia livre do sistema seja reduzida (Santos; Freitas, 2018). Além disso, o estudo de Fokoue *et al.* (2020) destaca diversas interações, como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, que podem ocorrer no complexo ligante-receptor formado na modelagem molecular, e também, são muito avaliadas na química medicinal no reconhecimento de substâncias como potenciais fármacos.

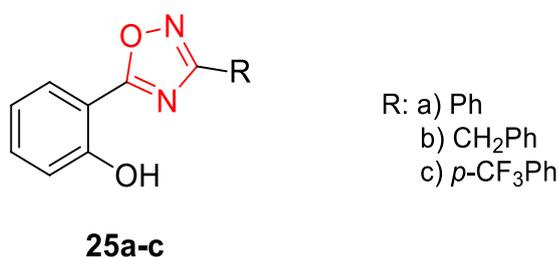
### 2.3.2 Simulação contra enzimas pró-oxidantes

A utilização do *docking* molecular neste estudo é aplicado utilizando a enzima pró-oxidante Xantina oxidoreductase (XOR) como receptor (Okamoto *et al.*, 2003), devido a essa e

mais enzimas estarem relacionadas com as causas de estresses oxidativos além das espécies reativas. Logo, a literatura dispõe de pesquisas voltadas para a análise dessas enzimas, por exemplo: Xantina oxidase (XOX), NADPH oxidase (NOXs), Mieloperoxidase (MPO), Lipoxigenase (LOX), Citocromo P450 (CP450) e entre outras (Silva, 2023).

Há poucos trabalhos na literatura que utilizam especificamente os 1,2,4-oxadiazóis como ligantes contra enzimas pró-oxidantes em estudos de acoplamento molecular. À vista disso, a pesquisa de Ayoup *et al.* (2021) avalia derivados de 1,2,4-oxadiazóis como ativadores de NrF2, o qual é importante para o interromper o sistema redox celular, eliminar ERO, diminuir estresse oxidativo impedindo progressão de câncer na célula. Assim, os autores realizaram o procedimento de *docking* molecular para os 1,2,4-oxadiazóis **25a-c** (Figura 07) que obtiveram os resultados mais promissores nos testes biológicos de atividade antioxidante. Para isso, utilizaram como alvo algumas enzimas, dentre elas a NADPH oxidase (PDB ID: 1K4U) que é responsável por catalisar a produção de  $\cdot\text{O}_2^-$  partindo de oxigênio e NADPH no sistema (Babior, 2004).

**Figura 07.** Estrutura molecular dos 1,2,4-oxadiazóis utilizados como ligantes.



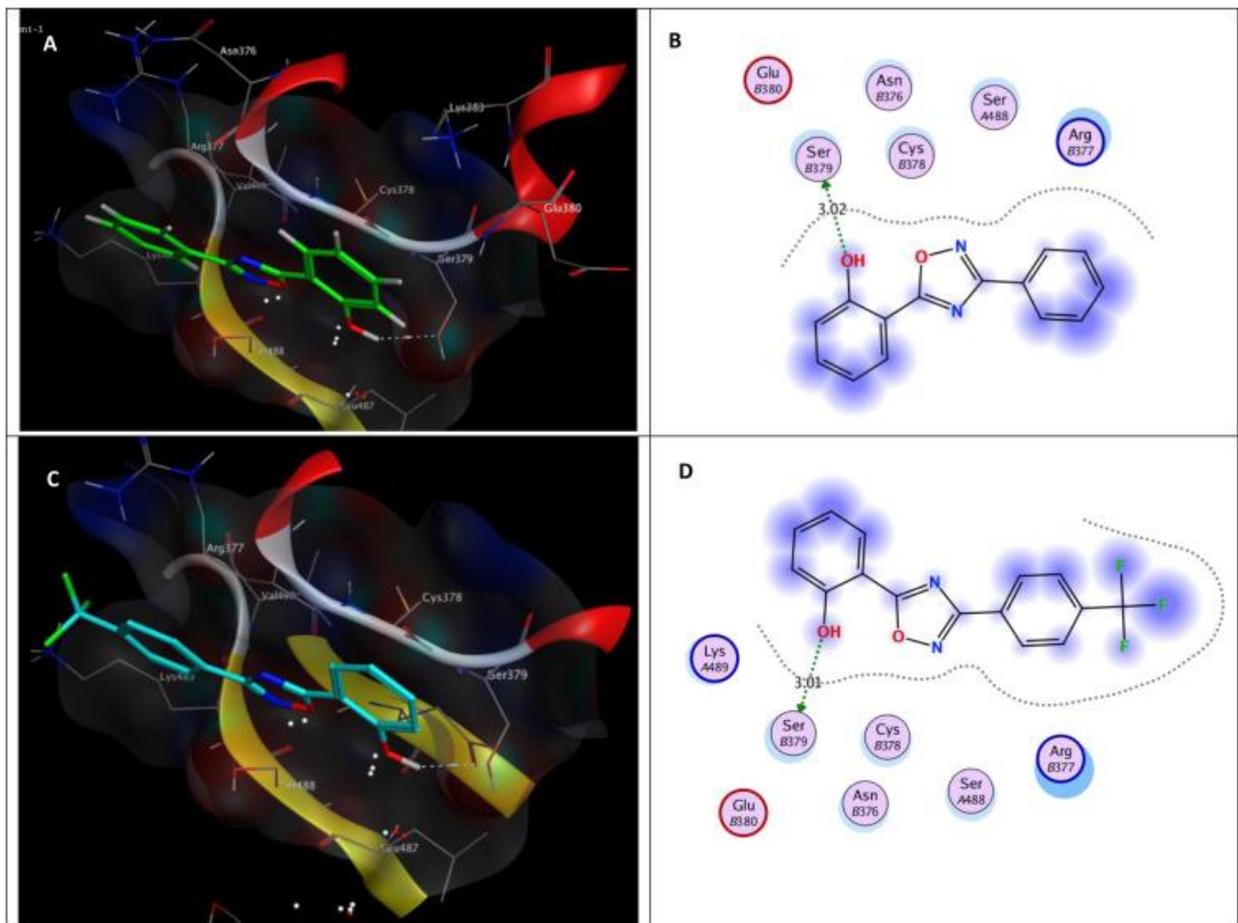
Fonte: Adaptado de Ayoup *et al.*, (2021).

Como resultado, os autores verificaram que os heterocíclicos **25a** e **25c** ofereceram interações de ligação de hidrogênio de comprimentos semelhantes com o resíduo de aminoácido serina 379, registrando energia de ligação mais pertinentes com valores de  $-4,62$  e  $-4,95$  kcal.mol<sup>-1</sup>, respectivamente. Porém, o composto **25b** perdeu algumas interações significativas, apresentando uma energia de ligação equivalente a  $-4,50$  kcal.mol<sup>-1</sup>, sendo menos favorável comparado aos outros dois. E ainda, os autores constataram que esses resultados de *docking* foram quase congruentes com os efeitos de inibição da NADPH oxidase, com os compostos **25a** e **25c** apresentando um alto potencial de inibição (Ayoup *et al.*, 2021).

Portanto, com base nos resultados obtidos, eles concluíram que foi possível prever que o grupo fenólico se envolve em interações fundamentais com a NOXs, o que pode contribuir para a capacidade antioxidante inerente do anel oxadiazólico, considerando-o um composto

essencial candidato a fármaco, nesse caso um potencial agente antioxidante, além de novas vias de estudos computacionais de inibição de enzimas pró-oxidantes, para um melhor entendimento da reatividade de inibidores como os 1,2,4-oxadiazóis (Ayoup *et al.*, 2021). A Figura 08 apresenta as interações e o modo de ligação dos compostos **25a,c** no complexo formado com NOXs.

**Figura 08.** (A) forma de ligação 3D (em verde) e (B) diagrama 2D de **25a**, (C) modo de interação 3D (em ciano) e (D) diagrama 2D de **25c** no sítio ativo da NADPH oxidase (PDB ID: 1K4U).



Fonte: Ayoup *et al.* (2021).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar, caracterizar e avaliar a atividade antioxidante e acoplamento molecular de 1,2,4-oxadiazol 3,5-dissubstituído.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar arilamidoximas partindo de arilnitrilas, sob o método convencional e agitação magnética;
- Sintetizar os 1,2,4-oxadiazóis pelo método livre de solvente, base ou sal, partindo de um  $\beta$ -ceto éster;
- Elucidar as estruturas dos compostos obtidos pelas análises no IV e RMN  $^1\text{H}$ ;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos 1,2,4-oxadiazóis sintetizados;
- Realizar os procedimentos de *docking* molecular utilizando uma enzima pró-oxidante.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 MATERIAIS E INSTRUMENTOS

Para a preparação dos compostos, os reagentes e solventes (etanol, metanol, clorofórmio e acetato de etila) utilizados foram obtidos na sua forma comercial, P.A., fornecidos pelas marcas Aldrich, Cinética, Merck e Vetec, sem nenhuma purificação adicional. Em relação às reações dos compostos, foram utilizados agitador magnético com aquecimento (TMA10R, 220V, 750W), balança analítica (BEL ENGINEERING), e evaporador rotativo a vácuo 10 L (SL - 126) - Solab para retirada do solvente da amostra.

As reações foram acompanhadas por CCD, onde foram empregadas placas prontas de sílica gel contendo indicador de fluorescência F<sub>254</sub>, da Macherey/Nagel (Düren, Alemanha). O solvente utilizado para eluição dessas placas, foi preparado o sistema de hexano/acetato de etila (7:3), e para revelação dos compostos foram usados a lâmpada de ultravioleta ( $\lambda = 254$  nm), revelador de permanganato de potássio e/ou os vapores de iodo. Os pontos de fusão dos compostos foram obtidos no instrumento Eletro-thermal série IA 9100 Digital Melting Point.

As amostras tiveram suas estruturas elucidadas por técnicas espectroscópicas de infravermelho (IV) a respeito dos seus grupos funcionais, e análises mais precisas como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H. Os espectros de IV foram obtidos por meio do equipamento espectrofotômetro de IV Varian modelo 640 FTIR por método de ATR. Para os espectros de RMN de <sup>1</sup>H, foram obtidos no equipamento Varian models Unity Plus (90 MHz) respectivamente, utilizando clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) como solvente e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

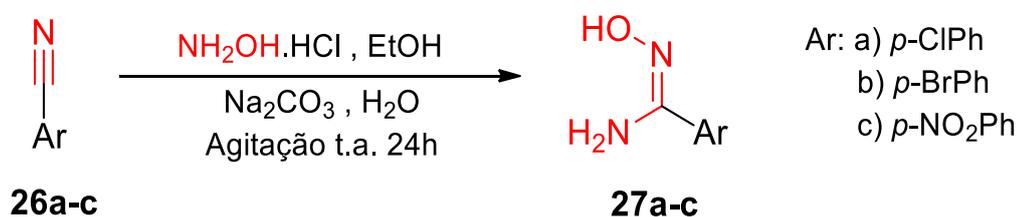
Para realização da atividade antioxidante, foram utilizados o equipamento de banho ultrassom (Ultronique, 25, 37 ou 40 kHz) e um dispositivo de UV-vis (Biochrom EZ Read 2000). E para os métodos computacionais, utilizou-se os programas HyperChem© (não-livre) e Avogadro© v. 1.2.0 para otimização da geometria e minimização de energia dos ligantes, AutoDock Tools v. 1.5.6 para tratamento do receptor, os softwares AutoDock 4.2.6, com os programas autodock4, autogrid4 e AD4.1\_bound.dat para realização dos cálculos de acoplamento e energia de ligação ( $\Delta H = \text{kcal.mol}^{-1}$ ) e o BIOVIA Discovery Studio Visualizer© para análise dos resultados de *docking* e *redocking* (validação do método).

## 4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 4.2.1 Síntese de arilamidoximas

As sínteses das arilamidoximas **27a-c** foram realizadas pelo método convencional proposto por Srivastava *et al.*, (2009) sob agitação magnética em temperatura ambiente (t.a.). De início, em um erlenmeyer foram adicionados cerca de 0,001 mol das arilnitrilas **26a-c**, e solubilizados em 25,0 mL de etanol (EtOH), em um outro erlenmeyer foram adicionados 0,003 (0,2085 g) mol de cloridrato de hidroxilamina (HCl.NH<sub>2</sub>OH) e 0,0015 mol (0,159 g) de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), e foram solubilizados em 25,0 mL de água destilada. Essa última solução preparada foi adicionada na solução que contém as arilnitrilas, e assim, essa mistura foi levada para a agitação magnética por um período de aproximadamente 24 horas a t.a. (Esquema 03). Após o tempo corrido, a formação do produto foi acompanhada por CCD com sistema de eluição hexano/clorofórmio (1:1).

**Esquema 03.** Síntese de arilamidoximas a partir de arilnitrilas, sob o método de agitação magnética.



Fonte: Adaptado de Srivastava *et al.* (2009).

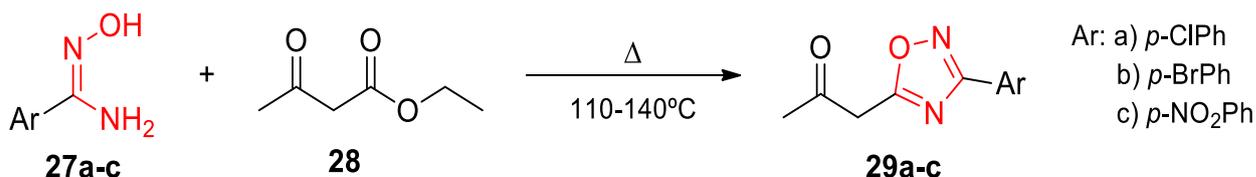
Em seguida, após a verificação da formação do produto e consumo dos reagentes, o solvente EtOH foi removido a pressão reduzida no rotaevaporador. Depois desse procedimento, o produto é precipitado a 0 °C, filtrado a vácuo, e por fim, recristalizado em clorofórmio e/ou clorofórmio:acetato de etila.

### 4.2.2 Síntese de 1,2,4-oxadiazol

As moléculas de 1,2,4-oxadiazóis **29a-c** foram sintetizados pelo método *solvente-free*, procedimento experimental baseado na proposta de Du *et al.* (2007), o qual foi realizado da seguinte forma: em um tubo de ensaio, adicionou-se 0,001 mol das arilamidoximas **27a-c** e 0,0015 mol do éster, acetoacetato de etila **28**, obtido na sua forma comercial e é utilizado por

ser  $\beta$ -ceto éster. Em seguida, a mistura foi levada a um banho de óleo de silicone pré-aquecido entre 110-140°C, assim, a reação ocorreu em sistema aberto dentro de um período de 3 a 4 horas (Esquema 04). A reação foi acompanhada por CCD em um sistema de eluição hexano/acetato de etila (7:3), e após o procedimento, adicionou-se cerca de 10,0 mL de metanol gelado no recipiente seguido de uma filtração comum, para obtenção do produto cristalizado.

**Esquema 04.** Síntese de 1,2,4-oxadiazol via arilamidoximas e acetoacetato de etila, sob o método *solvente-free*.



Fonte: Adaptado de Silva *et al.* (2020).

### 4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

#### 4.3.1 Teste com radicais livres DPPH<sup>•</sup>

Seguindo a metodologia descrita por Silva *et al.* (2006), foram preparadas soluções estoque dos heterocíclicos **29a-c** (0,2 a 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>) e da fração de etanol (9,8 a 2,0 mL) em diferentes concentrações de 10 a 500 µg.mL<sup>-1</sup> (0,01 a 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>). Em uma análise preliminar sem exposição a luz, transferiu-se volumes adequados das soluções estoque das amostras e 900 µL (0,9 mL) da solução de DPPH<sup>•</sup> para tubos eppendorf de 1,5 mL, e após a homogeneização, o volume foi completado com EtOH. Assim, as amostras foram submetidas à irradiação por ultrassom por 30 minutos e a quantidade de DPPH<sup>•</sup> foi medida utilizando UV-Vis a um comprimento de onda de 517 nm, em uma placa de 96 poços. O ácido ascórbico foi utilizado como antioxidante de referência, e todas as concentrações foram testadas em triplicata.

A partir disso, a eficiência antirradicalar foi determinada através da análise de regressão linear e o intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) obtido por meio do programa estatístico GraphPad Prism 9.0. Os resultados foram expressos através do valor da Concentração Efetiva média (CE<sub>50</sub>), o qual representa a concentração da amostra necessária para eliminar 50% dos radicais.

### 4.3.2 Teste com radicais livres ABTS<sup>•+</sup>

Esse teste foi realizado de acordo com o procedimento proposto por Re *et al.*, (1999). E, da mesma forma que descrito no item 4.3.1, as concentrações iniciais das soluções das amostras **29a-c** foram preparadas de 10 a 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (0,01 a 0,5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), com a adição de 900  $\mu\text{L}$  (0,9 mL) da solução radical ABTS<sup>•+</sup> e completando o volume de 1 mL com EtOH. Após homogeneização, as amostras foram postas sob irradiação de ultrassom por 7 minutos. Logo em seguida, a absorbância das amostras e o controle positivo foram medidos em um comprimento de onda de 734 nm no UV-Vis usando uma microplaca de 96 poços. Todas as concentrações foram testadas em triplicata, utilizando o composto Ácido 6 hidraxi-2,5,7,8 tetrametilcromano-2-carboxílico (TROLOX) como o antioxidante padrão.

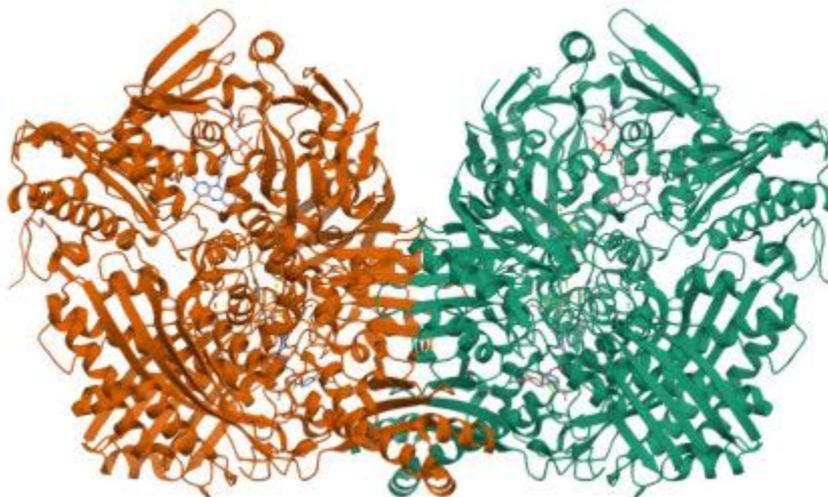
A eficiência antirradicalar foi estabelecida da mesma forma que descrita no subitem anterior.

## 4.4 PROCEDIMENTOS COMPUTACIONAIS

### 4.4.1 Preparo do alvo e dos ligantes

A princípio, para realizar os procedimentos computacionais selecionou-se a estrutura cristalográfica do receptor utilizado como macromolécula alvo no site *Protein Data Bank* RCSB (PDB) (<https://www.rcsb.org/>), foi utilizada a estrutura da enzima xantina oxidoreductase ou xantina desidrogenase de leite bovino, com o código PDB ID: 1N5X (Figura 09). A escolha dessa enzima é pelo fato dela está vinculada a uma série de fatores que acarretam na produção do radical superóxido ( $\cdot\text{O}_2$ ), e desempenha um papel importante no estresse oxidativo.

**Figura 09.** Estrutura cristalina da XOR (PDB ID: 1N5X).



Fonte: RCSB PDB.

Para os compostos de 1,2,4-oxadiazóis **29a-c** usados como ligantes, foram desenhados em formato 3D no software não livre HyperChem®, onde otimizou-se a geometria molecular submetendo os cálculos da mecânica molecular MM+ e o método semiempírica PM3 salvando em arquivo “.mol”.

E em seguida, utilizou-se o software freeware Avogadro®, e nesse programa utilizando o Campo de Força Molecular Merck 94 (MMFF94 do inglês, *Merck Molecular Force Field*) para mais uma otimização das geometrias dos ligantes, com o objetivo de que as suas energias sejam minimizadas para a obtenção de confômeros muito mais estáveis, e por fim, exportando o arquivo em formato “.pdb”.

Com os alvos e ligantes estabelecidos, a seguinte etapa é correspondente a preparação desses compostos, usando o AutoDock Tools para tratamento da macromolécula alvo XOR. Para tal, foram removidos os substratos tanto do lado A quanto do lado B da enzima, que não foram necessários pra o procedimento como os seguintes co-fatores: uma molécula de FAD e ácido fosfônico, dois compostos inorgânicos de ligação Fe-S, e um complexo de dióxido-tio molibdênio VI para não ocorrer problemas de execução dos cálculos do programa. E também, foi removido o ligante inibidor da enzima, o ácido 2-(3-ciano-4-isobutoxil-fenil)-4-metil-5-tiazol-carboxílico (Tei-6720) co-complexado na região do sítio ativo A e B. Adicionou-se a estrutura, átomos de hidrogênio polares e cargas de Kollman, exportando o receptor em formato “.pdbqt”. Quanto aos ligantes, apenas foi selecionado a opção de realizar o docking com zero torções das ligações não-rotacionáveis, exportando o arquivo também em formato “.pdbqt”.

#### 4.4.2 Procedimento *redocking*

Antes de realizar o acoplamento molecular com os ligantes estabelecidos, foi preciso realizar uma espécie de validação dos parâmetros definidos para *Grid Box*. Para isso, o sítio de ligação do alvo precisou ser identificado pelo software BIOVIA Discovery Studio Visualizer© para delimitação da área da caixa com os cálculos do AutoDock 4.2.6, assim, selecionou-se o ligante co-complexado TEI-6720 do lado A da enzima, com as seguintes coordenadas:  $x = 96.663455$ ,  $y = 54.963000$ ,  $z = 39.433409$ , com um espaçamento em angstrom de 0.375 e tamanho para caixa de  $x = 36$ ,  $y = 40$  e  $z = 40$ , com 10 rodadas estabelecidas.

A validação foi confirmada através da obtenção do Desvio Padrão Médio da Raiz (RMSD do inglês, *Root Mean Standart Deviation*) no Discovery Studio, em que é classificado como um bom RMSD entre a pose obtida pelo *redocking* e a pose original, quando o valor é menor que 2,0 Å (Alvarez; Costa; Vilarrasa, 2017).

#### 4.4.3 *Docking* molecular

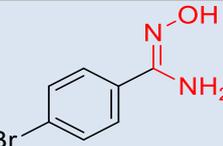
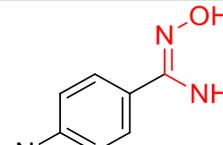
Com a validação confirmada, os ligantes foram inseridos no programa e para cada um deles, foram utilizados os parâmetros validados da *grid* exportando a caixa em formato 1.gpf, e para o cálculo de *docking* foi utilizado o Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA), que é o algoritmo de busca responsável por determinar as orientações e conformações dos ligantes no complexo dentro de 10 rodadas, o padrão do programa, e a função de pontuação baseado em campo de força, transferindo esse arquivo em formato 2.dpf. Para execução desses dados definidos utilizou-se os softwares autodok4, autogrid4, AD4.1\_bound.dat e o sistema Prompt de Comando (Windows®). Por fim, para as análises das interações previstas com os aminoácidos do sítio ativo do complexo proteína-ligante formado, foi utilizado o software Discovery Studio.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ARILAMIDOXIMAS

Com a realização da síntese de formação das arilamidoximas **27a-c**, a Tabela 02 apresenta os resultados de rendimento, tempo reacional e ponto de fusão obtidos para cada uma. Assim, pode-se observar que todas as arilnitrilas foram consumidas no tempo proposto para o procedimento, proporcionando rendimentos excelentes de 84,9% a 95,7%, demonstrando que todos os compostos **27a-c** não dificultaram o ataque nucleofílico ao carbono *sp* da nitrila, uma vez que, todas as três moléculas sintetizadas possuem fortes grupos retiradores de elétrons na posição *para* do anel aromático em relação ao grupo CN, o que favorece a ocorrência da reação devido ao efeito de redução da densidade eletrônica do anel e do carbono nitrílico, deixando-o mais favorável a sofrer um ataque nucleofílico, obtendo ao final da síntese, altos rendimentos do produto.

**Tabela 02.** Rendimento, tempo reacional e ponto de fusão dos compostos **27a-c** sintetizados.

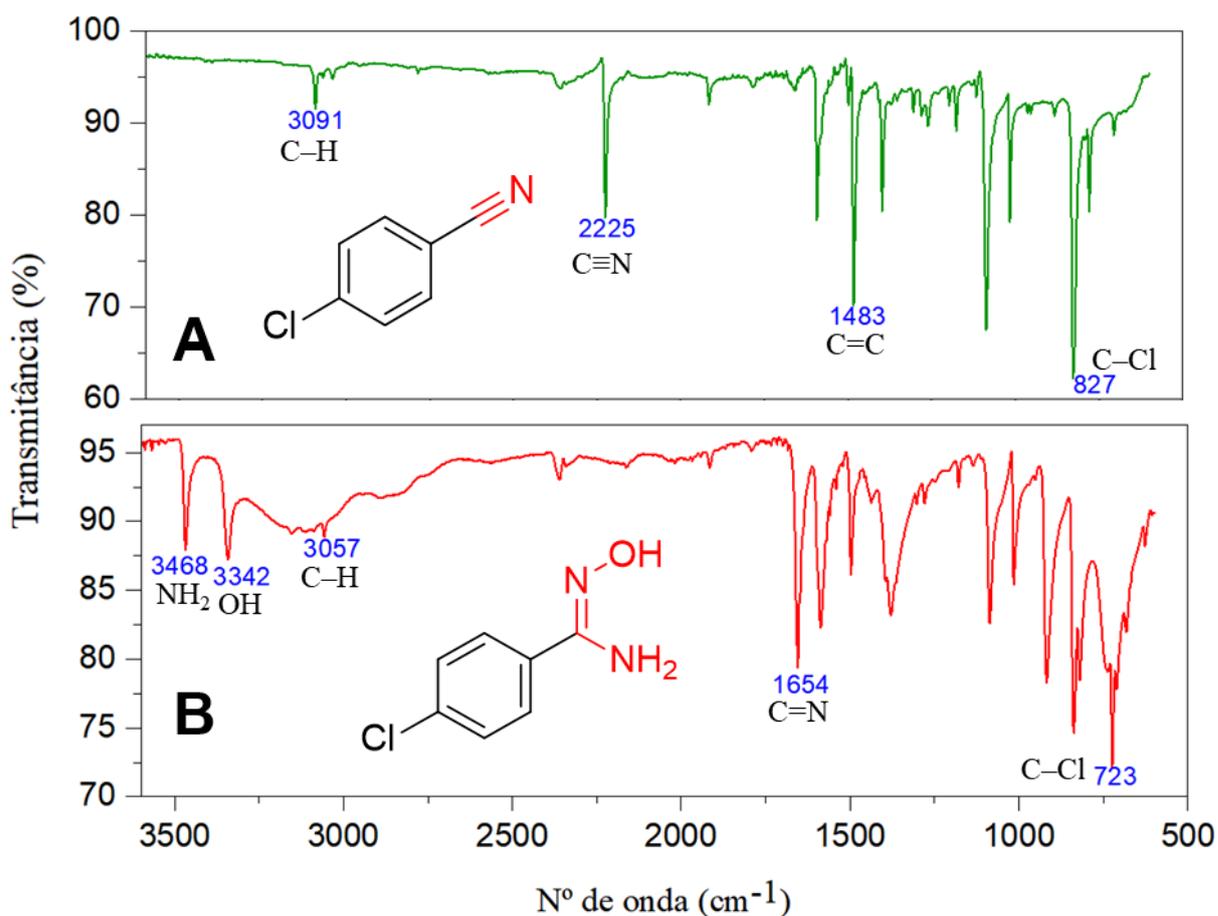
Arilamidoximas	Rendimento (%)	Tempo Reacional (h)	Ponto de Fusão (°C)
 <b>27a</b>	95,7	24	128 – 130
 <b>27b</b>	86,1	24	129 – 130
 <b>27c</b>	84,9	24	172 – 174

Fonte: Autor, 2024.

Em relação ao ponto de fusão de cada composto sintetizado, observa-se que a temperatura não variou mais que 2°C durante a fusão do estado sólido para o estado líquido das amidoximas, caracterizando-os como substâncias puras (Barreiros; Machado, 2010).

As estruturas das arilamidoximas foram elucidadas por espectroscopia de infravermelho, o qual apresentou os estiramentos das ligações mais características do produto. Mas antes, pode-se observar na Figura 10 (A) o espectro da arilnitrila **26a** o reagente limitante da reação, e esse espectro apresenta um estiramento em 2225 cm<sup>-1</sup> característico da ligação C≡N predominante em nitrilas, além disso, outros estiramentos podem fornecer outras ligações específicas do composto, como em 3091 cm<sup>-1</sup> referente a ligação C–H de carbonos *sp*<sup>2</sup> do anel aromático, 1483 cm<sup>-1</sup> correspondente a ligação C=C também do anel, e 827 cm<sup>-1</sup> referente a ligação C–Cl.

Figura 10. Espectro de IV do composto **26a** (A) e do composto **27a** (B) por ATR.



Fonte: Autor, 2024.

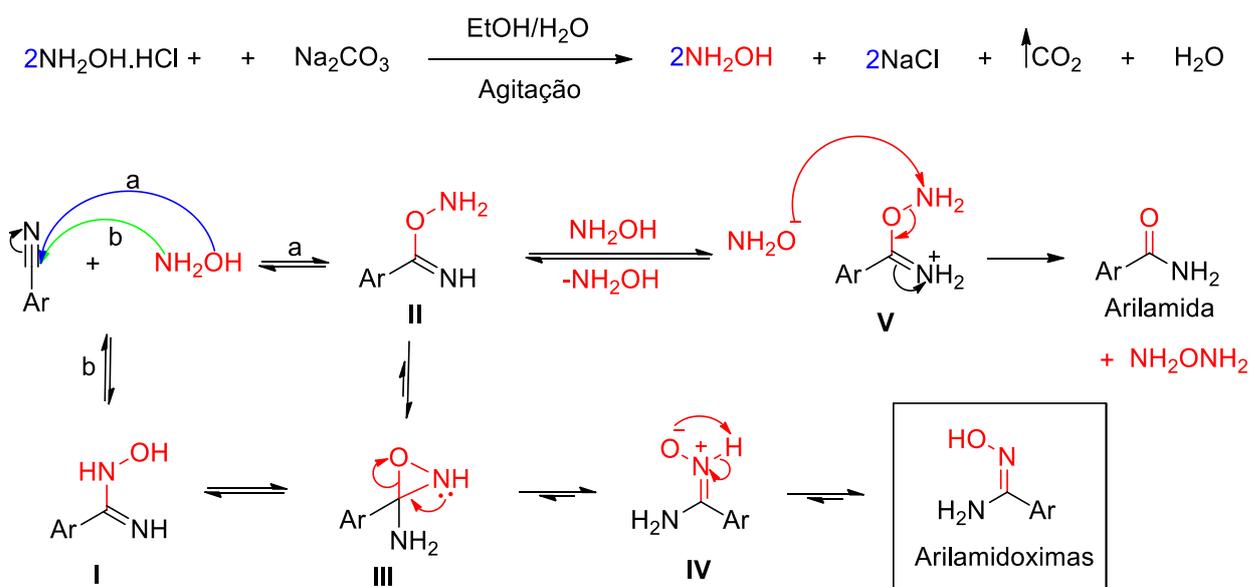
Logo, no espectro da arilamidoxima **27a** (Figura 10 B) é possível observar a ausência da banda em 2225 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento da ligação C≡N, o que implica no consumo

total da arilnitrila durante a reação. E também, ainda é possível observar o surgimento de outros estiramentos, como a banda em  $3468\text{ cm}^{-1}$  responsável pelo estiramento do grupo  $\text{NH}_2$ , a distensão em  $3342\text{ cm}^{-1}$  referente ao grupo  $\text{OH}$ , e uma absorção em  $1654\text{ cm}^{-1}$  correspondente as vibrações da ligação  $\text{C}=\text{N}$ , sendo todas essas distensões das ligações mais característicos da molécula **27a**, e para mais, as bandas em  $3057$  e  $723\text{ cm}^{-1}$ , referentes as ligações  $\text{C}-\text{H}$  do anel aromático e  $\text{C}-\text{Cl}$ , respectivamente.

Os espectros de IV dos compostos **27b** e **27c** estão apresentados no tópico de APÊNDICES ao final deste trabalho, e sugerem a formação dos compostos sintetizados.

Outrossim, é válido apresentar uma proposta do mecanismo de reação para a formação dessas arilamidoximas, com base na proposta descrita por Srivastava *et al.* (2009), em que o cloridrato de hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ ) é transformado em hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) pela ação de uma base ( $\text{NaHCO}_3$ ) ou como no nosso caso, um sal básico ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). E após a desprotonação, a hidroxilamina atua como um forte nucleófilo realizando o ataque no carbono eletrofílico da nitrila, tanto pelos pares de elétrons disponíveis do O (rota a) quanto do N (rota b), formando os intermediários **I** e **II**. Entretanto, o intermediário **II** não é tão estável quanto o intermediário **I** por questões de diferença de eletronegatividade entre os átomos, mas ambos podem sofrer a ação de um rearranjo intramolecular cíclico formando o intermediário **III**, que posteriormente, sofre tautomerização entre os intermediários **III** e **IV** formando assim, as arilamidoximas (Esquema 05).

**Esquema 05.** Proposta de mecanismo de reação da obtenção das arilamidoximas.



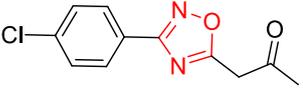
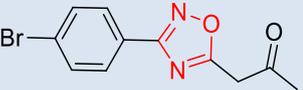
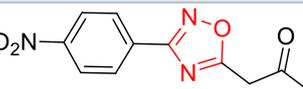
Fonte: Adaptado de Srivastava *et al.* (2009).

Porém, ainda no Esquema 05 observa-se a formação de arilamidas, recorrentes do excesso de hidroxilamina na reação.

## 5.2 1,2,4-OXADIAZÓIS

Os resultados referentes a síntese de obtenção dos 1,2,4-oxadiazóis **29a-c** estão apresentados na Tabela 03, obtendo de baixos a moderados rendimentos de 30,6% a 56,2% em um período de 3 à 4 horas de reação. O baixo rendimento desses oxadiazóis obtidos por cristalização em metanol gelado, difere do alto rendimento reportado no trabalho de Silva (2020). Isso pode ser atribuído a diversos fatores que influenciam a obtenção desses heterocíclicos durante o processo de purificação, como perda do produto durante a filtração e transferência do mesmo, questões de temperatura tanto da reação quanto do solvente utilizado, e a própria natureza do composto, onde há uma precipitação parcial no solvente escolhido. Assim, é necessário considerar o uso de outros solventes orgânicos para cristalizar esses 1,2,4-oxadiazóis de forma mais eficiente, conforme indicado o estudo de Liu e Guo (2021), que investigou a solubilidade e termodinâmica de cristalização de heterocíclicos.

**Tabela 03.** Rendimentos, tempo reacional e ponto de fusão dos produtos **29a-c** sintetizados.

1,2,4-oxadiazóis	Rendimento (%)	Tempo Reacional (h)	Ponto de Fusão (°C)
 <b>29a</b>	30,6	3	105 – 108
 <b>29b</b>	34,4	3	118 – 120
 <b>29c</b>	56,2	4	133 – 135

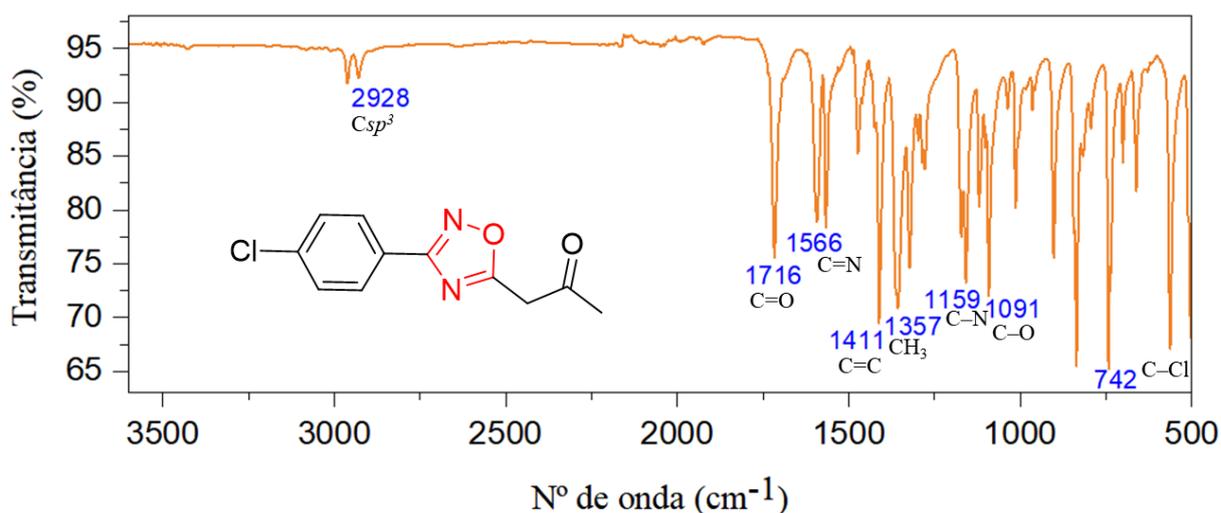
Fonte: Autor, 2024.

Ainda na Tabela 03, nota-se que os pontos de fusão dos compostos **29b** e **29c** não variaram mais que 2°C durante o procedimento, indicando um aspecto de pureza nos compostos

sintetizados. Entretanto, o composto **29a** variou mais que 2°C, indicando a presença de alguns resíduos que não foram totalmente removidos após a purificação.

A estrutura dos compostos **29a-c** foram caracterizadas por espectroscopia de IV. A partir disso, pode-se observar o espectro do composto **29a** na Figura 11, o estiramento em 1716  $\text{cm}^{-1}$  correspondente a ligação C=O de cetona presente na estrutura, as distensões em 1566  $\text{cm}^{-1}$ , 1411  $\text{cm}^{-1}$  e 1357  $\text{cm}^{-1}$  referentes as ligações C=N, C=C do anel aromático e CH<sub>3</sub>, respectivamente. Além disso, o estiramento em 1091  $\text{cm}^{-1}$  corresponde as ligações C–O, e em 1159  $\text{cm}^{-1}$  são relacionados as ligações C–N do anel oxadiazólico, e há outras bandas em 2928  $\text{cm}^{-1}$  e 742  $\text{cm}^{-1}$  as quais podem está associadas as ligações de carbono  $sp^3$  e C–Cl, respectivamente. Quanto aos espectros de infravermelho dos demais oxadiazóis **29b** e **29c**, estão apresentados no tópico de APÊNDICES no final deste trabalho.

Figura 11. Espectro de IV do composto **29a** por ATR.

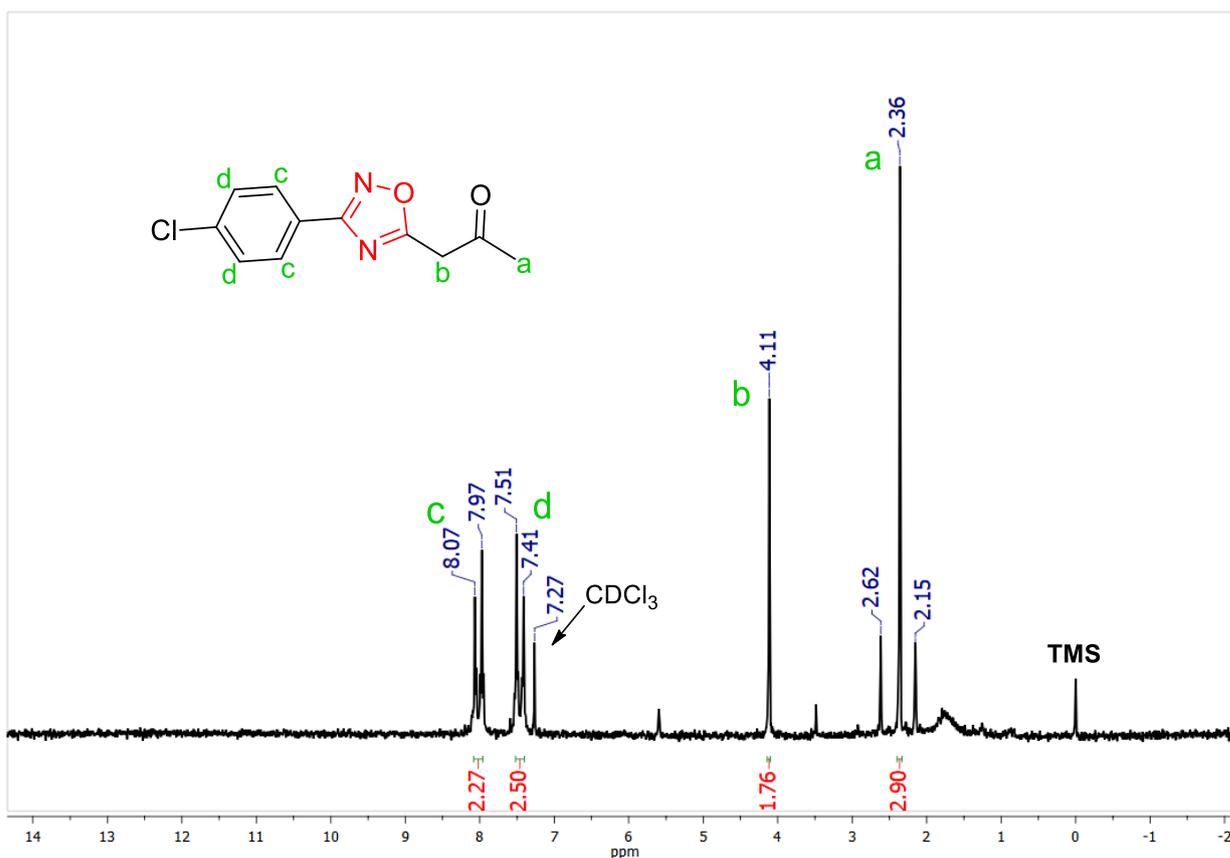


Fonte: Autor, 2024.

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H para a molécula **29a** (Figura 12), é possível observar no deslocamento químico ( $\delta$ ) em 2,36 ppm um singlete bem intenso relativo aos hidrogênios do grupo metila do composto, em uma região características de ligações C–H ligados ao uma carbonila. Na faixa de  $\delta$  4,11 ppm, verifica-se um singlete que corresponde aos hidrogênios do CH<sub>2</sub>, o qual apresenta um deslocamento maior que os hidrogênios de CH<sub>3</sub> por estar numa região entre a carbonila e o anel oxadiazólico. E ainda, em aproximadamente  $\delta$  8,07 ppm e  $\delta$  7,97 ppm o surgimento de um sinal duplete, e outro sinal duplete entre  $\delta$  7,51 ppm e  $\delta$  7,41 ppm, estes sinais são referentes aos hidrogênios do anel aromático, em que o  $J_{c-d} = 9,0$  Hz e o  $J_{d-c} = 9,0$  Hz são equivalentes, indicando que os hidrogênios adjacentes (Hc e Hd) possuem uma forte

interação típico de hidrogênios de anéis aromáticos. Vale ressaltar que, o singlete em  $\delta$  7,27 ppm corresponde ao próton do solvente utilizado, o  $\text{CDCl}_3$ .

**Figura 12.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (90 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do composto **29a**.



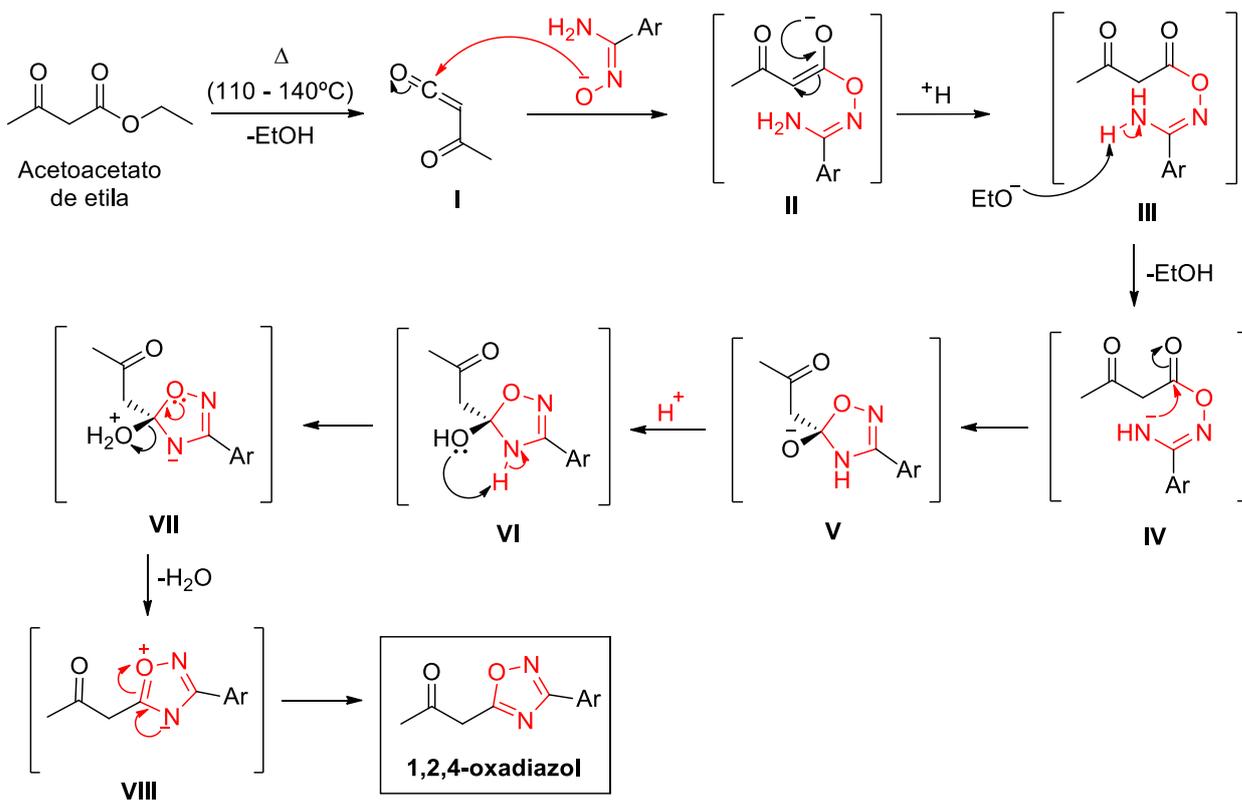
Fonte: Autor, 2024.

Todavia, ainda na Figura 12 são visíveis vestígios de impurezas, resultado de uma purificação incompleta com o metanol gelado. Segundo a tabela de deslocamentos químicos de impurezas residuais por RMN de  $^1\text{H}$ , apresentada por Gottlieb, Kotlyar e Nudelman (1997), pode-se deduzir resquícios de subprodutos, o que corrobora com o seu ponto de fusão. Isso é indicado em um singlete em  $\delta$  2,15 ppm relativo a um sinal de um próton ligado a um carbono adjacente a um grupo funcional, e outro singlete em  $\delta$  2,62 ppm associado a próton de ligação com carbono próximo a também, uma função orgânica ou ligação  $\pi$ . Em suma, o composto **29a** apresentou os seguintes resultados de RMN  $^1\text{H}$  (90 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,02 (*d*, 2H, CH,  $J = 9,0$  Hz),  $\delta$  7,46 (*d*, 2H, CH,  $J = 9,0$  Hz), 7,27 (*s*), 4,11 (*s*, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,62 (*s*, 1H), 2,36 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,15 (*s*, 1H).

Para finalizar este tópico, é importante ressaltar a proposta do mecanismo de reação que leva a formação dos 1,2,4-oxadiazóis, baseado na síntese apresentada por Du *et al.* (2007) e Da

Silva *et al.* (2020). De início, o aquecimento ocasiona a perda de uma molécula de etanol do éster acetoacetato de etila, formando o intermediário **I** (acil ceteno), um composto bastante reativo, o qual será abordado pela amidoxima atuando como nucleófilo se ligando ao carbono da carbonila terminal seguido de uma reorganização (**II**), fornecendo a O-acilamidoxima (intermediário **III**), que por sua vez, sofre a desprotonação do grupo amina levando ao intermediário **IV**, onde ocorre uma ciclização para formação de um heterocíclico (**V**), que logo em seguida, passa por uma desidratação na qual a formação e saída de água do composto (intermediário **VI** e **VII**), ocasionando na formação do intermediário **VIII**, o qual se rearranja levando a formação de 3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il-proanona (Esquema 06).

**Esquema 06.** Proposta de mecanismo de reação de 1,2,4-oxadiazol partindo do éster acetoacetato de etila, sob o método *solvente-free*.



Fonte: Adaptado de Da Silva *et al.* (2020).

### 5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Com a realização dos testes biológicos dos produtos **29a-c** contra radicais livres de DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>, os resultados da concentração efetiva média (CE<sub>50</sub>) estão apresentados na Tabela 04, e tendo conhecimento de que o valor de CE<sub>50</sub> indica a concentração necessária para eliminar até 50% dos radicais.

**Tabela 04.** Atividade antioxidante (CE<sub>50</sub> µg/ml) dos compostos **29a-c**.

Amostra	DPPH	ABTS
	CE <sub>50</sub> µg.mL <sup>-1</sup> (intervalo de confiança)	CE <sub>50</sub> µg.mL <sup>-1</sup> (intervalo de confiança)
<b>29a</b>	142,6 (110,0 – 222,0)	34,66 (31,62 – 37,95)
<b>29b</b>	217,6 (149,8 – 466,6)	4,055 (2,698 – 6,349)
<b>29c</b>	159,1 (116,8 – 280,1)	10,790 (9,947 – 11,810)
<b>Ácido ascórbico</b>	1,6 (1,4 – 1,8)	–
<b>TROLOX</b>	–	4,1 (3,7 – 5,8)

Fonte: Autor, 2024.

E a partir disso, pode-se verificar que em relação aos testes contra DPPH<sup>•</sup>, todos os 1,2,4-oxadiazóis testados apresentaram valores de concentrações para sequestro desse radical livre, contudo, quando comparado ao intervalo de confiança do ácido ascórbico (CE<sub>50</sub> 1,4 – 1,8 µg.mL<sup>-1</sup>) que serve como controle positivo, se demonstram ações antioxidantes mais inferiores, com os compostos **29a** apresentando um CE<sub>50</sub> equivalente a 142,6 µg.mL<sup>-1</sup> (110,0 – 222,0 µg.mL<sup>-1</sup>) e **29c** CE<sub>50</sub> 159,1 µg.mL<sup>-1</sup> (116,8 – 280,1 µg.mL<sup>-1</sup>), o que sugere uma atividade antioxidante relativamente boa ou intermediária, enquanto que o composto **29b** apresentou a menor atividade antioxidante nesse teste, precisando de uma concentração efetiva maior igual a 217,6 µg.mL<sup>-1</sup> (149,8 – 466,6 µg.mL<sup>-1</sup>), logo, indicando uma menor atividade antioxidante comparada às outras.

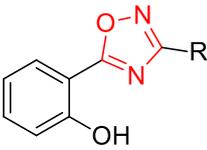
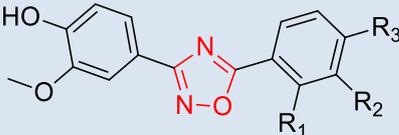
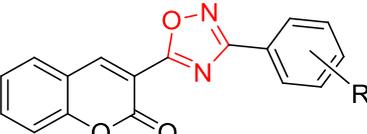
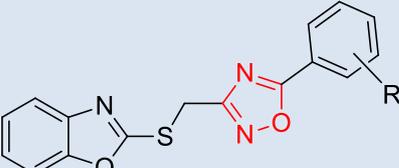
Ainda na Tabela 04, também verifica-se os resultados a respeito da eliminação dos radicais livres de ABTS<sup>•+</sup>, onde todos os compostos apresentaram valores significativos na

redução desses radicais, com destaque para o composto **29b**, que apresentou um valor de  $CE_{50}$  de  $4,055 \mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $2,698 - 6,349 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) muito próximo ao valor do TROLOX  $CE_{50}$   $4,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  usado como controle positivo, sugerindo uma atividade antioxidante muito boa nesse teste, em seguida, temos os heterocíclicos **29a** ( $CE_{50} = 34,66 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e **29c** ( $CE_{50} = 10,790 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), indicando concentrações maiores para agirem como antioxidante comparado ao composto **29b**, porém ainda assim, apresentam ações significativas na eliminação de radicais de  $ABTS^{*+}$ .

Embora os compostos analisados não apresentem grupos hidroxilas ou fenólicos, como em trabalhos como os de Ayoup *et al.* (2021) **25** e Zhao e Liu (2013) **22** que apresentaram compostos de 1,2,4-oxadiazóis com esses grupos adjacentes e obtiveram excelentes resultados de inibição de radicais livres em testes com DPPH<sup>\*</sup> e  $ABTS^{*+}$ . Porém, grupos retiradores de elétrons por efeito indutivo ou ressonância como o Cl, Br e  $NO_2$  na posição *para* de um anel aromático ligados diretamente ao 1,2,4-oxadiazol podem apresentar efeitos antioxidantes significativos. A pesquisa de Gong, Xi e Liu (2015) concluiu que híbridos formados por cumarina e 1,2,4-oxadiazol **30** pode potencializar o efeito antioxidante dos grupos hidroxilas fenólicas, e adicionalmente, transformar átomos de halogênios em grupos ativos capazes de prevenir a oxidação do DNA mediada por  $Cu^{2+}/GSH$ . Assim, os átomos de halogênios podem emergir como novos grupos funcionais em antioxidantes heterocíclicos (Gong; Xi; Liu, 2015).

O efeito inibitório de espécies radicalares no DNA gerado pelo brometo mostrou-se semelhante ao grupo hidroxila. Em particular, a eficácia antioxidante da *p*-Br no anel benzênico até se aproximou do TROLOX, com percentuais de inibição da oxidação no DNA de 88,9% e 88,3%, respectivamente. Além disso, o 1,2,4-oxadiazol adjacentes aos benzoxazóis **31** estudados pelos autores Yatam *et al.* (2018), revelou que o composto contendo um grupo  $NO_2$  na posição *para* do anel aromático ligado diretamente ao anel oxadiazólico foi promissor para atividade antioxidante de eliminação dos radicais de DPPH, com  $CI_{50} = 34,5 \mu\text{M}$ . Dentre os compostos analisados, o grupo *p*- $NO_2$ Ph aproximou-se mais do efeito antioxidante do ácido ascórbico, utilizado como controle positivo, que teve uma  $CI_{50} = 20,9 \mu\text{M}$ . Outro grupo de halogênio também demonstrou atividade antioxidante promissora, o *p*-FPh com  $CI_{50} = 40,1 \mu\text{M}$ . A Tabela 05 apresenta as estruturas moleculares e os testes realizados por esses autores supracitados.

**Tabela 05.** Compostos de 1,2,4-oxadiazóis na literatura que demonstraram resultados positivos para atividade antioxidante.

Compostos	Descrição dos grupos que influenciaram na atividade antioxidante em testes de inibição	Referência
 <p style="text-align: center;"><b>25</b></p>	<p>O 1,2,4-oxadiazol fenólico contendo halogênios na posição <i>para</i> de um fenil (R: <i>p</i>-CF<sub>3</sub>Ph) mostrou-se promissor em testes de eliminação de radicais de DPPH e quelantes de ferro. Com um CI<sub>50</sub> de 0,423 ± 0,017, próximo do ácido ascórbico (0,461 ± 0,024), e um CE<sub>50</sub> de 0,063 μM, muito próximo do EDTA (CE<sub>50</sub> = 0,055 μM), respectivamente.</p>	<p>Ayoub <i>et al.</i> (2021)</p>
 <p style="text-align: center;"><b>22</b></p>	<p>O composto contendo R<sub>1</sub>: Cl, R<sub>2</sub>: H e R<sub>3</sub>: H apresentou um valor de 57,3% mais baixo de percentual de inibição da oxidação de DNA induzida por <sup>•</sup>OH comparada aos outros, considerando-o o mais promissor nesse teste.</p>	<p>Zhao e Liu (2013)</p>
 <p style="text-align: center;"><b>30</b></p>	<p>O composto com R: <i>p</i>-Br obteve um resultado promissor de inibição da oxidação no DNA induzida por Cu<sup>2+</sup>/GSH. Apresentando um percentual de inibição de 88,9%, muito próximo ao do TROLOX (88,3%) usado como controle positivo.</p>	<p>Gong, Xi e Liu (2015)</p>
 <p style="text-align: center;"><b>31</b></p>	<p>O benzoxazol-1,2,4-oxadiazol com o grupo NO<sub>2</sub> na posição <i>para</i> do fenil foi o que apresentou o resultado mais promissor na inibição de radicais livres do DPPH com valor de CI<sub>50</sub> = 34 μM. Sendo o que mais se aproximou do ácido ascórbico com CI<sub>50</sub> de 20,9 μM.</p>	<p>Yatam <i>et al.</i> (2018)</p>

Fonte: Autor, 2024.

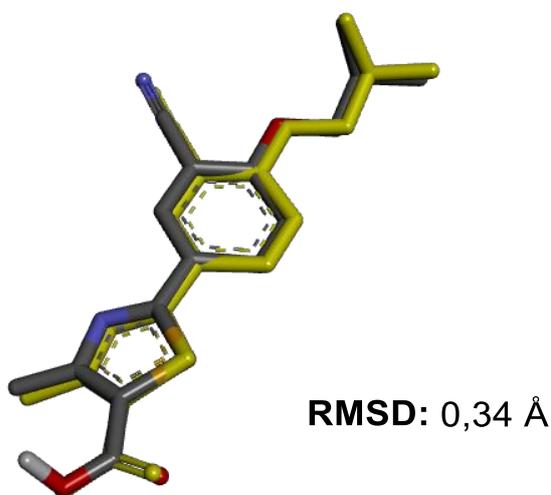
Em suma, neste trabalho os 1,2,4-oxadiazóis **29a-c** apresentaram resultados significativos com maior atividade antioxidante para o método do radical ABTS<sup>•+</sup> em comparação com o método do radical DPPH<sup>•</sup>, sugerindo que são potenciais agentes antioxidantes.

## 5.4 DOCKING MOLECULAR

### 5.4.1 Validação do método por *redocking*

Com a validação dos parâmetros da *Grid Box* verificou-se que, o ligante Tei-6720 apresentou uma energia de ligação baixa (negativa) equivalente a  $-8,63 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , ou seja, mostrou possuir uma alta afinidade com a enzima alvo, e o cálculo referente ao RMSD gerou um valor de  $0,34 \text{ \AA}$  com o inibidor original da enzima, o que é muito inferior a  $2,0 \text{ \AA}$ . Logo, a conformação gerada pelo *redocking*, revelou uma eficiência dos parâmetros determinados para realização do acoplamento dos outros ligantes com o receptor estudado, uma vez que, a pose gerada pelo software (em cinza) se mostrou muito semelhante a conformação original do ligante co-cristalizado (em amarelo) (Figura 13).

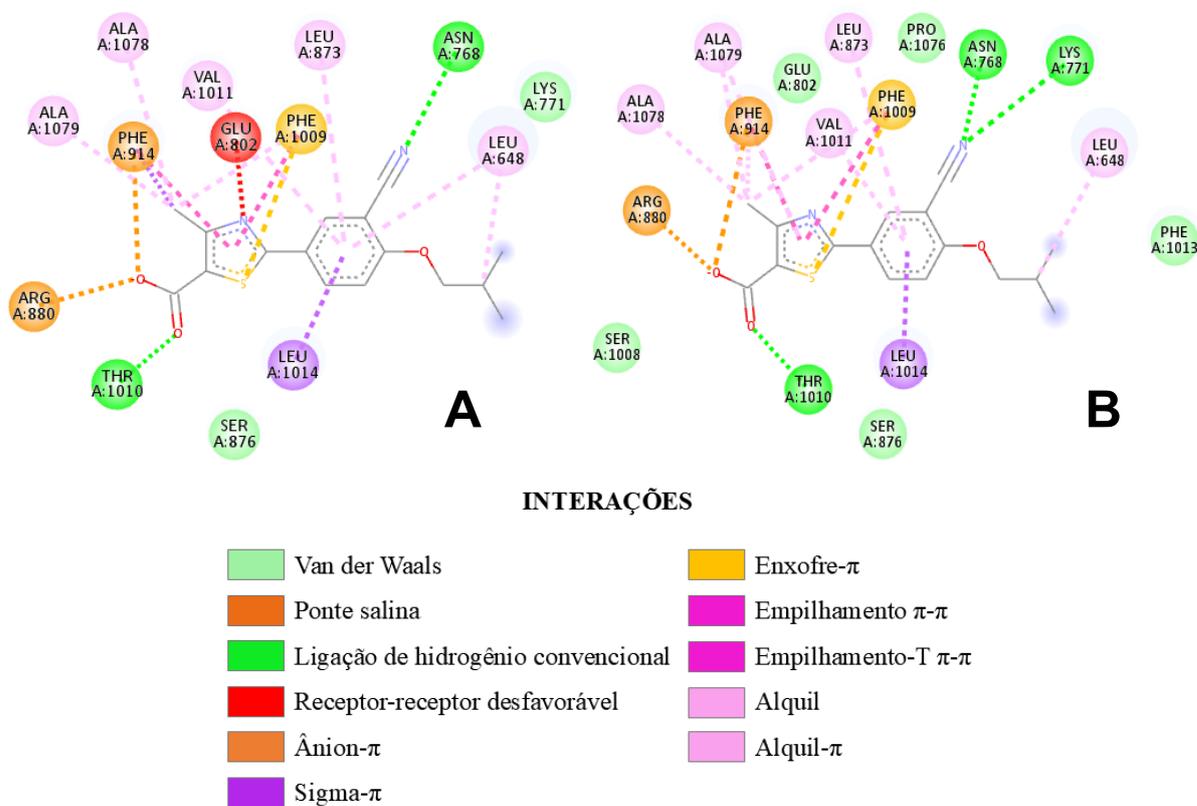
**Figura 13.** Sobreposição entre o ligante gerado pelo AutoDock (cinza) e o ligante original co-complexado com a enzima (amarelo), com RMSD de  $0,34 \text{ \AA}$ .



Fonte: Autor, 2024.

Em relação as interações que o inibidor co-cristalizado faz com a com o alvo, a Figura 14 apresenta quais interações estão envolvidas com os resíduos de aminoácidos que compõe o sítio ativo da enzima e são importantes para atividade de inibição do Tei-6720 com a XOR. É possível verificar que relativamente não uma diferença significativa na interação e os resíduos envolta dos ligante original (A) e o concebido pelo método computacional (B), o que justifica o processo de validação bem sucedida das coordenadas e dimensão da Grid Box ajustados, podendo assim, serem utilizados para o acoplamento com os ligantes deste trabalho.

**Figura 14.** Interações do ligante original co-complexado (A) e o ligante gerado pelo programa (B), com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima.



Fonte: Autor, 2024.

#### 5.4.2 Ancoragem receptor-ligante

Para os complexos receptor-ligante com os 1,2,4-oxadiazóis **29a-c**, na Tabela 06 são apresentados os resultados obtidos pelo LGA e a função de pontuação do autodock4, os quais proporcionaram as conformações mais estáveis de acordo com a energia de ligação e as

interações com os resíduos de aminoácidos no sítio ativo, visto que, boa parte desses resíduos também fazem ligação com o forte inibidor original no sítio ativo da XOR.

**Tabela 06.** Energia de ligação e os tipos de interações para os complexos formados com os ligantes **29a-c** e o alvo XOR.

Ligantes	Energia de Ligação ( $\Delta H = \text{kcal.mol}^{-1}$ )	Interações entre alvo-ligante		
		Ligações de Hidrogênio	Interações Hidrofóbicas	Outras Interações
<b>29a</b>	-6,30	Ser876	Leu873, Phe914, Phe1009, Val1011, Leu1014, Ala1079	Leu648, Phe649, Glu802, Arg880, Thr1010, Phe1013, Ala1078
<b>29b</b>	-6,40	Ser876	Leu873, Phe914, Phe1009, Val1011, Leu1014, Ala1079	Leu648, Phe649, Glu802, Arg880, Thr1010, Phe1013, Br <sup>-</sup>
<b>29c</b>	-7,69	Arg880, Ala1079, Glu1261	Leu873, Phe914, Phe1009, Val1011, Leu1014, Ala1078, Ala1079	Leu648, Lys771, Glu802, Ser876, Thr1010, Phe1013

**Ala:** alanina; **Arg:** arginina; **Glu:** glutamato ou ácido glutâmico; **Leu:** leucina; **Lys:** lisina; **Phe:** fenilalanina; **Ser:** serina; **Thr:** treonina; **Val:** valina.

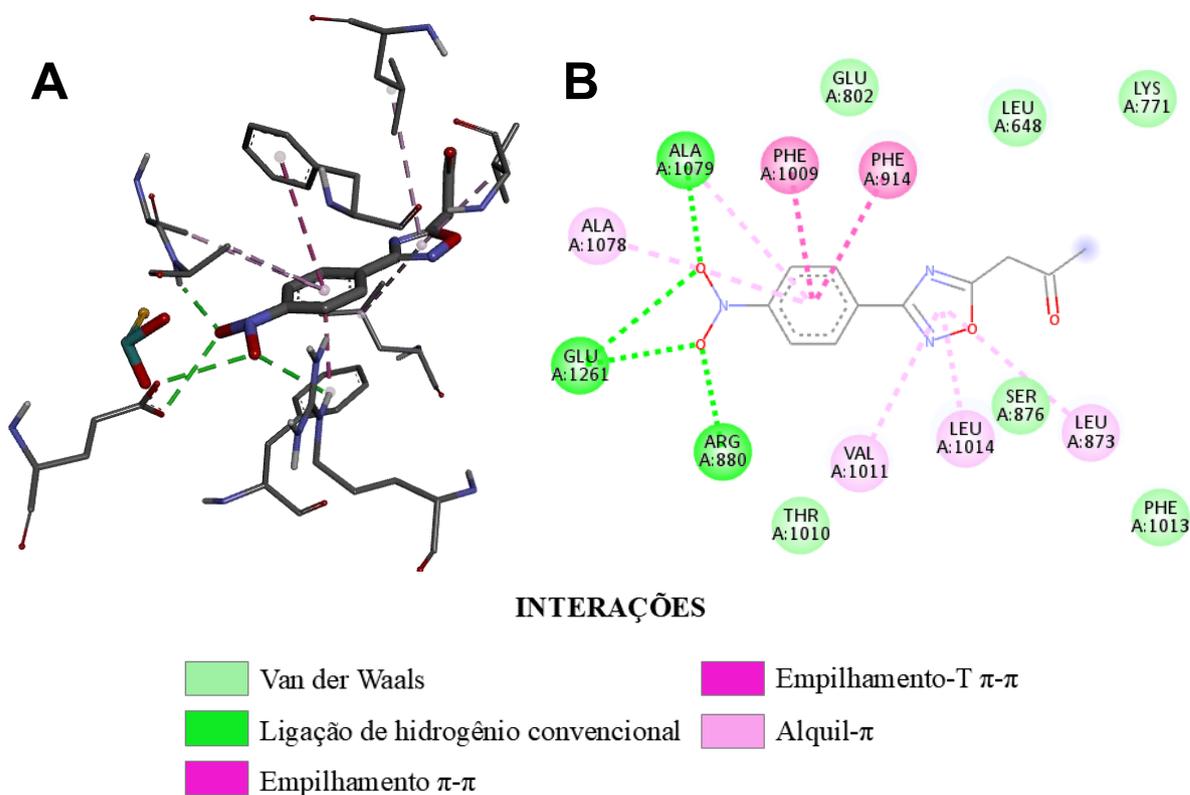
Fonte: Autor, 2024.

Assim, a respeito da energia de ligação, o ligante **29c** foi o que apresentou a menor energia de ligação, com  $-7,69 \text{ kcal.mol}^{-1}$  sendo a energia mais negativa. De acordo com os autores Santos e Freitas (2018) quanto mais baixa for a energia de ligação, mais estável será o complexo formado, considerando que haverá pouca energia disponível para realização de trabalho cinético, devido a essa relação desse software com o conceito de energia livre de Gibbs. Portanto, o composto **29c** é o que demonstrou ser mais estável com o complexo de XOR, com uma energia de ligação mais próxima do ligante Tei-6720 no *redocking* com  $-8,63 \text{ kcal.mol}^{-1}$ .

Vale mencionar que, esse ligante foi o que mais apresentou ligações de hidrogênio (que dentre as interações intermoleculares, são as mais fortes) com os resíduos terminais de Arg880,

Ala1079 e Glu126 e os oxigênios do grupo NO<sub>2</sub> do composto (Figura 15). E também, as interações hidrofóbicas do tipo empilhamento  $\pi$ - $\pi$  (paralela) e empilhamento-T  $\pi$ - $\pi$  (ortogonal) entre o anel aromático do ligante e o anel aromático da fenilalanina, e do tipo  $\pi$ -alquil com os grupos alquilas dos aminoácidos com o anel oxadiazólico e o anel aromático adjacente, apesar dessas interações serem fracas, são importantes para identificação desses ligantes como possíveis fármacos, vista a grande quantidade de subunidades hidrofóbicas presentes nessas estruturas peptídicas, da mesma forma que as forças de van der Waals (Fokoue *et al.*, 2020).

**Figura 15.** Interação do complexo XOR-ligante **29c** em visualização 3D (A) e 2D (B).



Fonte: Autor, 2024.

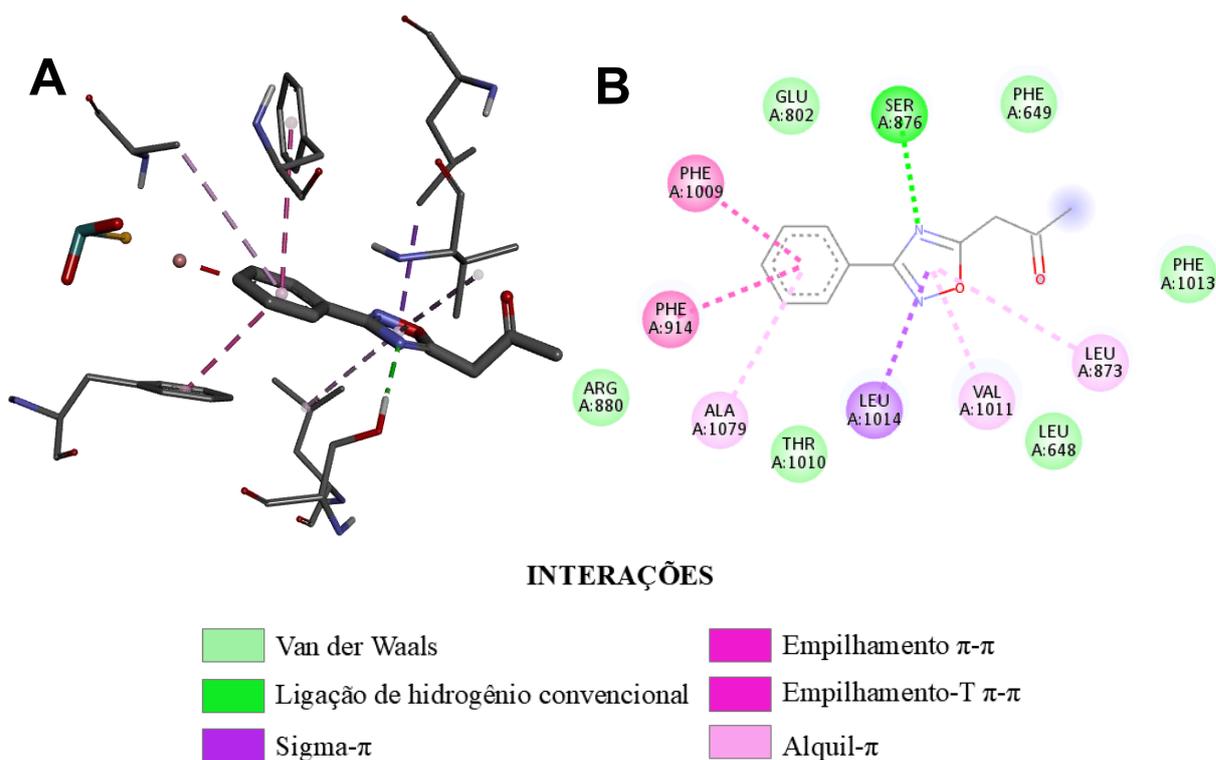
Na Figura 15 A ainda é possível observar o co-fator complexo de molibdênio VI, o qual é essencial para a função catalítica da enzima, porém, assim como o Tei-6720 tanto o composto **29c**, quanto os demais ligantes não interagiram de forma direta com essa substância, mas são evidentes essas interações com resíduos do sítio ativo envolta desse ligante, e se encontram na mesma posição que o forte inibidor estudado no trabalho de Okamoto *et al.* (2003). Podendo assim, competir com o substrato impedindo a interação com o co-fator e atividade da enzima.

Em parte, os ligantes **29a** e **29b** tem valores de energia de ligação muito próximos de  $-6,30$  kcal.mol<sup>-1</sup> e  $-6,40$  kcal.mol<sup>-1</sup>, assim, com energias maiores que a do ligante **29c**, porém, ainda

formam complexos estáveis com a macromolécula alvo. E também, apresentam um mesmo padrão de interações com resíduos semelhantes, com destaque para o composto **29b**, o qual houve uma interação estérica causando um rompimento na ligação C–Br, devido as essas ligações serem mais fracas e fácil de serem quebradas, onde o átomo de bromo é mais polarizável, por possuir um raio atômico maior que o átomo de cloro, o qual possui uma maior afinidade eletrônica o que contribui para força de ligação com o carbono.

Porém, ainda é permitido visualizar as interações que ocorrem entre os aminoácidos e o fragmento contendo o 1,2,4-oxadiazol e o anel aromático, apresentados na Figura 16. As interações que envolvem o ligante **29a** e a disposição desses 1,2,4-oxadiazóis no complexo obtido no *docking* estão postos no tópico de APÊNDICES.

**Figura 16.** Interação do complexo XOR-ligante **29b** em visualização 3D (A) e 2D (B).



Fonte: Autor, 2024.

Portanto, essas observações realizadas indicam que, apesar das diferenças nas energias de ligação e os tipos de interações, todos os ligantes estudados têm potencial para influenciar a atividade da XOR de maneira significativa, dado a afinidade que esses ligantes apresentaram com essa enzima, e que conseqüentemente, sejam capazes de inibir o seu papel na produção de radicais de superóxidos no organismo. Além disso, as interações descritas neste estudo e entre outras pesquisas, ajudam a entender a estabilidade energética dos complexos formados, bem

como o modo de ligação e o posicionamento dos ligantes no sítio ativo do receptor de maneira eficaz.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir desse estudo observa-se a importância do tema que propões a síntese e docking molecular de compostos como potenciais agentes antioxidantes, os quais defendem os sistemas biológicos de seres vivos de espécies oxidativas, como os radicais livres, os quais são originados no nosso metabolismo e podem causar estresses oxidativos no nosso corpo, prejudicando biomoléculas importantes para o funcionamento do nosso organismo, como também, o desenvolvimento de inflamações, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e crônicas como por exemplo, o câncer e o Alzheimer.

Diante disso, existem alguns antioxidantes como os endógenos que o próprio corpo humano possui, os antioxidantes naturais potentes como o ácido ascórbico (a vitamina C), mas também há trabalhos na literatura que investigam a capacidade antioxidante de alguns compostos sintetizados em laboratório, como os 1,2,4-oxadiazóis, esses são heterocíclicos que possuem atividades farmacológicas importantes para o desenvolvimento de medicamentos e o tratamento de doenças. A partir disso, esse trabalho buscou realizar a síntese desses compostos heterocíclicos, com objetivo de avaliar o seu potencial antioxidante.

Com esse intuito, realizou-se a síntese de três desses compostos sob um método de reação eficaz e livre de solventes, base ou sal, o que contribui para o não surgimento de muitas impurezas. Contudo, o método de purificação utilizado foi por cristalização em metanol gelado, que apesar de ser mais rápido e faz usos de poucos materiais do que uma coluna cromatográfica, apresentou de baixos a moderados rendimento de **29a-c**, sendo necessário fazer uso de outros solventes orgânicos para aprimoramento da obtenção desses oxadiazóis com mais rendimento e pureza, tendo em vista a capacidade desse produto de se precipitar em solvente orgânico, e o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **29a** indicar resíduos de alguns reagentes que fazem parte da reação.

Acerca do seu potencial como agente antioxidante, os resultados de teste *in vitro* contra eliminação de radicais livres, demonstraram que os 1,2,4 oxadiazóis tiveram resultados mais promissores na redução dos radicais do método ABTS<sup>+</sup> do que com o DPPH<sup>\*</sup>, com destaque para o composto **29b** que apresentou uma atividade antioxidante muito próxima do antioxidante padrão TROLOX usado como controle positivo.

Por fim, utilizou-se do procedimento de ancoragem molecular para analisar a capacidade inibitória de enzimas pró-oxidantes. E assim, esse método foi importante para compreendermos acerca da estabilidade energética dos complexos formados com a XOR, ressaltando o composto **29c** como o mais estável obtendo uma energia de ligação mais próxima do forte inibidor dessa

enzima. Entretanto, é necessária a realização de um teste *in vitro* de inibição dessa macromolécula, para efeitos de comparação com os resultados do *docking* apresentados.

Em suma, os compostos **29a-c** sintetizados, podem ser considerados como potenciais agentes antioxidantes e no desenvolvimento de novos medicamentos contra estresses oxidativos no nosso corpo, atuando na eliminação de radicais livres ou no bloqueio de enzimas pró-oxidativas.

## 7. PERSPECTIVAS

- Purificar os compostos **29a-c**, fazendo uso de outros solventes para cristalização;
- Caracterizar os compostos **29b** e **29c** por RMN de  $^1\text{H}$ , e realizar análises de RMN de  $^{13}\text{C}$ ;
- Realizar a síntese de redução desses 1,2,4-oxadiazóis;
- Caracterizar por IV, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , avaliar a atividade antioxidante pelo método ABTS $^{+\bullet}$ /DPPH $^{\bullet}$  e realizar o acoplamento molecular dos heterocíclicos **29a-c** reduzidos;
- Comparar os resultados obtidos desses compostos reduzidos com os resultados deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, A. C.; COSTA, A. M.; VILARRASA, J. The performance of several docking programs at reproducing protein–macrolide-like crystal structures. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 136, 2017.
- AKDEMIR, F. N. E. *et al.* Quercetin protects rat skeletal muscle from ischemia reperfusion injury. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry** v. 31, n. 2, p. 162–166, 2016.
- ANRAKU, M. *et al.* Antioxidant activities of chitosans and its derivatives in in vitro and in vivo studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 199, p. 141–149, 2018.
- APAK, R. *et al.* Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 997–1027, 2016.
- ATMARAM, U. A.; ROOPAN, S. M. Biological activity of oxadiazole and thiadiazole derivatives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 9, p. 3489-3505, 2022.
- AYOUP, M. S. *et al.* Beyond direct Nrf2 activation; reinvestigating 1, 2, 4-oxadiazole scaffold as a master key unlocking the antioxidant cellular machinery for cancer therapy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 220, p. 113475, 2021.
- BABIOR, B. M. NADPH oxidase. **Current opinion in immunology**, v. 16, n. 1, p. 42-47, 2004.
- BARREIROS, A. L. B. S.; MACHADO, S. M. F. **Química Orgânica Experimental**. São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe, CESAD, 2010.
- BOSTRÖM, J. *et al.* Oxadiazoles in medicinal chemistry. **Journal of medicinal chemistry**, v. 55, n. 5, p. 1817-1830, 2012.

CARRIJO, G. L. Q. **Atividade antioxidante: uma revisão de trabalhos apresentados nas reuniões da sociedade brasileira de química (rasbq) dos anos de 2020, 2021 e 2022. 2023.**

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura em Química) – Instituto Federal Goiano, Campus Ceres, 2023.

CAVASOTTO, C. N.; AUCAR, M. G.; ADLER, N. S. Computational chemistry in drug lead discovery and design. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 119, n. 2, p. e25678, 2019.

CAKMAK, K. C.; GULCIN, İ. Anticholinergic and antioxidant activities of usnic acid—an activity-structure insight. **Toxicol Rep** 6, p. 1273–1280, 2019.

CUNHA, F. S.; AGUIAR, A. P. Síntese e Bioatividade de 1, 2, 4-oxadiazóis. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2509-2530, 2015.

DA SILVA, E. E. *et al.* Síntese, caracterização e atividade antitumoral *in vitro* de uma série de 1, 2, 4-oxadiazóis 3, 5-substituídos. **Scientia Plena**, v. 16, n. 11, p. 117202, 2020.

DE AGUIAR, A. P.; CUNHA, F. S. Síntese e Bioatividade de 1, 2, 4-oxadiazóis. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2509-2530, 2015.

DIVVELA, A. K. C.; CHALLA, S. R.; TAGARAM, I. K. Pathogenic role of cyclooxygenase-2 in cancer. **Journal of Health Science**, v. 56, n. 5, p. 502-516, 2010.

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

ELMASTAS, M. *et al.* Antioxidant activity of an Anatolian herbal tea- *Origanum minutiflorum*: isolation and characterization of its secondary metabolites. **International Journal of Food Properties**. v. 21, n. 1, p. 374–384, 2018.

FLIEGER, J. *et al.* Antioxidants: classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles. **Materials (Basel)**, [s. l.], v. 14, n. 15, p. 4135-4189, 2021.

FREITAS, J. C. R. *et al.* Síntese, caracterização, avaliação citotóxica e antimicrobiana de 2-(3-Aril-1, 2, 4-oxadiazol-5-il)-etanotiol. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 6, p. 1330-1337, 2021.

FOKOUE, H. H. *et al.* Há algo novo no reconhecimento molecular aplicado à química medicinal? **Química Nova**, São Paulo, v. 43, p. 78-89, 2020.

GONG, X.; XI, G.; LIU, Z. Activity of coumarin–oxadiazole-appended phenol in inhibiting DNA oxidation and scavenging radical. **Tetrahedron letters**, v. 56, n. 45, p. 6257-6261, 2015.

GOTTLIEB, H. E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. **Journal of organic chemistry**, v. 62, n. 21, p. 7512-7515, 1997.

GULCIN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of toxicology**, v. 86, n. 3, p. 345–391, 2012.

GULCIN, I. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. **Archives of toxicology**, v. 94, n. 3, p. 651-715, 2020.

KITCHEN, D. B. *et al.* Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature reviews Drug discovery**, v. 3, n. 11, p. 935-949, 2004.

KOWALCZYK, P. *et al.* Mitochondrial oxidative stress: a causative factor and therapeutic target in many diseases. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 22, n. 24, p. 13384, 2021.

KRISHNA, C. *et al.* Synthesis and antimicrobial evaluation of new coumarins with 1,2,4-oxadiazole. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, n. 10, p. 3743-3751, 2015.

LIU, Y. GUO, H. Solubility determination and crystallization thermodynamics of an intermediate in different organic solvents. **Journal of Molecular Liquids**, v. 339, p. 116-821, 2021.

MARTEMUCCI, G. *et al.* Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. **Oxygen**, v. 2, n. 2, p. 48-78, 2022.

MAYER, J. C. P. *et al.* Synthesis, spectroscopic, electrochemistry and antioxidant properties of benzofuroxan and 2H-benzimidazole 1, 3-dioxide derivatives: Effects of conjugation with electron-acceptor 1, 2, 3-triazolyl-1, 2, 4-oxadiazole. **Journal of Molecular Structure**, v. 1311, p. 138420, 2024.

MENEGATTI, R.; FRAGA, M. A.; C. BARREIRO, J. E. A. Importância da síntese de fármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 3, p. 16-22, 2001.

MENG, X. *et al.* Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 7, n. 2, p. 146- 157, 2011.

MONTEIRO, C. M. O. **Síntese, caracterização e avaliação da toxicidade do 3-(aril)-5-(heptadecil)-1, 2, 4-oxadiazol através do bioensaio com artemia salina leach**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, 2021.

MOUSSA, Z.; JUDEH, Z. M.; AHMED, S. A. Nonenzymatic exogenous and endogenous antioxidants. **Free Radical Medicine and Biology**, v. 1, p. 11-22, 2019.

NEHA, K. *et al.* Medicinal prospects of antioxidants: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 178, p. 687-704, 2019.

OLIVEIRA, G.; SOUSA, T. **Estudo do efeito do consumo de aditivos químicos alimentares na saúde humana**. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Nutrição) – Faculdade Metropolitana de Anápolis, Goiás, 2024.

OKAMOTO, K. *et al.* An extremely potent inhibitor of xanthine oxidoreductase: crystal structure of the enzyme-inhibitor complex and mechanism of inhibition. **Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 3, p. 1848-1855, 2003.

PACE, A.; PIERRO, P. The new era of 1,2,4-oxadiazoles. **Organic and Biomolecular Chemistry**. v.7, n. 21, p. 4337-4348, 2009.

PEARCE, S. The importance of heterocyclic compounds in anti-cancer drug design. **Drug Discovery**, v. 18, n. 2, p. 66-70, 2017.

PISOSCHI, A. M. *et al.* Oxidative stress mitigation by antioxidants-an overview on their chemistry and influences on health status. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 209, p. 112891, 2021.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. **LWT- Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 1-11, 2007.

RAMOS, T. J. N. *et al.* **Compostos fenólicos, atividade antioxidante e efeito da sazonalidade na composição mineral em folhas de Cecropia obtusa Trécul. E. Cecropia palmata Will. (Cecropiaceae)**. Tese de Doutorado. UFRA/Campus Belém e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). 2024.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REDDY, K. T.; SREENIVASULU, R.; RAJU, R. R. Synthesis and biological evaluation of 1, 2, 4-oxadiazole linked imidazopyrazine derivatives as anticancer agents. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 96, p. 1085-1090, 2019.

REGUEIRA, J. L. L.; FREITAS, J. J. R.; FILHO, J. R. F. Preparação de 1, 2, 4-oxadiazol: sequência didática aplicada em disciplina de síntese orgânica na graduação. **Química Nova**, v. 39, p. 1019-1025, 2016.

SANTOS, E. B.; FREITAS, B. D. S. **Docking molecular da proteína Quinase ativada por AMP (AMPK): caracterização *in silico* das principais propriedades referentes à interação proteína-ligante.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2018.

SANTOS, P. P.; SANTIAGO, V. S.; LIMA, M. E. F. 1, 2, 4-and 1, 3, 4-Oxadiazoles as Scaffolds in the Development of Antiparasitic Agents. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 3, p. 435-456, 2018.

SHAHIDI, F. Natural Antioxidants: An Overview “in” Natural Antioxidants Chemistry, Health Effects, and Applications. **AOCS Press: Champaign, Illinois**, p. 1-11. 1996.

SHEN, Z. B. *et al.* Design, synthesis, and SAR study of novel flavone 1, 2, 4-oxadiazole derivatives with anti-inflammatory activities for the treatment of Parkinson's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 255, p. 115417, 2023.

SHILS, M. E. *et al.* **Nutrição moderna na saúde e na doença.** 10ª edição, São Paulo: Manole, 2009.

SILVA, T. M. S. *et al.* Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of food composition and analysis**, v. 19, n. 6-7, p. 507-511, 2006.

SILVA, A. R. F. *et al.* Síntese e atividade antimicrobiana de 3-[3, 4, 5-trimetoxifenil]-[1, 2, 4-oxadiazol-5-il] propanona. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 94401-94414, 2020.

SILVA, A. R. F. **Síntese, caracterização e atividades biológicas de 1, 2, 4-oxadiazóis.** Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Licenciatura em Química) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, campus Recife, 2020.

SILVA, M. L. **Avaliação da capacidade oxidante e modelagem molecular de cumarinas sintéticas.** Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) - Universidade Federal de Alagoas, campus Arapiraca, Arapiraca, 2023.

SINDHI, V. *et al.* Potential applications of antioxidants—a review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, p. 828–835, 2013.

SRIVASTAVA, R. M. *et al.* Synthesis, mechanism of formation, and molecular orbital calculations of arylamidoximes. **Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly**. v. 140, 1319-1324, 2009.

SOMOGYI, A. *et al.* Antioxidant measurements. **Physiological Measurement** v. 28, p. R41–R55, 2007.

STOIA, M.; OANCEA, S. Low-molecular-weight synthetic antioxidants: classification, pharmacological profile, effectiveness and trends. **Antioxidants**, v. 11, n. 4, p. 638, 2022.

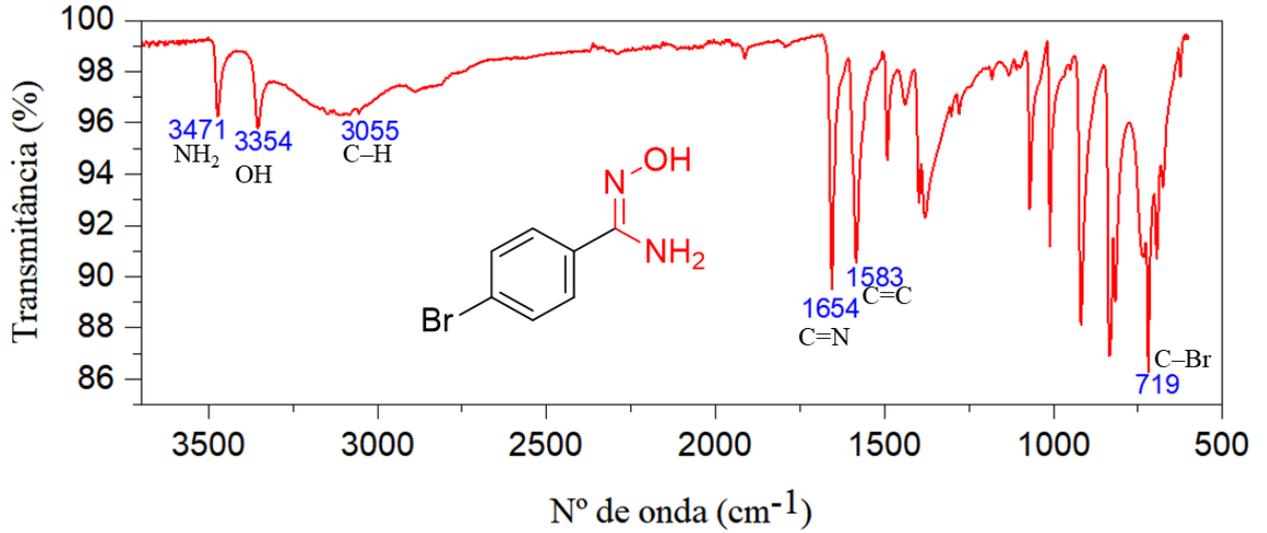
TIAN, T.; WANG, Z.; ZHANG, J. Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–18, 2017.

YATAM, S. *et al.* Design, Synthesis and Biological Evaluation of 2 (((5-aryl-1, 2, 4-oxadiazol-3-yl) methyl) thio) benzo [d] oxazoles: New Antiinflammatory and Antioxidant Agents. **ChemistrySelect**, v. 3, n. 37, p. 10305-10310, 2018.

ZHAO, C. LIU, Z. Q. Diaryl-1, 2, 4-oxadiazole antioxidants: Synthesis and properties of inhibiting the oxidation of DNA and scavenging radicals. **Biochimie**, v. 95, n. 4, p. 842-849, 2013.

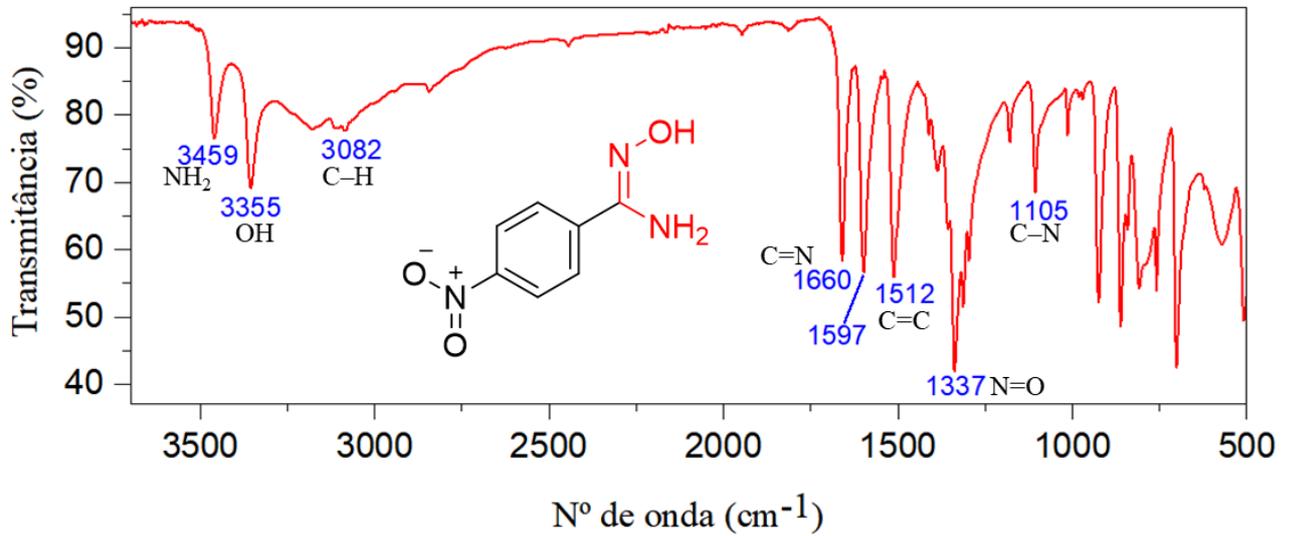
## APÊNDICES

**Figura 17.** Espectro de IV do composto **27b** por ATR.



Fonte: Autor, 2024.

**Figura 18.** Espectro de IV do composto **27c** por ATR.



Fonte: Autor, 2024.

Figura 19. Espectro de IV do composto **29b** por ATR.

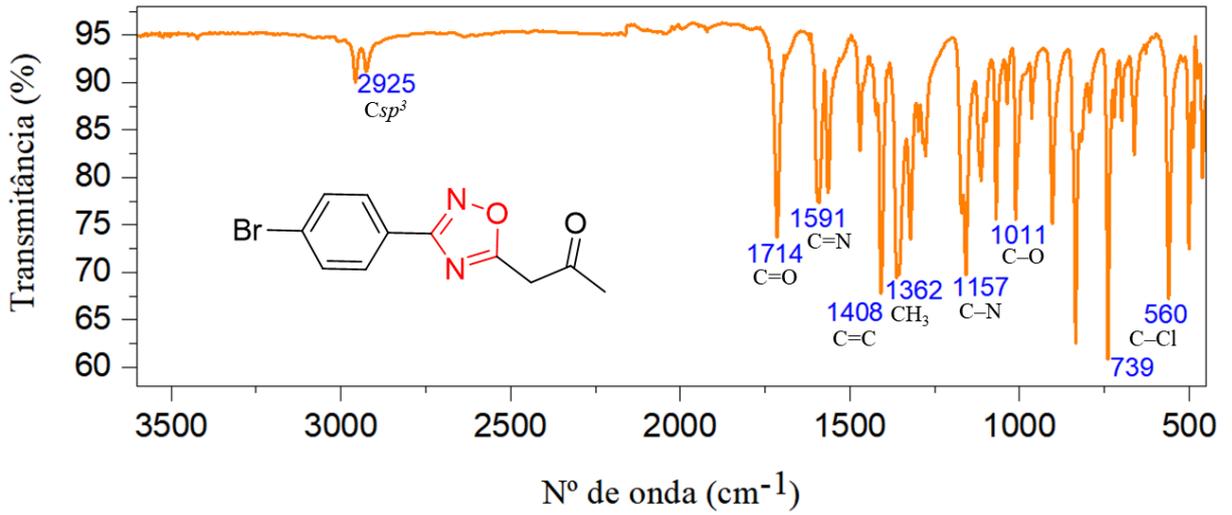
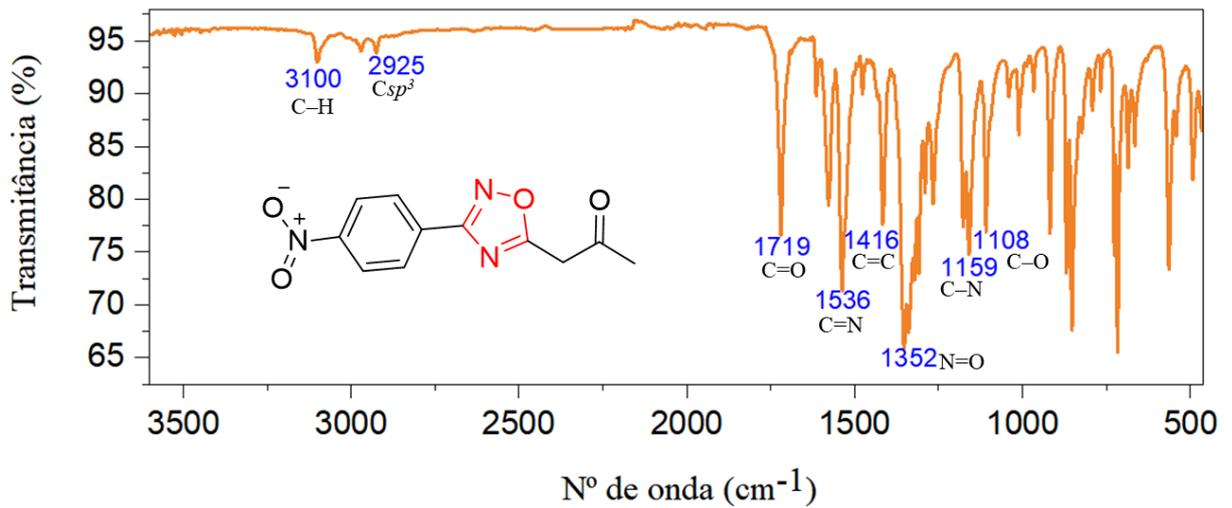
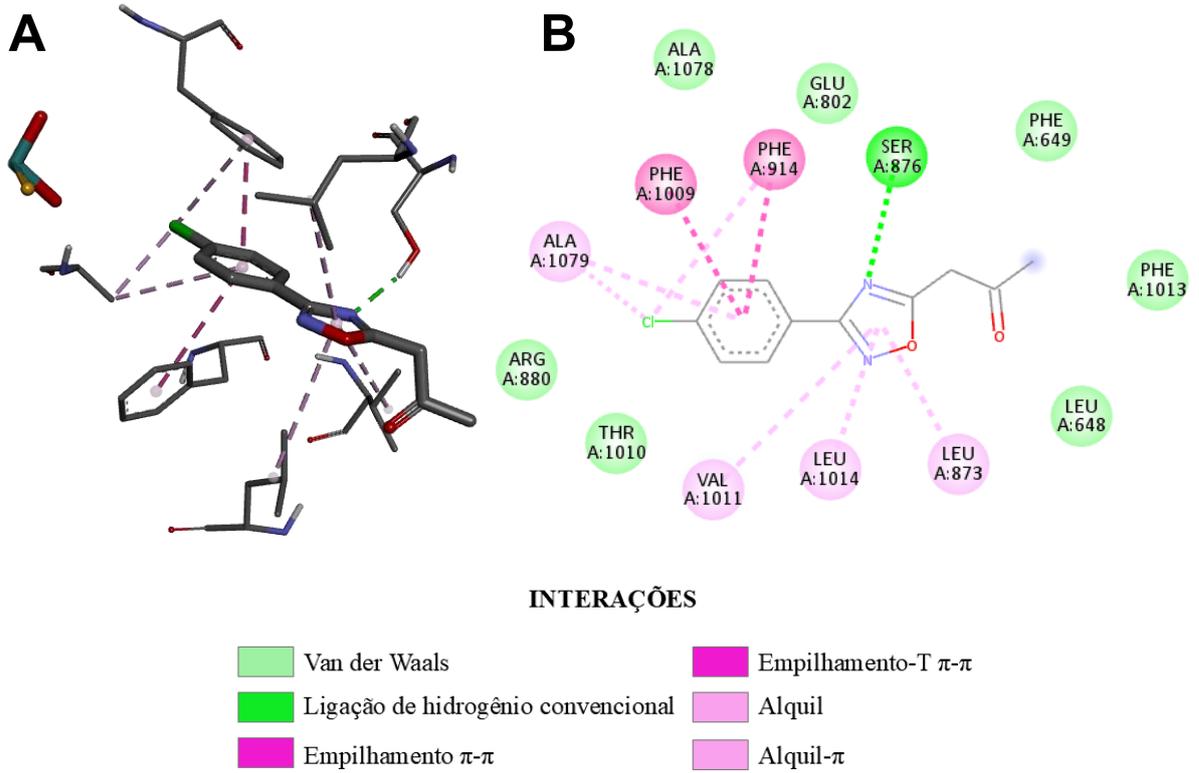


Figura 20. Espectro de IV do composto **29c** por ATR.

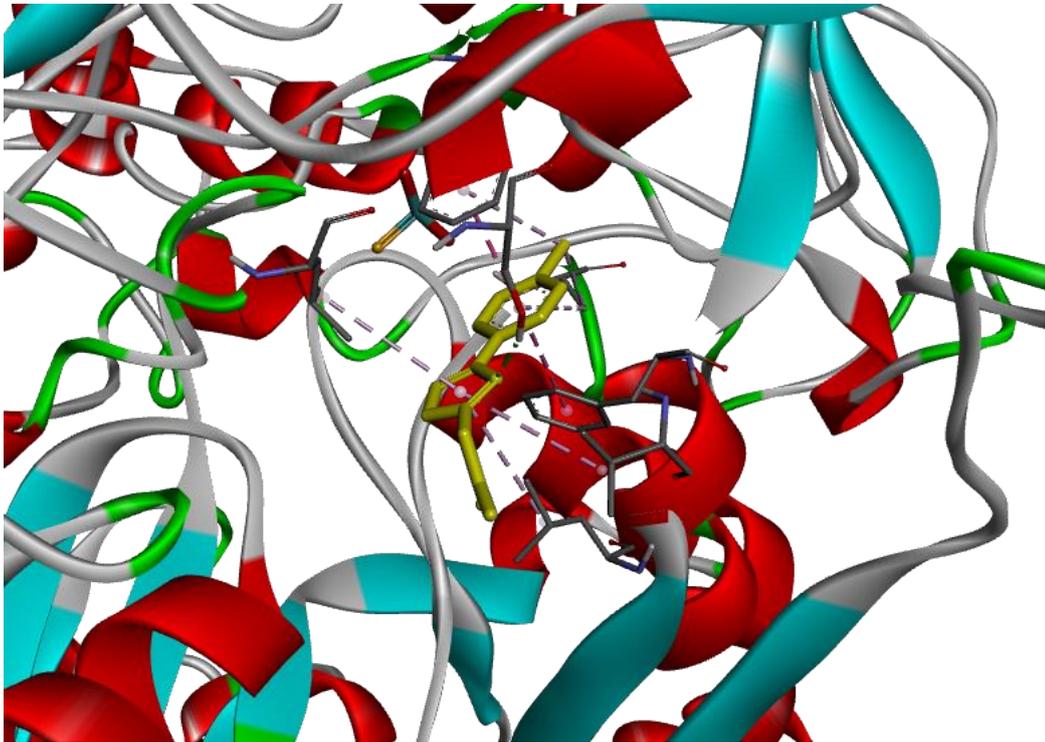


**Figura 21.** Interação do complexo XOR-ligante **29a** em visualização 3D (A) e 2D (B).



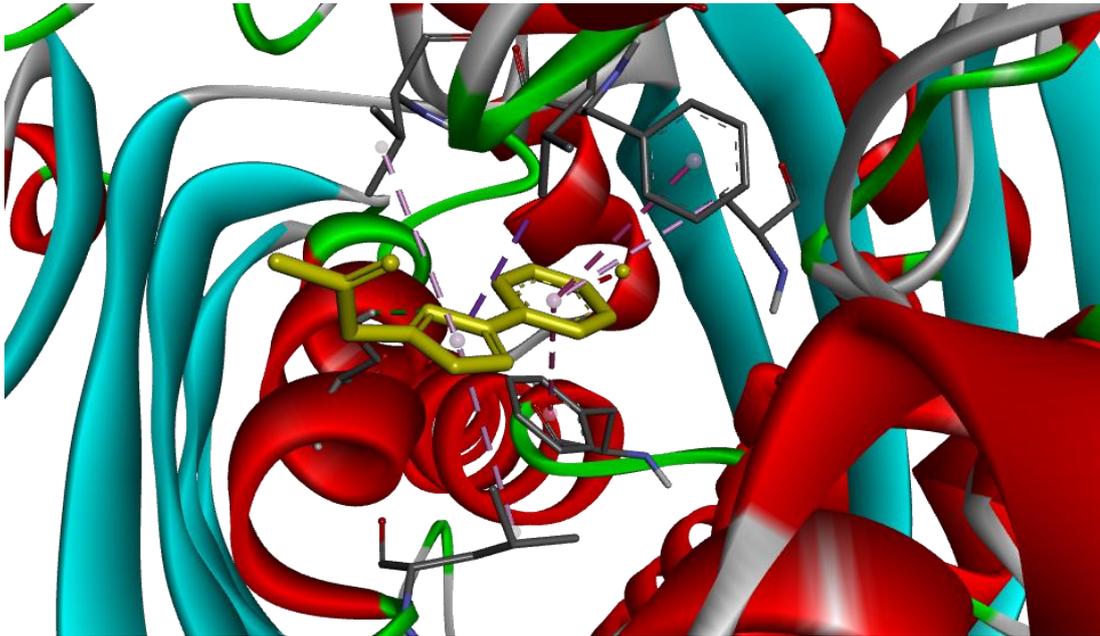
Fonte: Autor, 2024.

**Figura 22.** Complexo LGA da enzima XOR e o ligante **29a** (em amarelo).



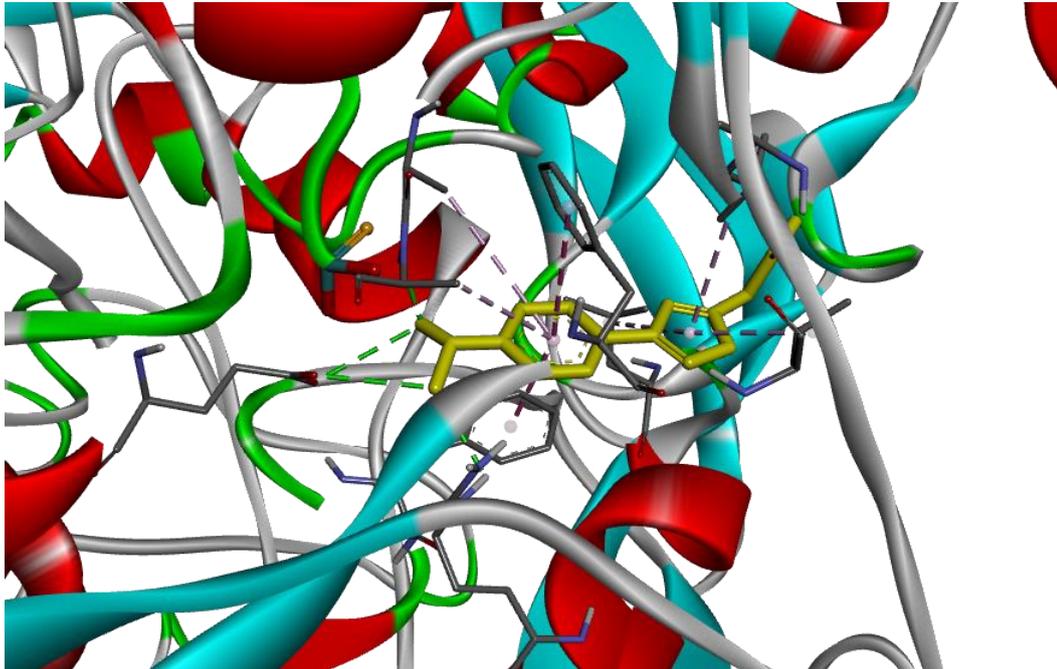
Fonte: Autor, 2024.

**Figura 23.** Complexo LGA da enzima XOR e o ligante **29b** (em amarelo).



Fonte: Autor, 2024.

**Figura 24.** Complexo LGA da enzima XOR e o ligante **29c** (em amarelo).



Fonte: Autor, 2024.