

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, DOCKING MOLECULAR E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS CONTENDO O NÚCLEO 1,2,4-OXADIAZOL COMO POTENCIAIS AGENTES ANTIOXIDANTES

Ryan H. G. Da Silva¹; Catarina S. Da Silva¹; João R. F. Filho¹.

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco.
ryan.silva@ufrpe.br

Palavras-Chave: Heterocíclico, Radicais livres (Química), Estresse oxidativo.

Introdução

Os agentes antioxidantes são importantes para a área da química medicinal, pois atuam de diversas maneiras para proteger as células contra estresses oxidativos causados por excesso de radicais livres. Nessa percepção, os antioxidantes doam elétrons aos radicais livres, e consequentemente neutralizam a tensão oxidativa, impedindo que causem danos às biomoléculas e células presentes no organismo (Flieger *et al.*, 2021). No que se refere aos radicais livres, esses são elementos residuais desenvolvidos pelo organismo por meio de ações metabólicas, ou advindos de fatores externos como tabagismo ou poluentes ambientais. Em excesso, os radicais causam estresse oxidativo, prejudicando o funcionamento do organismo, e gerando algumas condições patológicas como por exemplo, doenças degenerativas, cardíacas ou crônicas (Tian; Wang; Zhang, 2017).

O próprio corpo humano possui proteção antioxidante, identificados como antioxidantes endógenos, como por exemplo a glutathione peroxidase que causa a decomposição de radicais peróxidos em água, atuando na defesa de inflamações (Pisoschi *et al.*, 2021). Mas também, há a existência de antioxidantes exógenos com a finalidade de amenizar as doenças patológicas geradas por fatores externos, dentre esses, destacam-se os antioxidantes naturais, como o ácido ascórbico (vitamina C) e β -caroteno (provitamina A) (Neha *et al.*, 2019). Bem como os antioxidantes sintéticos, que vem sendo de grande interesse no campo da química medicinal na busca de desenvolver novos fármacos, além de determinar novos sistemas de redução das espécies radicalares (Carocho; Ferreira, 2013). Nessa concepção, ressaltam-se os compostos heterocíclicos como os 1,2,4-oxadiazol 3,5-dissubstituídos.

Os sistemas de 1,2,4-oxadiazóis são heterocíclicos contendo dois átomos de nitrogênio, e um de oxigênio, e são sintetizados por serem estruturas de fácil modificação estrutural, e apresentam uma função essencial no metabolismo de células vivas, por possuírem estabilidade metabólica e uma rigidez molecular (De Aguiar; Cunha, 2015; Menegatti; Fraga; Barreiro, 2001). Além disso, esses compostos podem apresentar uma variedade bem ampla de atividades farmacológicas, dentre as quais se enquadram a capacidade de ligação no sítio ativo de diversas enzimas, por meio de interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e forças de Van Der Waals, por exemplo (Pearce, 2017). E também, atuações farmacoterapêuticas, tais como atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, anticâncer, sobretudo, atividade antioxidante (De Aguiar; Cunha, 2015). Ademais, esses compostos heterocíclicos também possuem propriedades bioisostéricas, onde há a alteração de grupos na estrutura de fármacos para potencializar seu papel farmacológico e citotóxico, dessa forma, os 1,2,4-oxadiazóis são sintetizados partindo de compostos contendo grupos funcionais como os ésteres, por exemplo, por serem considerados na literatura como bioisósteros dos mesmos (Camci; Karali, 2023).

A partir disso, a literatura dispõe de alguns estudos acerca do potencial antioxidantes de compostos contendo 1,2,4-oxadiazol. No trabalho de Yatam *et al.* (2018) consistiu na síntese de derivados de benzoxazóis contendo 1,2,4-oxadiazóis, os quais foram submetidos a testes antioxidantes com radicais DPPH. Os autores concluíram que os compostos contendo os grupos nitro, flúor, metóxi e metilcarboxilato na posição *para* no fenil adjacente ao heterocíclico, apresentaram atividades antioxidantes promissoras.

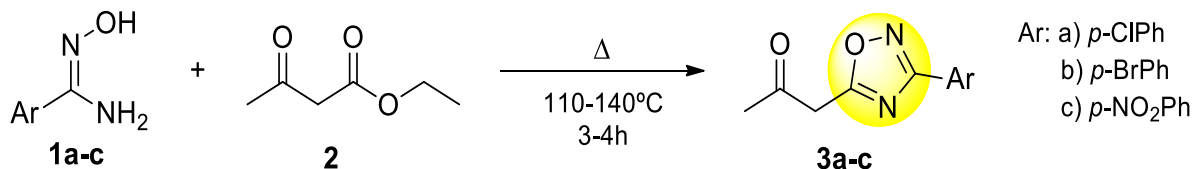
Além disso, procedimentos computacionais podem ser realizados para verificar a capacidade inibitória desse heterocíclico frente a enzimas pró-oxidantes. Ayoup *et al.* (2021) realizaram um *docking* molecular para moléculas contendo 1,2,4-oxadiazóis adjacentes a fenóis, os quais tiveram resultados mais significativos nos testes biológicos. Os autores utilizaram como alvo a enzima NADPH oxidase (PDB ID: 1K4U), que é responsável por ações catalíticas que geram radicais superóxidos no organismo. Como resultado, foi constatado que os compostos contendo grupos fenil e *p*-CF₃Ph apresentaram interações de ligação de hidrogênio de comprimentos equivalentes com o mesmo resíduo, a serina 376, e registraram energias de ligação negativas relevantes com -4,62 e -4,95 Kcal/mol, respectivamente. Portanto, sendo consideráveis para efeitos de inibição da enzima abordada.

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo de sintetizar e caracterizar por técnicas de elucidação estrutural, compostos contendo o núcleo 1,2,4-oxadiazol partindo de um β -ceto-éster, além de avaliar a sua atividade antioxidante *in vitro* e o acoplamento molecular contra uma enzima pró-oxidante.

Material e Métodos

A princípio, os compostos contendo o 1,2,4-oxadiazol **3a-c** foram sintetizados por meio do método *solvente-free* (Du *et al.*, 2007), que consistiu apenas na adição de 0,001 mol de arilamidoximas **1a-c** e 0,0015 mol de acetoacetato de etila **2** em um tubo de ensaio, em seguida, essa mistura foi submetida a um banho de óleo de silicone pré-aquecido em temperatura entre 110-140°C durante 3-4h (Esquema 01), acompanhando-se a reação por cromatografia em camada delgada em um sistema de eluição hexano/acetato de etila, proporção 7:3. Após o procedimento, os produtos foram recristalizados e purificados com cerca de 10,0 mL de metanol gelado ao tubo. E suas estruturas foram elucidadas por técnicas espectroscópicas no infravermelho (IV), além de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C com frequência de 400 MHz na presença de clorofórmio deuterado como solvente e tetrametilsilano como padrão.

Esquema 01. Síntese de 1,2,4-oxadiazol via arilamidoximas e acetoacetato de etila, sob o método *solvente-free*.



Fonte: Autor (2025).

A partir disso, os produtos foram submetidos ao teste com radicais livres de DPPH[•], e outro teste com ABTS^{•+}, onde foram preparadas soluções estoques dos compostos contendo o heterocíclico com etanol em diferentes concentrações variando de 10 a 500 µg/mL, e assim, adicionando essas concentrações em tubos eppendorfs de 1,5 mL, com 900 µL dos radicais desejados, e completando o volume total também com etanol. Posteriormente, essas misturas

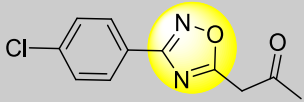
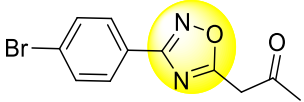
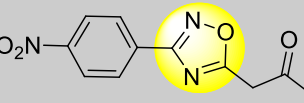
foram submetidas a irradiação por ultrassom durante 30 min, e a quantidade dos radicais foram medidas em microplacas de 96 poços no aparelho de UV-Vis em $\lambda = 517$ nm para o DPPH \cdot e $\lambda = 734$ nm para o ABTS $^{+\cdot}$, utilizando como referência as concentrações de ácido ascórbico e o TROLOX, respectivamente. Por fim, os resultados foram expressos como valores de Concentração Efetiva Média para eliminar 50% dos radicais (CE_{50}).

Em relação ao *docking* molecular, os ligantes referentes aos compostos sintetizados **3a-c** foram preparados em formato 3D por meio dos programas HyperChem ® e Avogadro ® , onde tiveram suas geometrias otimizadas e energias minimizadas. Em seguida, o alvo foi selecionado no site *Protein Data Bank* (PDB), sendo escolhido a enzima Xantina Oxidoredutase (XOR) PDB ID: 1N5X por conta da sua relação com a liberação de radicais superóxidos ($\cdot\text{O}_2$) e o efeito de estresse oxidativo no organismo. Preparou-se o alvo no software AutoDock Tools 4.2.6, onde foram removidos os substratos e moléculas de água indesejadas, adicionou-se átomos de hidrogênios e foi realizada a delimitação da área no sítio ativo da enzima, para isso, utilizou-se a *grid box* com espaçamento de 0,375Å. O cálculo de *docking* e *redocking* foi realizado através do Algoritmo de busca Genético Lamarckiano (LGA) para determinação das orientações e conformação dos ligantes. Por fim, as interações do complexo proteína-ligante formado pelo AutoDock foram analisadas no software Discovery Studio.

Resultados e Discussão

Os resultados da síntese dos compostos **3a-c** contendo 1,2,4-oxadiazol estão dispostos na Tabela 01, os quais foram obtidos sólidos cristalinos de baixo a moderados rendimentos, isso pode ser devido a alguns aspectos que afetam na obtenção desses heterocíclicos pelo método de purificação com metanol gelado utilizado, como por exemplo a perda de porção do produto por filtração e transferência do mesmo, a temperatura tanto da reação quanto do solvente, e até mesmo a própria natureza do produto, o qual pode ser precipitado de forma parcial no solvente utilizado. Logo, faz-se o uso de outros solventes orgânicos conforme mostrado no trabalho de Liu e Guo (2021). Porém, as variações no ponto de fusão com menos de 2°C indicam uma condição de pureza dos produtos.

Tabela 01. Rendimento e ponto de fusão dos produtos **3a-c** sintetizados.

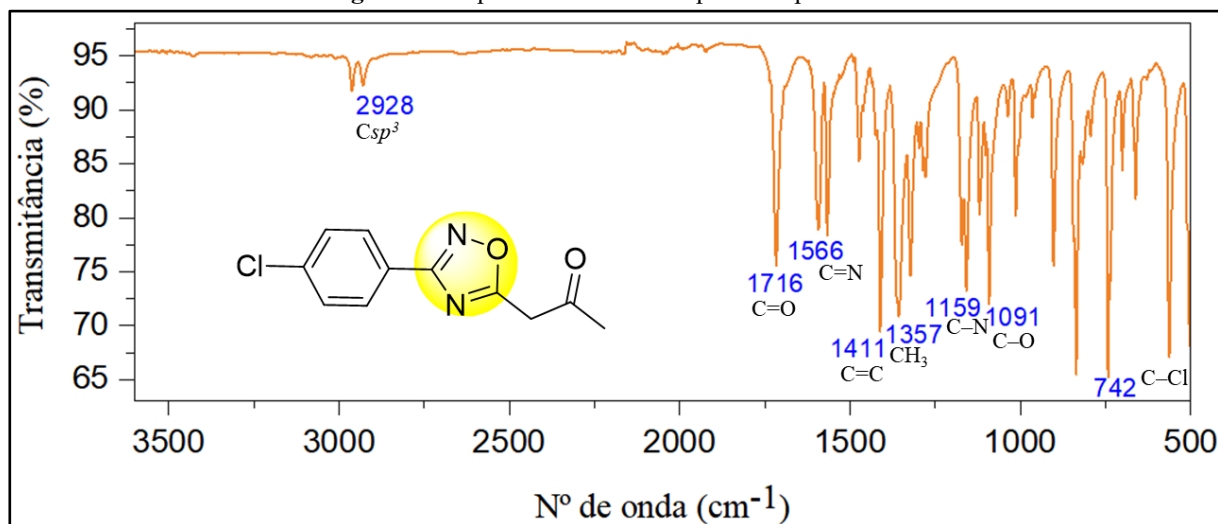
Composto	Rendimento (%)	Ponto de Fusão (°C)
 3a	30,6	105 – 107
 3b	34,4	118 – 120
 3c	56,2	133 – 135

Fonte: Autor (2025).

Como mencionado no tópico anterior, as estruturas das moléculas produzidas foram caracterizadas por espectroscopia no IV. Dessa forma, pode-se observar na Figura 01 os seguintes estiramentos de ligações características para o composto **3a**: em 1716 cm^{-1} , 1566 cm^{-1}

¹, 1411 cm⁻¹ e 1357 cm⁻¹ referentes às ligações C=O, C=N, C=C do anel aromático e CH₃, nessa ordem. Além das distensões em 1091 cm⁻¹, 1159 cm⁻¹, 2928 cm⁻¹ e 742 cm⁻¹ relacionados às ligações C–O, C–N, carbonos *sp*³ e C–Cl, respectivamente.

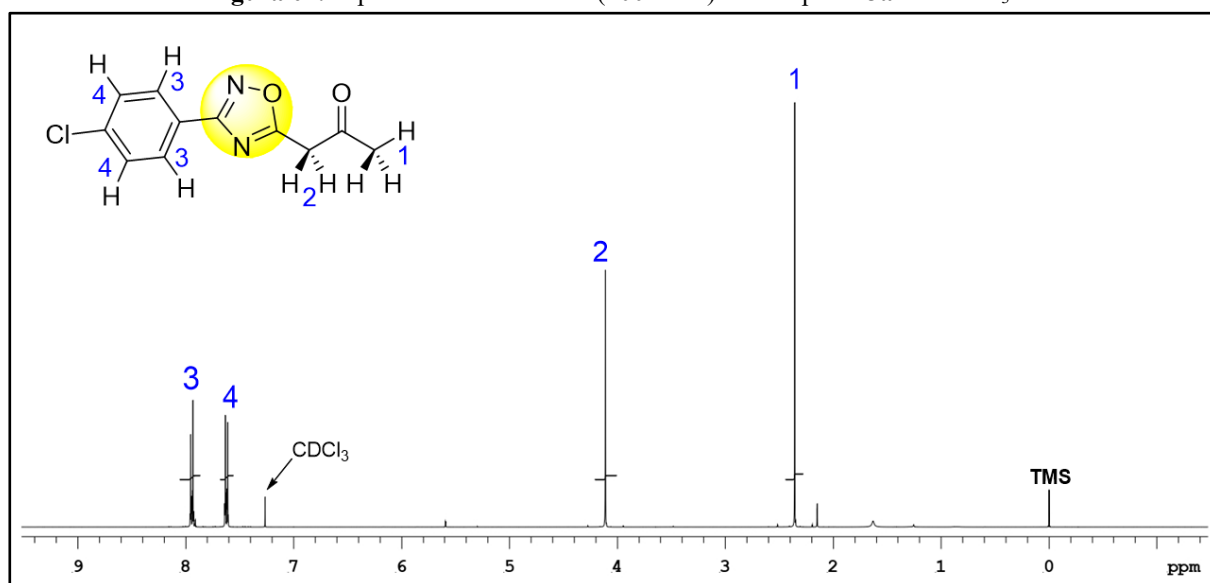
Figura 01. Espectro de IV do composto **3a** por ATR.



Fonte: Autor (2025).

A respeito da técnica de análise por ressonância magnética nuclear, pode-se notar na Figura 02 o espectro referente ao RMN de ¹H também do composto **3a**, dois sinais singleto na faixa de δ 2,3 ppm e δ 4,1 ppm, correspondentes aos hidrogênios do grupo CH₃ e CH₂, respectivamente. E ainda, em aproximadamente δ 7,6 ppm e δ 8,0 ppm dois sinais duplete, os quais correspondem aos hidrogênios do anel aromático, onde ambos os sinais apresentam constante de acoplamento equivalentes a *J*₃₋₄ = 9,0 Hz e *J*₄₋₃ = 9,0 Hz. E isso indica que os hidrogênios H₃ e H₄ possuem uma forte interação típica de hidrogênios de anéis aromáticos.

Figura 02. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) do composto **3a** em CDCl₃.

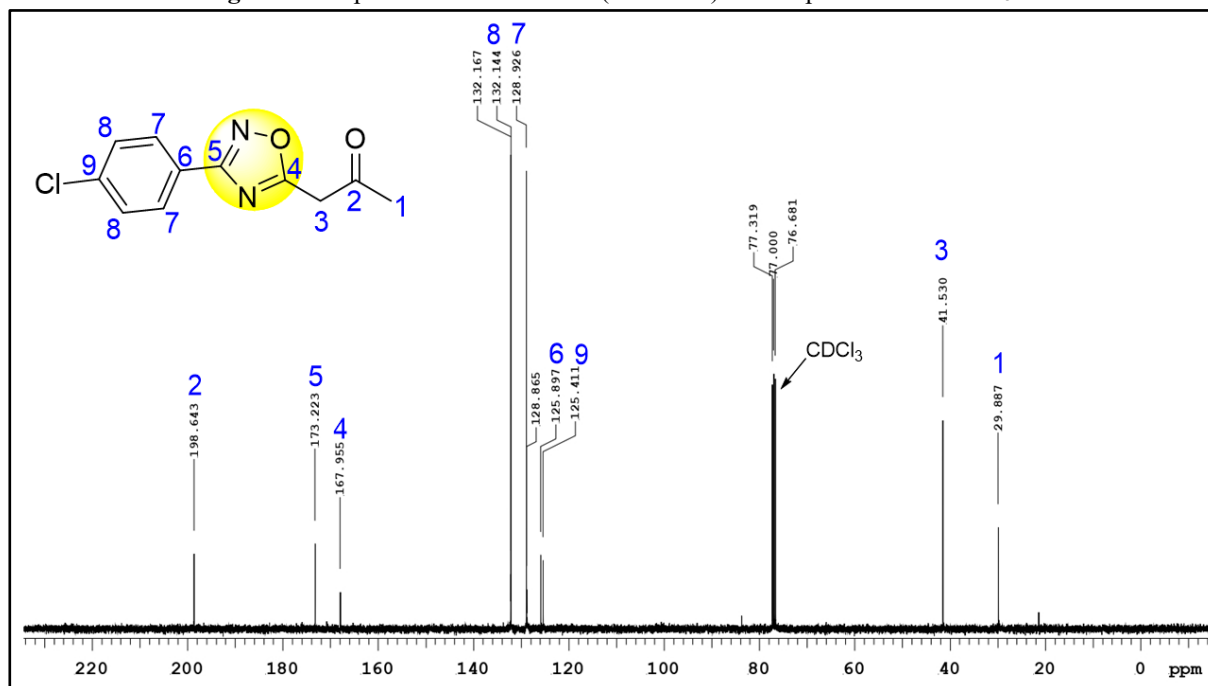


Fonte: Autor (2025).

Acerca do RMN de ¹³C da molécula **3a** foram observados nove sinais correspondentes aos nove carbonos da estrutura desse composto. Os dois carbonos *sp*³ representados como 1 e 3 correspondem aos sinais por volta de δ 30 ppm e δ 41 ppm, nessa ordem. Enquanto que, o

carbono carbonílico 2 surge em cerca de δ 198 ppm, que é uma região característica para sinais referentes a carbonos C=O de cetonas ou aldeídos. E ainda, verificam-se dois sinais em aproximadamente δ 168 ppm e δ 173 ppm correspondentes aos carbonos marcados como 4 e 5, respectivamente, os quais são característicos para os carbonos sp^2 ligados diretamente a átomos de oxigênio ou nitrogênio. E quanto aos sinais característicos aos carbonos do anel aromático, estes aparecem em um deslocamento químico de δ 125 ppm a δ 132 ppm (Figura 03). Dessa forma, o espectro analisado apresenta sinais correspondentes à estrutura proposta.

Figura 03. Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz) do composto **3a** em CDCl_3 .



Fonte: Autor (2025).

Para os testes de verificação da capacidade antioxidante dos compostos **3a-c**, os resultados foram expressos em CE_{50} na Tabela 02. E assim, para o teste com DPPH^{\bullet} , todos os três compostos sintetizados apresentaram atividade, porém, mostraram-se possuir uma capacidade antioxidante bem inferior quando comparado com o CE_{50} do ácido ascórbico usado como controle. Contudo, para o teste com $\text{ABTS}^{\bullet+}$ todos os compostos apresentaram resultados significativos, tendo como destaque o composto **3b** que demonstrou um valor muito próximo do CE_{50} do TROLOX utilizado como referência nesse teste.

Tabela 02. Atividade antioxidante (CE_{50} $\mu\text{g/ml}$) dos compostos **3a-c** sintetizados.

Amostra	DPPH^{\bullet}	$\text{ABTS}^{\bullet+}$
	CE_{50} $\mu\text{g/mL}$ (intervalo de confiança)	CE_{50} $\mu\text{g/mL}$ (intervalo de confiança)
3a	142,6 (110,0 – 222,0)	34,66 (31,62 – 37,95)
3b	217,6 (149,8 – 466,6)	4,055 (2,698 – 6,349)
3c	159,1 (116,8 – 280,1)	10,790 (9,947 – 11,810)
Ácido ascórbico	1.6	—

	(1.4 – 1.8)	
TROLOX	–	4.1 (3.7 – 5.8)

Fonte: Autor (2025).

Apesar dos compostos não possuírem grupos hidroxilas ou fenólicos que são importantes para a ação antioxidante, eles apresentam grupos retiradores de elétrons por efeito indutivo (Cl e Br) e por efeito de ressonância (NO₂) nas posições *para* do anel aromático adjacentes ao núcleo heterocíclico, o que pode causar efeitos significativos para a atividade. Como por exemplo no trabalho de Gong, Xi e Liu (2015), em que avaliaram a capacidade antioxidante dos compostos de cumarina contendo 1,2,4-oxadiazol para prevenir a oxidação do DNA, e aquele com o brometo na posição *para* se mostrou muito semelhante a um grupo hidroxila, com um percentual antioxidante de 88,9% também próximo do TROLOX com 88,3%. Em suma, os compostos **3a-c** demonstraram resultados mais consideráveis para o método com ABTS⁺⁺ em comparação com o teste realizado com DPPH^{*}.

Com relação aos resultados do docking molecular, pode-se observar na Tabela 03 o valor de energia de ligação do complexo ligante-alvo formado para cada molécula **3a-c** e as interações que essas fazem com a xantina oxidoreductase. A princípio, o processo *redocking* foi realizado com o ligante co-cristalizado da enzima identificado como Tei-6720, sendo utilizado como inibidor original da atividade da mesma, e como resultado o complexo obtido apresentou energia de ligação baixa (negativa) igual a –8,63 kcal/mol, em outras palavras, possui uma afinidade significativa com a enzima, dado que quanto menor a energia de ligação, mais estável é o complexo concebido por meio do Autodock Tools, o qual busca conformações espaciais dos ligantes que otimizem essas interações, reduzindo a energia livre de ligação do sistema (Arcon *et al.*, 2017). E entre essas interações que a molécula faz com os aminoácidos da XOR, por meio do Discovery Studio foi possível observar que esses resíduos fazem parte do sítio ativo da enzima, o qual é a região de interesse para inibição da atividade catalítica e de ligação da mesma.

Tabela 03. Energia de ligação e os tipos de interações para os complexos formados com as moléculas **3a-c** e o alvo XOR.

Interações entre alvo-ligante				
Ligantes	Energia de Ligação (ΔH = kcal/mol)	Ligações de Hidrogênio	Interações Hidrofóbicas	Outras Interações
3a	–6,30	Ser876	Leu873, Phe914, Phe1009, Val1011, Leu1014, Ala1079	Leu648, Phe649, Glu802, Arg880, Thr1010, Phe1013, Ala1078
3b	–6,40	Ser876	Leu873, Phe914, Phe1009, Val1011, Leu1014, Ala1079	Leu648, Phe649, Glu802, Arg880, Thr1010, Phe1013
3c	–7,69	Arg880, Ala1079, Glu1261	Leu873, Phe914, Phe1009, Val1011, Leu1014, Ala1078, Ala1079	Leu648, Lys771, Glu802, Ser876, Thr1010, Phe1013



Tei-6720	-8,63	Asn768, Lys771, Thr1010	Leu648, Leu873, Phe914, Phe1009 Val1011, Leu1014, Ala1078, Ala1079	Glu802, Ser876, Arg880, Phe914, Ser1008, Phe1009, Phe1013, Pro1076
----------	-------	-------------------------------	---	---

Ala: alanina; **Arg:** arginina; **Asn:** asparagina; **Glu:** ácido glutâmico; **Leu:** leucina; **Lys:** lisina; **Phe:** fenilalanina; **Pro:** prolina; **Ser:** serina; **Thr:** treonina; **Val:** valina.

Fonte: Autor (2025).

Assim, pode-se notar na Tabela 03 que dentre os ligantes utilizados, o que mais se aproximou do ligante co-cristalizado em termos de energia de ligação e interações, foi o composto **3c**. Enquanto que, os ligantes **3a** e **3b** demonstraram basicamente um mesmo comportamento nesses parâmetros obtidos. As interações ocorreram com aminoácidos do sítio ativo da XOR para as três moléculas, os quais também interagiram para a Tei-6720. Vale ressaltar que essas interações são bastante relevantes para a área da química medicinal na descoberta de novos compostos como potenciais fármacos (Fokoue *et al.*, 2020). Portanto, esses resultados obtidos indicam previamente que os compostos **3a-c** podem ser capazes de inibir a atividade oxidativa desempenhada pela xantina oxidoreductase.

Conclusões

Em conclusão, com base no que foi discutido nesse estudo, verifica-se a importância do tema que propôs a síntese, atividade e *docking* molecular de compostos como potenciais agentes antioxidantes, os quais estão sendo de grande interesse para a área da química medicinal, pois são relevantes na defesa dos sistemas biológicos dos seres vivos contra radicais livres e enzimas pró-oxidantes que podem causar estresse oxidativo, e consequentemente, condições patológicas no organismo. E dentre esses compostos, os heterocíclicos 1,2,4-oxadiazóis são de extrema relevância para farmacologia devido às suas propriedades de flexibilidade metabólica, bioisosterismo e ações farmacoterapêuticas, a qual neste trabalho se destaca o seu potencial antioxidante.

Nessa perspectiva, realizou-se a síntese de três derivados por meio de um método de reação eficiente e livre de solvente, o que contribuiu para o não surgimento de subprodutos indesejados e outras possíveis impurezas, contudo, o método de purificação por metanol gelado utilizado não obteve altos rendimentos dos produtos, sendo necessário a busca por outros solventes para a obtenção de rendimentos mais satisfatórios. Porém, os espectros de caracterização apresentaram sinais coerentes com as estruturas propostas. Acerca do seu potencial como agente antioxidante, os testes *in vitro* na eliminação de radicais livres exibiram resultados significativos, em especial para o cátion radical ABTS^{•+}, com destaque para o composto **3b** com CE₅₀ bem próximo do controle utilizado. E com relação ao procedimento de acoplamento molecular, todos os compostos apresentaram interações relevantes com resíduos do sítio ativo da enzima pró-oxidante XOR, destacando-se a molécula **3c** que apresentou um complexo mais estável, próximo daquele formado com o inibidor original co-cristalizado. Portanto, os compostos **3a-c** podem ser considerados aptos a atuarem como potenciais agentes antioxidantes promissores.

Agradecimentos



Aos órgãos de fomento que financiaram a pesquisa: CAPES, FACEPE, CNPq. Aos laboratórios da UFRPE: LEQS e LPNBio. E as centrais analíticas do DQF, CENAPESQ e LABMAQ.

Referências

- ARCON, J. P.; DEFELIPE, L. A.; MODENUTTI, C. P.; LÓPEZ, E. D.; ALVAREZ-GARCIA, D.; BARRIL, X.; TURJANSKI, A. G.; MARTÍ, M. A. Molecular dynamics in mixed solvents reveals protein–ligand interactions, improves docking, and allows accurate binding free energy predictions. **Journal of chemical information and modeling**, 57(4), 846-863, 2017.
- AYOUP, M. S.; ABU-SERIE, M. M.; ABDEL-HAMID, H.; TELEB, M. 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**, 220, 113475, 2021.
- CAMCI, M.; KARALI, N. Bioisosterism: 1, 2, 4-Oxadiazole Rings. **ChemMedChem**, 18(9), e202200638, 2023.
- CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and chemical toxicology**, 51, 15-25, 2013.
- DE AGUIAR, A. P.; CUNHA, F. S. Síntese e Bioatividade de 1, 2, 4-oxadiazóis. **Revista Virtual de Química**, 7(6), 2509-2530, 2015.
- DU, W.; TRUONG, Q.; QI, H.; GUO, Y.; CHOBANIAN, H. R.; HAGMANN, W. K.; HALE, J. J. A one-pot synthesis of 3-substituted-5-carbonylmethyl-1, 2, 4-oxadiazoles from β -keto esters and amidoximes under solvent-free conditions. **Tetrahedron letters**, 48(13), 2231-2235, 2007.
- FLIEGER, J.; FLIEGER, W.; BAJ, J.; MACIEJEWSKI, R. Antioxidants: Classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles. **Materials**, 14(15), 4135, 2021.
- FOKOUÉ, H. H.; PINHEIRO, P. S.; FRAGA, C. A.; SANT'ANNA, C. M. Há algo novo no reconhecimento molecular aplicado à química medicinal?. **Química Nova**, 43, 78-89, 2020.
- GONG, X.; XI, G.; LIU, Z. Activity of coumarin–oxadiazole-appended phenol in inhibiting DNA oxidation and scavenging radical. **Tetrahedron letters**, 56(45), 6257-6261, 2015.
- LIU, Y.; GUO, H. Solubility determination and crystallization thermodynamics of an intermediate in different organic solvents. **Journal of Molecular Liquids**, 339, 116-821, 2021.
- MENEGATTI, R.; FRAGA, M. A. C.; BARREIRO, J. E. A. Importância da síntese de fármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, 3, 16-22, 2001.
- NEHA, K.; HAIDER, M. R.; PATHAK, A.; YAR, M. S. Medicinal prospects of antioxidants: A review. **European journal of medicinal chemistry**, 178, 687-704, 2019.
- PEARCE, S. The importance of heterocyclic compounds in anti-cancer drug design. **Drug Discovery**, 18(2), 66-70, 2017.
- PISOSCHI, A. M.; POP, A.; IORDACHE, F.; STANCA, L.; PREDOI, G.; SERBAN, A. I. Oxidative stress mitigation by antioxidants-an overview on their chemistry and influences on health status. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 209, 112891, 2021.
- TIAN, T.; WANG, Z.; ZHANG, J. Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017(1), 1–18, 2017.
- YATAM, S.; JADAV, S. S.; GUNDLA, R.; GUNDLA, K. P.; REDDY, G. M.; AHSAN, M. J.; CHIMAKURTHY, J. 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**, 3(37), 10305-10310, 2018.