



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



**ANDREY DA SILVA BARBOSA**

**NOVOS INIBIDORES COMPETITIVOS DA ENZIMA HIDRÓXI-QUINURENINA  
TRANSAMINASE DE *Aedes Aegypti* CONTENDO O ANEL DO 1,2,4-  
OXADIAZOL**

Recife

2019

**ANDREY DA SILVA BARBOSA**

**NOVOS INIBIDORES COMPETITIVOS DA ENZIMA HIDRÓXI-QUINURENINA  
TRANSAMINASE DE *AEDES AEGYPTI* CONTENDO O ANEL DO 1,2,4-  
OXADIAZOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco como requisito final à obtenção do título de Mestre em Química.

**Área de concentração:** Química Orgânica.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janaína Versiani dos Anjos.

Recife

2019

Catalogação na fonte  
Bibliotecária Mariana de Souza Alves CRB4-2106

B238n    Barbosa, Andrey da Silva.  
          Novos inibidores competitivos da enzima hidróxi-quinurenina  
          transaminase de aedes aegypti contendo o anel do 1,2,4-  
          oxadiazol/ Andrey da Silva Barbosa. – 2019.  
          108 f.: il., fig., tab.

          Orientadora: Janaína Versiani dos Anjos  
          Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de  
          Pernambuco. CCEN. Química. Recife, 2019.  
          Inclui referências e apêndices.

          1. Química Orgânica. 2. Aedes aegypti. 3. 3-hidróxi-  
          quinurenina. 4. AeHKT, 1,2,4-oxadiazol. I. Anjos, Janaína Versiani  
          dos (orientadora). II. Título.

547

CDD (22. ed.)

UFPE-FQ 2019-79

**ANDREY DA SILVA BARBOSA**

**“NOVOS INIBIDORES COMPETITIVOS DA ENZIMA HIDRÓXI-QUINURENINA  
TRANSAMINASE DE *Aedes Aegypti* CONTENDO O ANEL DO 1,2,4-  
OXADIAZOL”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco como requisito final à obtenção do título de Mestre em Química.

**Área de concentração:** Química Orgânica.

Aprovado em 18 de julho de 2019.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Janaína Versiani dos Anjos (Orientadora)**

Universidade Federal de Pernambuco  
Departamento de Química Fundamental

---

**Prof. Thereza Amélia**

Universidade Federal de Pernambuco  
Departamento de Química Fundamental

---

**Prof. Márcia Silva do Nascimento**

Universidade Federal de Pernambuco  
Departamento de Antibióticos

*Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos,  
familiares e amigos por todo o apoio e  
encorajamento.*

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Janaína Versiani dos Anjos pela oportunidade de participar deste projeto, pela orientação, discussões e ensinamentos.

Às pesquisadoras Maria Helena Neves e Tatiany Romão do Departamento de Entomologia - CPqAM/FIOCRUZ pela colaboração e realização dos ensaios de inibição enzimática.

À doutoranda Larissa Gonçalves Maciel pelo auxílio na realização dos ensaios enzimáticos.

Aos amigos Elton Marlon e Hanna Almeida por todos os momentos de descontração, aconselhamento, e que foram verdadeiramente minha família durante essa jornada.

Aos amigos e amigas Cláudia, Ivonne, Jenny, Angelina, Renato, Cléverton, Jonh e Emmanuel pelos momentos de descontração, troca de conhecimentos e amizade.

Aos integrantes do Laboratório de Síntese Orgânica Michael, Sidney, Sayonara, Paulo pelas discussões, auxílios nos experimentos e companheirismo.

Aos técnicos da Central Analítica e secretários da Pós-Graduação.

Às professoras Dulce Maria de Araújo Melo e Renata Martins Braga do Laboratório de Tecnologia Ambiental/UFRN pela realização das análises de FT-IR.

À técnica Júlia Campos do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste/CETENE pela realização das análises de Espectroscopia de Massa de Alta Resolução via MALDI-TOF.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

Os mosquitos da espécie *Ae. aegypti* são responsáveis pela transmissão de diversos arbovírus, como os da Dengue, Zika e febre Chikungunya que, uma vez contraídos pelo hospedeiro, acarretam em doenças com risco de vida iminente no mundo. Uma das maneiras de diminuir a prevalência destas síndromes é o controle populacional dos mosquitos dessa espécie. Uma estratégia escolhida para realizar este controle pode ser o uso de larvicidas sintéticos, que é o cerne central deste trabalho: desenvolver, sintetizar, derivatizar, caracterizar e testar novos candidatos sintéticos para uso no controle populacional do *A. aegypti*. Nossa hipótese é de que estes larvicidas atuam interferindo no metabolismo do triptofano nos insetos, mais especificamente durante a etapa de transaminação da 3-hidróxi-quinurenina (3-HK) para o ácido xanturênico (AX) pela enzima HKT. Isto causaria o acúmulo da 3-HK, intermediário metabólico tóxico para os insetos, implicando na apoptose das células neuronais do *A. aegypti*. Foram sintetizados 19 novos 4-(3-*aril*-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoatos de sódio cujas estruturas foram confirmadas utilizando RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , espectroscopia no infravermelho e espectrometria de massas via MALDI-TOF. Depois de sintetizados, os 19 sais foram testados frente à capacidade de inibição da enzima HKT recombinante de *A. aegypti*. O teste foi realizado utilizando um método espectrométrico *ex vivo* a partir da formação de um complexo entre o íon  $\text{Fe}^{+3}$  e o ácido xanturênico que pode ser formado pela reação da enzima HKT usando a 3-HK como substrato e um dos sais de oxadiazol sintetizados como inibidor. Os ensaios de inibição enzimática evidenciaram que os compostos sintetizados têm um bom potencial de inibição da enzima HKT, confirmando nossa hipótese inicial. Os compostos contendo os grupos *p*-anisóila e *p*-trifluorometila exibiram os melhores valores de  $\text{IC}_{50}$ , 35,0 e 42,3 mM, respectivamente. Os resultados mostraram, em linhas gerais, que os inibidores que possuem substituintes doadores de densidade eletrônica têm menores valores de  $\text{IC}_{50}$ , sendo, portanto, candidatos mais promissores a inibidores da HKT de *A. aegypti*.

**Palavras-chave:** *Aedes aegypti*. 3-hidróxi-quinurenina. AeHKT, 1,2,4-oxadiazol.

## ABSTRACT

*Aedes aegypti* mosquitoes are responsible for the transmission of several arboviruses, such as Dengue, Zika and Chikungunya fever. Those arbovirus, once acquired, lead to life-threatening diseases across the world. One way for decreasing the prevalence of these syndromes would be the control of mosquitoes population. A strategy to carry out this control may be the use of synthetic larvicides, which is at the main objective of this work: to develop, synthesize, derivatize, characterize and to test new synthetic candidates for use in the control of *A. aegypti* population. Our hypothesis is that these larvicides would act interfering the tryptophan metabolism in insects, more specifically during the transamination step of 3-hydroxy-quinurenine (3-HK) to xanthurenic acid (AX) by means of the HKT enzyme. This would cause the accumulation of 3-HK, a toxic metabolic intermediate to the insect, causing neuronal cells apoptosis in *A. aegypti*. Nineteen new sodium 4-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propanoates were synthesized and their structures were confirmed using  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, infrared spectroscopy and mass spectrometry. The 19 salts had then their inhibitory activity tested in the recombinant HKT enzyme of *A. aegypti*. The tests were performed using an *ex vivo* spectrometric method based on the formation of a  $\text{Fe}^{+3}$  ion and xanthurenic acid complex using 3-HK as the reaction substrate and one of the synthesized oxadiazole salts as the inhibitor. Enzyme inhibition assays have shown that the synthesized compounds have a good potential for HKT inhibition, confirming our initial hypothesis. Compounds containing the *p*-anisoyl and *p*-trifluoromethyl moieties exhibited the best  $\text{IC}_{50}$  values, 35.0 and 42.3 mM, respectively. The results showed, in general terms, that compounds having electron donor substituents have lower  $\text{IC}_{50}$  values, being more promising candidates for *A. aegypti* HKT inhibitors.

**Keywords:** *Aedes aegypti*. 3-hydroxy-quinurenine. AeHKT. 1,2,4-oxadiazole.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição de casos prováveis de Dengue por semana ao longo dos anos 2014 a 2016 (Adaptado de SVS/MS, 2016).....	19
Figura 2 -	Incidência (/100 mil hab.) de febre pelo vírus Zika por município de residência em 2016 (Adaptado de SVS/MS, 2016). ....	20
Figura 3 -	Distribuição de casos prováveis de febre de Chikungunya, por semana, ao longo dos anos de 2015 a 2016 (Adaptado de SVS/MS, 2016).....	21
Figura 4 -	Ciclo biológico da <i>Aedes aegypti</i> iniciado pela ovoposição, eclosão, passagem por 4 estágios larvais, pupa e adulto (autor).....	22
Figura 5 -	Mapa global da distribuição de <i>Aedes aegypti</i> . Probabilidade de ocorrência (de 0 azul para 1 vermelho) (Kraemer <i>et al.</i> , 2015). ....	23
Figura 6 -	Principais classes de inseticidas orgânicos utilizados no controle de insetos (autor).....	24
Figura 7 -	Estruturas químicas do Temefós e do Propoxur, inseticidas representantes da classe Organofosforados e Carbamatos, respectivamente (autor). ....	25
Figura 8 –	(a) <i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i> , (b) Piretrina e (c) Piretróide (autor). ....	26
Figura 9 –	Via das quinureninas e principais produtos por espécies (autor).....	27
Figura 10 -	Via das quinureninas em mosquitos. TDO: triptofano dioxigenase; KFM: quinurenina formamidase; KMO: quinurenina monooxigenase; KAT: quinurenina aminotransferase; HKT: 3-hidróxi-quinurenina transaminase (Han <i>et al.</i> 2007). ....	28
Figura 11 –	Ação das enzimas transaminases HKT e AGT de <i>Aedes aegypti</i> (Han <i>et al.</i> 2006). ....	29
Figura 12 -	Comparação estrutural entre o inibidor testado e um protótipo proposto por nosso grupo (autor). ....	30
Figura 13 –	Estrutura geral dos 1,2,4-oxadiazóis (autor). ....	30
Figura 14 –	Estruturas de 1,2,4-oxadiazóis biologicamente ativos (autor). ....	34

Figura 15 -	Atuação do larvicida e evidência do acúmulo de 3-HK em larvas de <i>Aedes aegypti</i> (autor). .....	38
Figura 16 –	Espectro de infravermelho do sal sódico 2a. ....	44
Figura 17 -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) do sal sódico 2a. ....	45
Figura 18 -	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) do sal sódico 2a. ....	46
Figura 19 –	Espectro de infravermelho do sal sódico 2e. ....	47
Figura 20 –	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) do sal sódico 2e. ....	48
Figura 21 -	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) do sal sódico 2e. ....	49
Figura 22 –	Espectro de infravermelho do sal sódico 2i. ....	50
Figura 23 -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) do sal sódico 2i. ....	51
Figura 24 –	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) do sal sódico 2i. ....	52
Figura 25 –	Espectro de infravermelho do sal sódico 2o. ....	53
Figura 26 –	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) do sal sódico 2o. ....	54
Figura 27 -	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) do sal sódico 2o. ....	55
Figura 28 –	Modelo cinético de inibição de Michaelis-Menten na presença e ausência do inibidor 2a. ....	56
Figura 29 –	Gráfico de Lineweaver-Burk para cinética da reação na presença e ausência do inibidor 2a. ....	57
Figura 30 –	Curva Dose-Resposta da reação de inibição entre AeHKT e o composto 2d. ....	58
Figura 31 –	Curvas Dose-Resposta para a atividade de todos os 19 inibidores 2a-s. ....	58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Derivações da cadeia alquílica alifática e atividade larvícida dos 1,2,4-oxadiazóis. ....	35
Tabela 2 -	Dados experimentais das substâncias <b>2a-s</b> . ....	42
Tabela 3 -	Valores de $CI_{50}$ , dos sais de oxadiazóis sintetizados, da reação de inibição da HKT. ....	60
Tabela 4 –	Rendimento percentual, ponto de fusão e solvente de recristalização dos ácidos obtidos comparados com valores encontrados na literatura. ....	64

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Formação de oxadiazóis via reação de amidoximas com ácido carboxílico e anidrido succínico. ....	31
Esquema 2 – Formação de 1,2,4-oxadiazol via acilação da benzamidoxima com cloreto de acetila, seguido de ciclização com TBAF. ....	32
Esquema 3 – Formação de 1,2,4-oxadiazol com um resíduo de L-alanina na cadeia lateral do C-5. ....	32
Esquema 4 – Formação do 1,2,4-oxadiazol via micro-ondas, reação livre de solvente. ....	33
Esquema 5 – Síntese do 3-fenil-5-(p-clorofenil)-1,2,4-oxadiazol via micro-ondas, livre de solvente. ....	33
Esquema 6- Síntese geral dos sais sódicos <b>2a-s</b> . ....	41
Esquema 7 - Formação da arilamidoxima a partir de nitrilas aromáticas. ....	43
Esquema 8 - Mecanismo de formação do ácido 4-[3-(Aril)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanóico .....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2C	Série de ácidos 4-(3-Aril-1,2,4-oxadiazol-5-il) etanóicos
3-HK	3-hidróxi-quinurenina
3C	Série de ácidos 43-(3-Aril-1,2,4-oxadiazol-5-il) propanóicos
4C	Série de ácidos 4-(3-Aril-1,2,4-oxadiazol-5-il) butanóicos
Ar	Grupo arila
AX	Ácido xanturênico
AChE	Acetilcolinesterase
AeAGT	Alanina glioxilato transferase de <i>Aedes aegypti</i>
AeHKT	3-hidróxi-quinurenina transaminase de <i>Aedes aegypti</i>
AnHKT	3-hidróxi-quinurenina transaminase de <i>Anopheles gambiae</i>
BHC	Benzeno-hexacloro
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDI	<i>N,N'</i> -carbonildiimidazol
CHIKV	Vírus da Chikungunya
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória para 50% da população de receptores
CL <sub>50</sub>	Concentração letal para 50% da população de indivíduos
d	Dupleto
dd	duplo dupleto
DCC	Dicicloexilcarbodiimida
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DENV	Vírus da Dengue
EMAR	Espectrometria de Massa de Alta Resolução
EtOH	Etanol
FT-IR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
ERONs	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

GenBank	Banco de genes
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HCH	Hexaclorociclohexanos
HKT	3-hidróxi-quinurenina transaminase
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
KAT	Quinurenina aminotransferase
KFM	Quinurenina formamidase
KMO	Quinurenina monooxigenase
m	Multiplete
MS	Ministério da Saúde
MeOH	Metanol
NAD <sup>+</sup>	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina no estado oxidado
OMS	Organização Mundial de Saúde
ppm	Parte por milhão
P.F.	Ponto de Fusão
PLP	Piridoxal-5-fosfato
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RO	Rondônia
s	Simpleto
SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretária de Vigilância em Saúde
t	Triplete
T.A.	Temperatura Ambiente
TBAF	Fluoreto de tetrabutylamônio

TBTU	Tetrafluorborato de 2-(1- <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio
TDO	Triptofano dioxigenase
THF	Tetraidrofurano
YFV	Vírus da Febre Amarela
ZIKV	Vírus da Zika
$\delta$	Deslocamento químico

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA .....	18
1.1	Arboviroses transmitidas pelo mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	18
1.2	<i>Aedes aegypti</i> .....	21
1.3	Controle populacional de mosquitos .....	23
1.4	Via das quinureninas .....	26
1.5	Os 1,2,4-oxadiazóis .....	30
1.6	1,2,4-Oxadiazóis e seu uso na interrupção do ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> .....	34
2	OBJETIVOS.....	40
2.1	Objetivos Gerais.....	40
2.2	Objetivos Específicos .....	40
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
3.1	Síntese dos sais sódicos de 1,2,4-oxadiazóis .....	41
3.2	Caracterização dos 4-[3-(aril)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoatos de sódio .. .....	44
3.3	Cinética de inibição enzimática .....	55
3.4	Estudo da inibição da AeHKT recombinante pelos sais sintetizados 2a-s ... .....	57
4	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	61
5	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	63
5.1	Procedimentos gerais .....	63
5.2	Equipamentos utilizados .....	63
5.3	Síntese dos ácidos 3-(aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanóicos .....	64
5.4	Síntese dos 3-(aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoatos de sódio .....	66
5.5	Clonagem, expressão e purificação da enzima 3-HKT recombinante de <i>Aedes aegypti</i> .....	71



<b>5.6</b>	<b>Ensaio de inibição enzimática .....</b>	<b>71</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>72</b>
	<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>79</b>
	<b>APÊNDICE B .....</b>	<b>80</b>
	<b>APÊNDICE C .....</b>	<b>81</b>
	<b>APÊNDICE D .....</b>	<b>82</b>
	<b>APÊNDICE E .....</b>	<b>83</b>
	<b>APÊNDICE F .....</b>	<b>84</b>
	<b>APÊNDICE G .....</b>	<b>85</b>
	<b>APÊNDICE H .....</b>	<b>86</b>
	<b>APÊNDICE I .....</b>	<b>87</b>
	<b>APÊNDICE J .....</b>	<b>88</b>
	<b>APÊNDICE L .....</b>	<b>89</b>
	<b>APÊNDICE K .....</b>	<b>90</b>
	<b>APÊNDICE M .....</b>	<b>91</b>
	<b>APÊNDICE N .....</b>	<b>92</b>
	<b>APÊNDICE O .....</b>	<b>93</b>
	<b>APÊNDICE P .....</b>	<b>94</b>
	<b>APÊNDICE Q .....</b>	<b>95</b>
	<b>APÊNDICE R .....</b>	<b>96</b>
	<b>APÊNDICE S .....</b>	<b>97</b>
	<b>APÊNDICE T .....</b>	<b>98</b>
	<b>APÊNDICE U .....</b>	<b>99</b>
	<b>APÊNDICE V .....</b>	<b>100</b>
	<b>APÊNDICE W .....</b>	<b>101</b>
	<b>APÊNDICE X .....</b>	<b>102</b>

<b>APÊNDICE Y</b> .....	103
<b>APÊNDICE Z</b> .....	104
<b>APÊNDICE AA</b> .....	105
<b>APÊNDICE BB</b> .....	106
<b>APÊNDICE CC</b> .....	107
<b>APÊNDICE DD</b> .....	108

## 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Arboviroses transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti*

Os arbovírus formam um grupo bastante heterogêneo de vírus transmitidos por artrópodes hematófagos. Os arbovírus mais populares no Brasil são pertencentes à família *Flaviviridae*, responsável, entre outros, pelos vírus causadores da Febre Amarela, Dengue e Zika (CALISHAR, 1989; MUSSO e GUBLER, 2016); e também à família *Togaviridae* responsável pelo vírus do gênero *Alphavirus*, causador da Febre Chikungunya (ROSSINI *et al.* 2016). Tais vírus causam infecções assintomáticas ou doenças febris em humanos em ciclos silvestres e urbanos, e podem ser encontrados em uma extensa distribuição geográfica, devido à presença do inseto vetor (HIGUERA; RAMÍREZ, 2019).

Essas arboviroses necessitam de transmissão horizontal entre o infectado vertebrado e o vetor para manter a replicação e manutenção da sua população (GUBLER, 1997; WEAVER, 2006). Entretanto, outras vias de transmissão na ausência de vetores já foram relatadas pela literatura, incluindo transfusões sanguíneas (TAMBYAH *et al.*, 2008; TOMASHEK e MARGOLIS, 2011), transplantes de órgãos (TAN *et al.*, 2005), infecções hospitalares (CLARK *et al.*, 2012; WAGNER *et al.*, 2004), relações sexuais (OSTER, 2016) e transmissão de mãe para filho (FRITEL *et al.*, 2010; GÉRARDIN *et al.*, 2008; TAN *et al.*, 2008).

Os vírus pertencentes às famílias *Flaviviridae* e *Togaviridae* têm genoma de RNA de fita positiva simples, o que quer dizer que o material genético deles pode ser usado diretamente para a produção de proteínas nas células, e são caracterizados pela presença de envelope e possuem simetria icosaédrica (HIGUERA; RAMÍREZ, 2019). O vírus da Dengue possui quatro diferentes sorotipos (DENV 1 a 4) (CALISHER, 1989). Em contrapartida, os vírus da Febre Amarela (YFV), Zika (ZIKV) e Chikungunya (CHIKV) possuem apenas um sorotipo cada (HADDOW, 2012; NUNES *et al.*, 2015). O flavivírus mais estudado é o causador da Dengue, e essa foi a segunda doença humana descoberta como causada por vírus e transmitida por mosquitos. Ocorrem cerca de 400 milhões de casos de Dengue por ano no mundo (WILDER-SMITH *et al.*, 2019).

No Brasil, os primeiros dados de incidência de casos de Dengue datam de 1916 (MEIRA, 1916) na cidade de São Paulo e mais tarde no Rio de Janeiro, em 1923 (PEDRO, 1923). Já em 1982, Osanai (1984) registrou o primeiro surto epidêmico de Dengue na cidade de Boa Vista (RO) com 11 mil infectados pelos sorotipos DENV1 e DENV4, que foram

isolados nesse mesmo período. Mais recentemente, entre os anos de 2014 e 2016, o país passou por períodos de constantes epidemias de Dengue, a Figura 1 mostra a distribuição de casos prováveis de Dengue, somatório de casos por semana, ao longo dos anos 2014 a 2016, sendo registrados um total de 589.107; 1.688.688; 1.487.924 casos prováveis, respectivamente, para os anos de 2014, 2015 e 2016 (SVS/MS, 2016). A nomenclatura “casos prováveis” é utilizada pelo Ministério da Saúde para incluir todos os casos notificados, com exceção aqueles que já foram descartados. Segundo o Ministério da Saúde, em 2015 foram registrados 1.680 casos de Dengue grave e 21.155 casos de sinais de alerta. Já em 2016 foram registrados 826 casos de Dengue grave e 8.116 casos de alerta. Os casos de Dengue grave, Dengue com sinais de alarme e óbitos de Dengue, Chikungunya e Zika informados incluem somente os casos ou óbitos confirmados por critério laboratorial ou por critério clínico epidemiológico (SVS/MS, 2016). Vale ressaltar que em 2016 a região Sudeste registrou a maior quantidade de casos no Brasil.

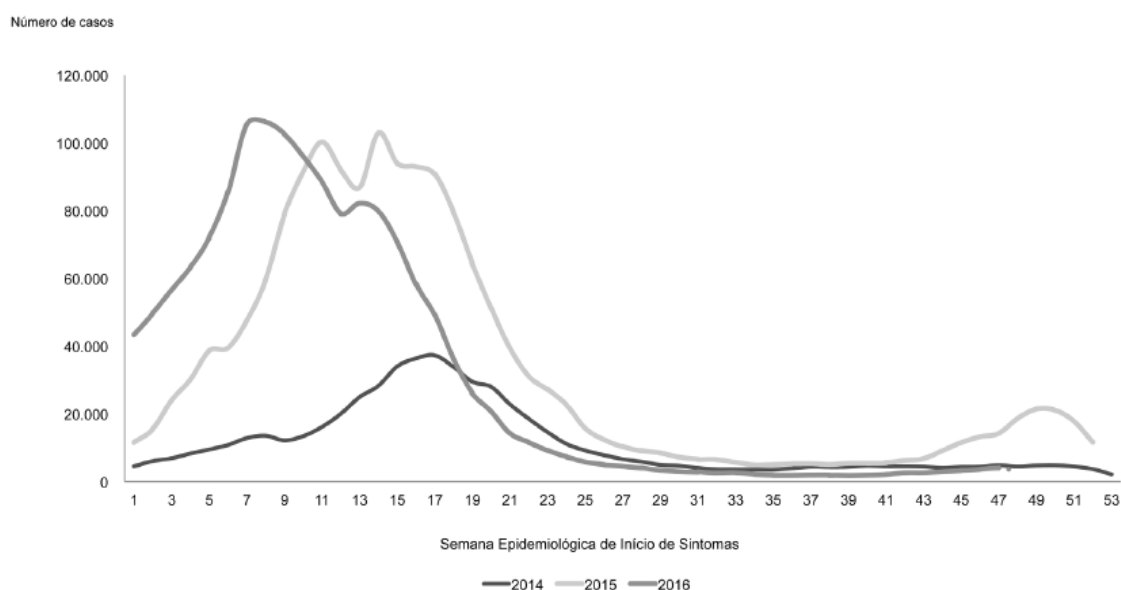


Figura 1 - Distribuição de casos prováveis de Dengue por semana ao longo dos anos 2014 a 2016 (Adaptado de SVS/MS, 2016).

Mesmo com o desenvolvimento de vacinas que potencialmente protejam contra a Dengue, como já acontece com a Febre Amarela, ainda são necessárias políticas públicas que visem a eliminação do inseto vetor. Isto é devido ao fato de que outros vírus causadores de arboviroses podem fazer uso dos mesmos mosquitos vetores e dependem das mesmas

condições para circularem. Um fato que corrobora com esta afirmação foi a circulação dos vírus causadores das febres Zika e Chikungunya no Brasil entre os anos de 2014/2015 e que persistem até os dias atuais. Após um alarmante número de casos de microcefalia em bebês recém-nascidos, causados por uma síndrome decorrente da infecção pelo vírus Zika, foi possível diferenciar as arboviroses. Até então, como as doenças apresentavam manifestações clínicas semelhantes, a identificação do vírus causador era dificultada.

Segundo o Ministério da Saúde, os primeiros casos do vírus Zika ocorrem a partir de abril de 2015; no ano seguinte foram registrados 211.770 casos prováveis em 2.280 municípios e 59,7% dos casos foram confirmados. A Figura 2 mostra a incidência de casos prováveis de Zika no Brasil, e claramente pode-se observar que a região Centro-Oeste apresentou a maior quantidade de casos registrados (SVS/MS, 2016).

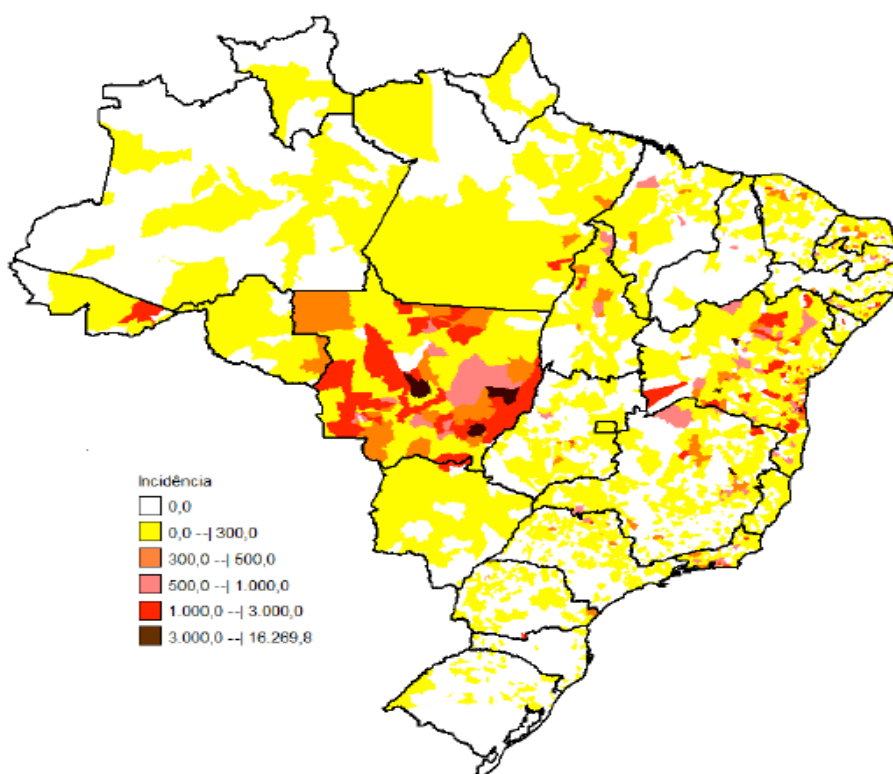


Figura 2 - Incidência (/100 mil hab.) de febre pelo vírus Zika por município de residência em 2016 (Adaptado de SVS/MS, 2016).

Neste período, 10.769 gestantes foram infectadas com vírus Zika e até 2018 foram registrados 2.819 casos de recém-nascidos que apresentaram algum grau de microcefalia (SVS/MS, 2018). Já com relação à febre Chikungunya, em 2015, foram notificados 38.332

casos prováveis e 34,5% desses casos foram confirmados. Em 2016, foram registrados 263.598 casos prováveis em 2.752 municípios, sendo que 55% desses casos foram confirmados e a região de maior incidência no país foi a região Nordeste (SVS/MS, 2016). A diferença nos números de casos de febre Chikungunya pode ser melhor visualizada na Figura 3 que mostra a distribuição de casos prováveis de febre Chikungunya, somatório de casos por semana, nos anos de 2015 a 2016.

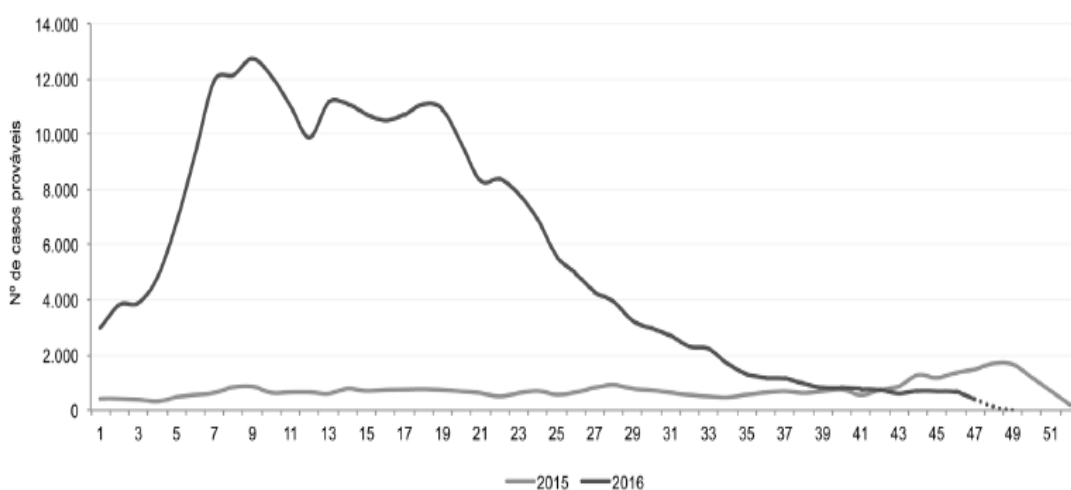


Figura 3 - Distribuição de casos prováveis de febre de Chikungunya, por semana, ao longo dos anos de 2015 a 2016 (Adaptado de SVS/MS, 2016).

## 1.2 *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes aegypti* é um artrópode da família *Culicidae* e teve sua origem na África subsaariana a partir de um ancestral selvagem, a subespécie *Aedes aegypti formosus*, que possui hábitos bastante diferentes do *Aedes aegypti*. Acredita-se que em algum momento, há milhares de anos atrás, essa subespécie selvagem passou a conviver com os humanos e ganhou a preferência por se alimentar de seu sangue. O *Aedes aegypti* espalhou-se mundialmente graças à mobilidade do homem e conseguiu se adaptar às mudanças que a humanidade foi submetida e também às que foram provenientes da evolução dos hábitos humanos, e devido a isso é considerado um animal sinantropo – evolui com a humanidade, mesmo que involuntariamente. O mosquito se adaptou facilmente aos ambientes urbanos, adquirindo hábitos diurnos para alimentação sanguínea e disseminação de ovos. A Figura 4 demonstra o ciclo biológico do mosquito, que vai desde a postura de ovos, passando por

quatro estágios larvais, seguido pela formação de pupa e finalmente concluindo com a forma adulta (TOWNSON, 1993).

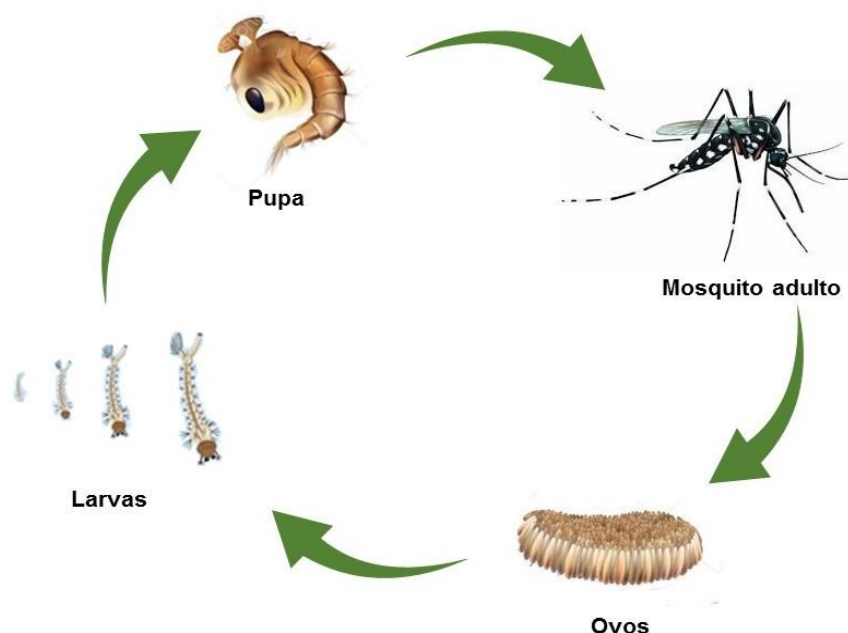


Figura 4 - Ciclo biológico da *Aedes aegypti* iniciado pela ovoposição, eclosão, passagem por 4 estágios larvais, pupa e adulto (autor).

O mosquito *Aedes aegypti* macho alimenta-se apenas de néctar de plantas, enquanto a fêmea é hematófaga e o vetor responsável pela transmissão dos arbovírus quando da sua alimentação de sangue. Esse mosquito prefere regiões de clima quente e úmido que são adequadas ao seu ciclo reprodutivo, como mostrado na Figura 5, o mapa global de distribuição de *A. aegypti* pelo mundo (KRAEMER *et al.*, 2015).

A fêmea deposita seus ovos em recipientes com água parada, de preferência limpa, chamados de criadouros. Estes criadouros, nos centros urbanos, podem variar desde caixas d'água, vasos de plantas, pneus velhos e até mesmo tampas de garrafas. A presença de criadouros é um forte indicativo da crescente população de mosquito em uma determinada região, e sua eliminação, quando possível, com o uso de inseticidas químicos serve como forma de controle para impedir ciclo biológico de desenvolvimento do mosquito.

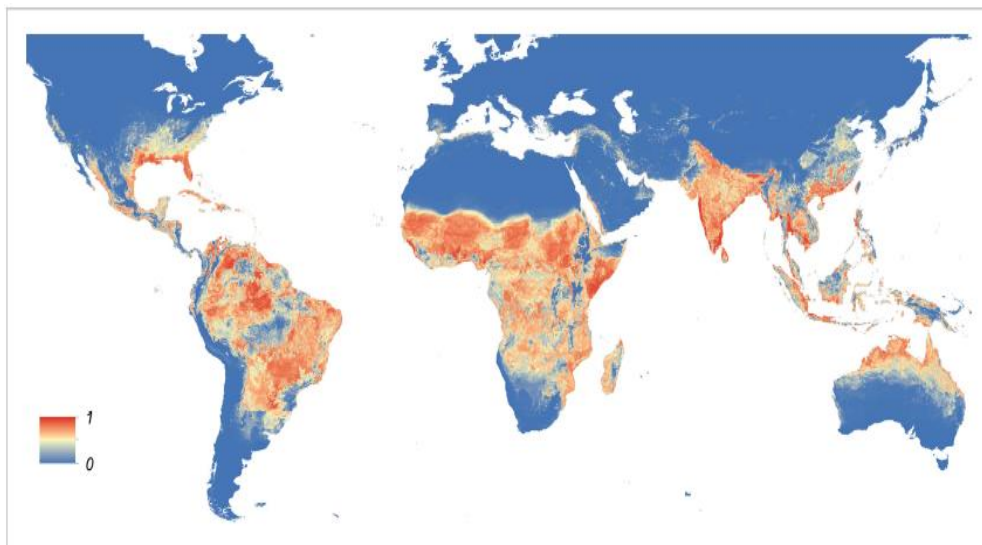


Figura 5 - Mapa global da distribuição de *Aedes aegypti*. Probabilidade de ocorrência (de 0 azul para 1 vermelho) (Kraemer *et al.*, 2015).

Responsável pela transmissão de arboviroses, o *A. aegypti* ficou conhecido, inicialmente, pela disseminação da Febre Amarela. A Febre Amarela foi erradicada em boa parte do mundo com a produção de vacinas eficazes. Atualmente, o mosquito é mais conhecido pela transmissão de outras arboviroses como Dengue, febre Zika e febre Chikungunya. A produção de vacinas para os arbovírus causadores dessas doenças ainda é ineficiente, isso porque fatores como a variabilidade genética, determinação dos mecanismos de proteção imunológicas, tempo de desenvolvimento e a não manifestação dos sintomas das doenças em modelos animais convencionais são fatores limitantes na produção de vacinas para essas doenças (BARRET *et al.*, 2006; WHITEHEAD *et al.*, 2007; WEBSTER *et al.*, 2009). Assim, a melhor forma de combate a essas doenças ainda é o controle da população de mosquitos vetores através da eliminação de criadouros e pela adição de larvicidas e/ou uso de inseticidas.

### 1.3 Controle populacional de mosquitos

Controlar mosquitos transmissores de doenças não é uma tarefa fácil, principalmente depois que mosquitos como o *Aedes aegypti* se espalharam mundialmente com o deslocamento da humanidade entre continentes e se adaptaram a ambientes urbanos. Não existe uma única forma de controlar o *A. aegypti*; no entanto, um conjunto de medidas e



métodos, como controles biológico, químico, mecânico, biotecnológico entre outros, podem ser utilizados de forma integrada no combate efetivo desses mosquitos. Entre os métodos de controle citados podemos destacar o controle químico como uma das formas mais efetivas e utilizadas atualmente.

O controle químico consiste na utilização de inseticidas orgânicos ou inorgânicos, sendo estes últimos ambientalmente inviáveis, já que a maioria possui metais pesados em suas estruturas, apresentando alta toxicidade para os seres vivos (SANCHES, 2003). Os inseticidas orgânicos mais utilizados pertencem aos grupos dos organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides, todos estes atuando diretamente no sistema nervoso dos insetos (APONTE *et al.*, 2013; KISHK *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2018), conforme apresentado na Figura 6. Esses inseticidas, dependendo do momento de interrupção do ciclo de vida do inseto, podem ser ainda divididos em larvicidas e mosquitocidas (MELONI *et al.*, 2018).

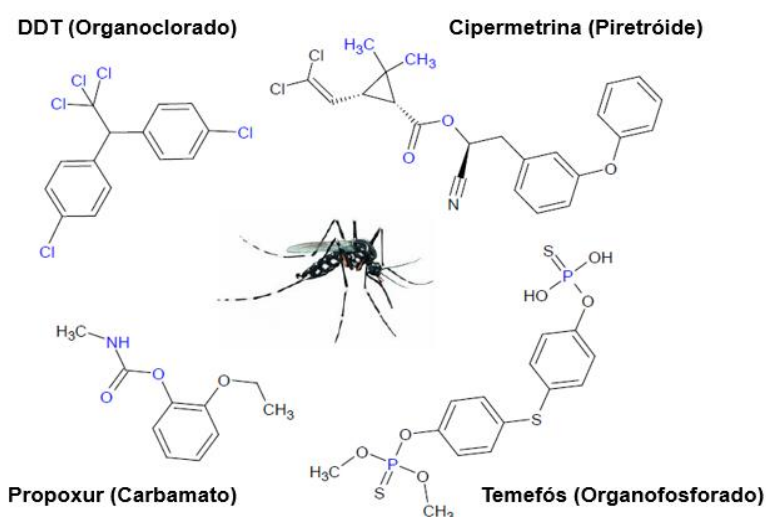


Figura 6 - Principais classes de inseticidas orgânicos utilizados no controle de insetos (autor).

O primeiro inseticida organoclorado sintetizado foi o diclorodifeniltricloroetano (DDT) em 1874 por O. Zeidler. Contudo, seu uso efetivo como inseticida começou a partir de 1939 com Paul Müller. Os organoclorados são divididos em quatro grupos: difenilalifáticos, hexaclorociclohexanos, ciclodienos e policloroterpenos. O primeiro grupo de inseticidas sintéticos é o dos difenilalifáticos, no qual o DDT faz parte. Outro organoclorado conhecido é o benzeno-hexacloro (BHC), que faz parte do grupo dos hexaclorociclohexanos e atua de forma semelhante ao DDT, e comercialmente é conhecido como Lindano. Nos demais grupos destacam-se o clordano e aldrina que fazem parte dos ciclodienos, Toxafeno e Estrobane que

fazem parte dos policloroterpenos. Esses organoclorados atuam inibindo receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), aumentando a permeabilidade aos íons cloreto nas membranas dos neurônios. Apesar de terem sido bastante utilizados no passado, a Organização Mundial de Saúde (OMS) não recomenda o uso de inseticidas organoclorados devido à sua bioacumulação no meio ambiente e em tecidos animais (NEWTON, 2018, ATTAULLAH *et al.*, 2018).

Os organofosforados são inibidores irreversíveis da enzima acetilcolinesterase (AChE), uma importante enzima no sistema nervoso, responsável pela degradação da acetilcolina (KING e AARON, 2015). Organofosforados podem ser divididos em alifáticos, aromáticos, heterocíclicos, e diferentemente dos organoclorados não se acumulam no meio ambiente e tecidos animais. O Temefós é um organofosforado aromático recomendado pela OMS como larvicida a ser utilizado em água potável e sua estrutura química está na Figura 7.

Com um modo de ação análogo, os carbamatos também são inseticidas anticolinesterásicos. Derivados do ácido carbâmico, esta classe de inseticidas surge como melhor opção em relação aos organofosforados, pois são inibidores reversíveis da acetilcolinesterase, estáveis e menos tóxicos (ECOBICHON, 1994). No entanto, esta classe de inseticidas vem sendo apontada como responsável pela geração de neoplasias e alterações na resposta imune em seres humanos (DHOUIB *et al.*, 2016). Propoxur, Carbaril e Carbofurano são alguns exemplos de carbamatos disponíveis comercialmente (BRAGA; VALLE, 2007; SANTALADCHAIYAKIT *et al.*, 2012) e a estrutura química do Propoxur é apresentada na Figura 7.

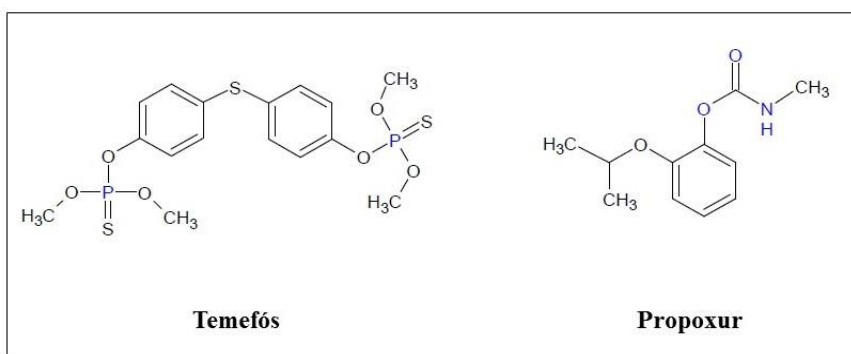


Figura 7 - Estruturas químicas do Temefós e do Propoxur, inseticidas representantes da classe Organofosforados e Carbamatos, respectivamente (autor).

Já os piretróides são inseticidas sintéticos derivados das piretrinas (observado na Figura 8) que, por sua vez, são inseticidas naturais encontrados em flores de *Chrysanthemum cinerariifolium*. Esses inseticidas são neurotoxinas que atuam prolongando a abertura dos canais de sódio, num mecanismo de ação análogo aos inseticidas organoclorados (LUND; NARAHASHI, 1981; LUND; NARAHASHI, 1981).

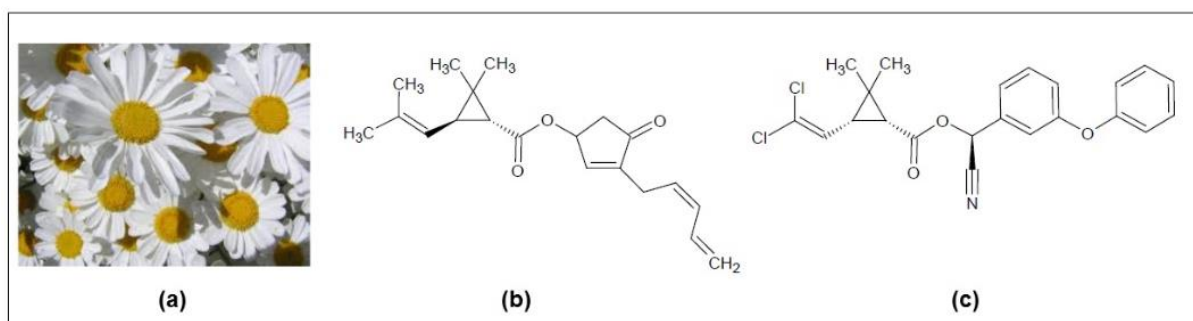


Figura 8 – (a) *Chrysanthemum cinerariifolium*, (b) Piretrina e (c) Piretróide (autor).

Permetrina, Cipermetrina e Ciflutrina são alguns exemplos de piretróides bastante utilizados para pulverização residual e espacial no controle de *A. aegypti* e *A. albopictus*. A Deltametrina, além de utilizada na pulverização, também é utilizada como larvicida para reduzir a densidade de larvas no ambiente (AKINER *et al.*, 2009). Apesar de não serem tóxicos para seres humanos e aves, os piretróides são altamente tóxicos para animais de ambientes aquáticos (WERNER; YOUNG, 2018).

Frente ao exposto, nota-se uma necessidade contínua desenvolvimento de novos inseticidas devido à perda de larvicidas através do desenvolvimento de resistência. A urgência por produtos com ambientalmente mais favoráveis e perfis toxicológicos menos danosos são essenciais para entender e promover o desenvolvimento de novas estratégias para o controle dos vetores.

#### 1.4 Via das quinureninas

A via das quinureninas é a principal via metabólica responsável pela degradação do triptofano em seres vivos. Cerca de aproximadamente 95% do triptofano, um aminoácido essencial para a síntese de proteínas, é detoxificada por esta cascata bioquímica (WU *et al.*, 2018). Como o próprio nome da via sugere, os intermediários metabólicos da rota são quinureninas que, ao final da biossíntese darão origem ao ácido quinolínico, ácido

quinurênico ou ácido xanturênico como principais produtos finais. O principal metabólito final produzido e sua concentração dependem de cada organismo vivo estudado (LI e LI, 1997; LI, 1999; CHEN e GUILLEMIN, 2009), como pode ser observado na Figura 9. Nos animais e seres humanos, quando totalmente degradados, esses ácidos são incorporados à via de produção da adenina e nicotinamida ( $\text{NAD}^+$ ), coenzimas fundamentais na respiração celular (STONE, 2000; SCHWARCZ, 2004; PHILLIPS, 2011; HAZARI e BHAD, 2015).

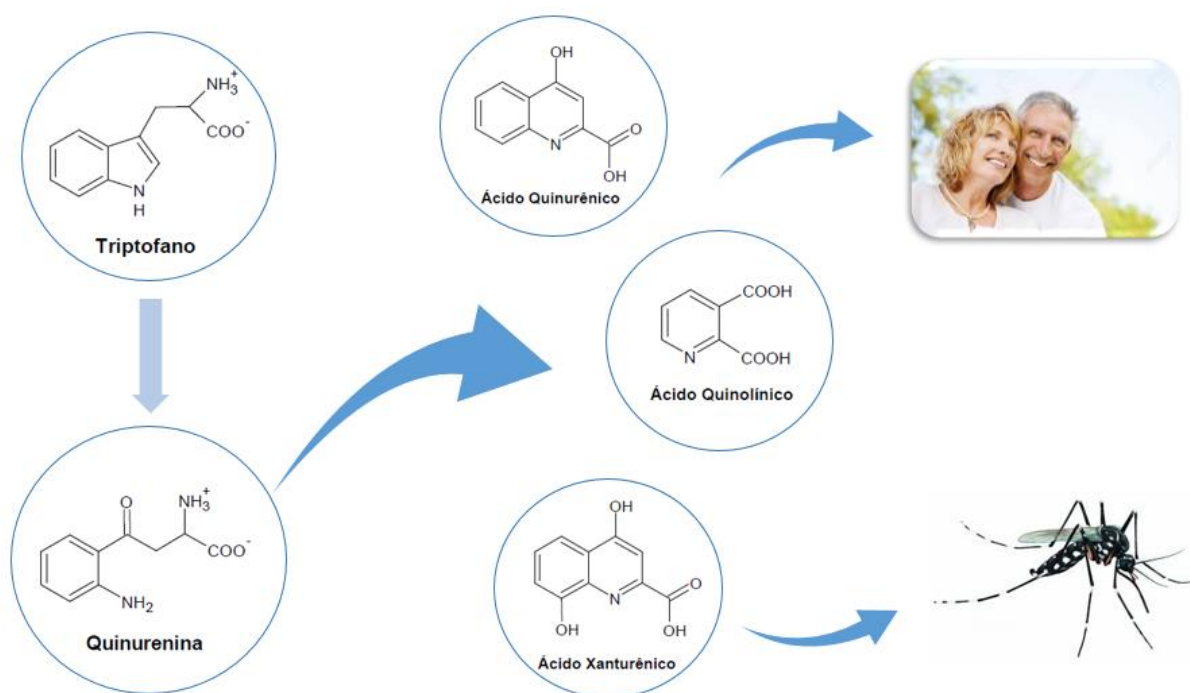


Figura 9 – Via das quinureninas e principais produtos por espécies (autor).

A via das quinureninas é extensa e tem uma quantidade significativa de intermediários, porém neste trabalho será dada ênfase à 3-hidróxi-quinurenina (3-HK), metabólito intermediário produzido a partir da quinurenina após ação da enzima quinurenina monooxigenase (KMO), conforme mostrado na Figura 10. Em humanos, quando presente em quantidades maiores que as normais, a 3-HK está relacionada a doenças como Huntington, Alzheimer, esquizofrenia, depressão e mal de Parkinson (GUIDETTI *et al.*, 2006; GULAJ *et al.*, 2010; MYINT *et al.*, 2011; CHO *et al.*, 2017; LIM *et al.* 2017). Alguns autores (LI, 1999; STONE, 2004; HAN *et al.*, 2006) estudaram o acúmulo de 3-hidróxi-quinurenina em insetos dos gêneros *Aedes* e *Anopheles* e concluíram que esse metabólito é oxidado espontaneamente a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs), provocando estresse oxidativo e

levando, então, à apoptose de células neuronais através de uma cascata de sinalização chamada de cascata das caspases (ACCORSI *et al.*, 2015).

A 3-hidróxi-quinurenina é formada pela ação da enzima KMO a partir da quinurenina e posteriormente convertida em ácido xanturênico pela ação da enzima 3-hidróxi-quinurenina transaminase (3-HKT), essa reação é mostrada na Figura 10. O ácido xanturênico é um metabólito atóxico para o inseto, sugerindo, assim, que a reação é uma via de detoxificação da 3-HK nos mosquitos (LI e LI, 1997; HAN, 2002; HAN e Li, 2002; HAN *et al.*, 2007). Apesar de sua toxicidade elevada, a 3-HK possui fundamental importância no ciclo de vida nos insetos, já que durante a fase pupa essa substância é a responsável pela formação de omocromos, pigmentos responsáveis pela coloração das asas e olhos dos mosquitos (HAN *et al.*, 2006).

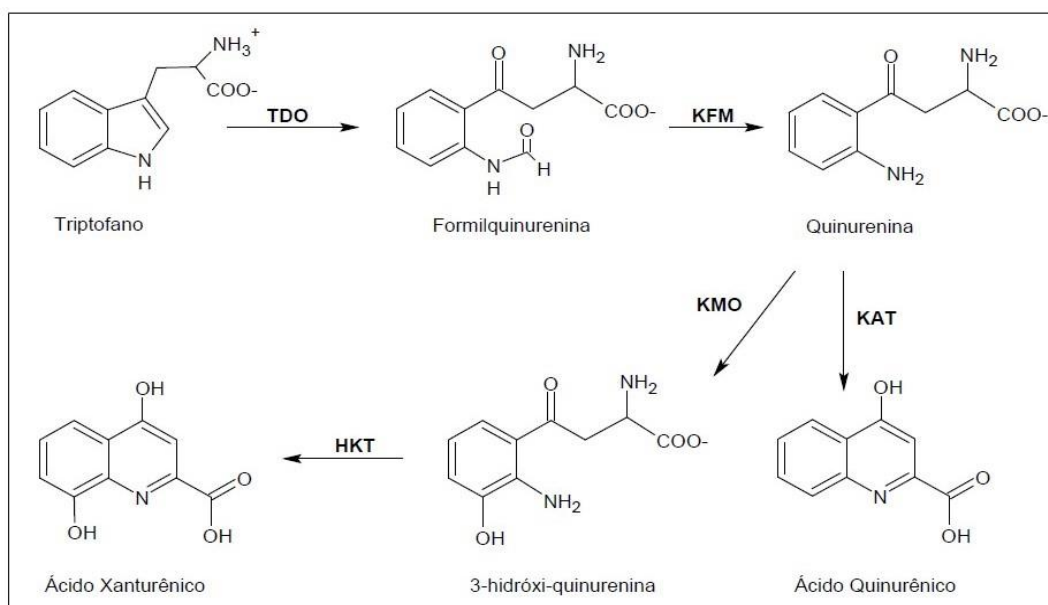


Figura 10 - Via das quinureninas em mosquitos. TDO: triptofano dioxigenase; KFM quinurenina formamidase; KMO: quinurenina monooxigenase; KAT: quinurenina aminotransferase; HKT: 3-hidróxi-quinurenina transaminase (Han *et al.* 2007).

Ao estudar o ciclo de vida do *Plasmodium falciparum* em mosquitos *Anopheles spp.*, vetor responsável pela disseminação da malária, Rossi *et al.* (2005); Vidhyanandhini e Kumar, (2008) atestaram a substancial importância do ácido xanturênico para a reprodução do protozoário. Deste modo, ao inibir a enzima responsável pela transaminação e conversão de 3-HK ao ácido xanturênico, gerando acúmulo de 3-HK, isto interferiria não apenas no

metabolismo dos mosquitos do gênero *Anopheles*, mas também poderia ser experimentado uma interrupção no ciclo de vida de *P. falciparum*.

A função metabólica da enzima AeHKT (3-hidróxi-quinurenina transaminase de *Aedes aegypti*) é, primeiramente, realizar a transaminação do substrato 3-HK para formar ácido xanturênico. Nesse caso, para o funcionamento da enzima é necessária a presença de um substrato amino-doador (3-HK), um amino-aceptor (ácido glicoxílico), e ainda a presença do piridoxal 5'-fosfato (PLP), que atua como coenzima ligando-se ao grupo amino da cadeia alifática de 3-HK para facilitar a transferência da amina para o componente amino-aceptor (ROSSI *et al.*, 2006; HAN *et al.*, 2006). Sua segunda função é realizar a conversão do glicilato à glicina (HAN e LI, 2002), como pode ser verificado na Figura 11. HAN *et al.* (2006) demonstraram que o *A. aegypti* possui dois tipos de alanina-glicoxilato aminotransferases (AeHKT e AeAGT) e estas apresentam 46% de similaridade em suas sequências de aminoácidos. Porém, somente a AeHKT consegue metabolizar a 3-HK. Em princípio, as diferenças na função enzimática devem ser refletidas nas estruturas primárias e tridimensionais e alguns aspectos podem ser apontados:

- Todos os resíduos envolvidos na ligação de PLP nessas sequências são conservados;
- Existem sete locais de ligação do substrato e cinco deles são conservados entre AeHKT e AeAGT;
- Os resíduos da quarta ligação são asparagina em AeHKT, mas o local de ligação é histidina em AeAGT;
- O quinto resíduo de ligação é ácido glutâmico em AeHKT, mas o quinto resíduo de ligação torna-se serina em AeAGT;

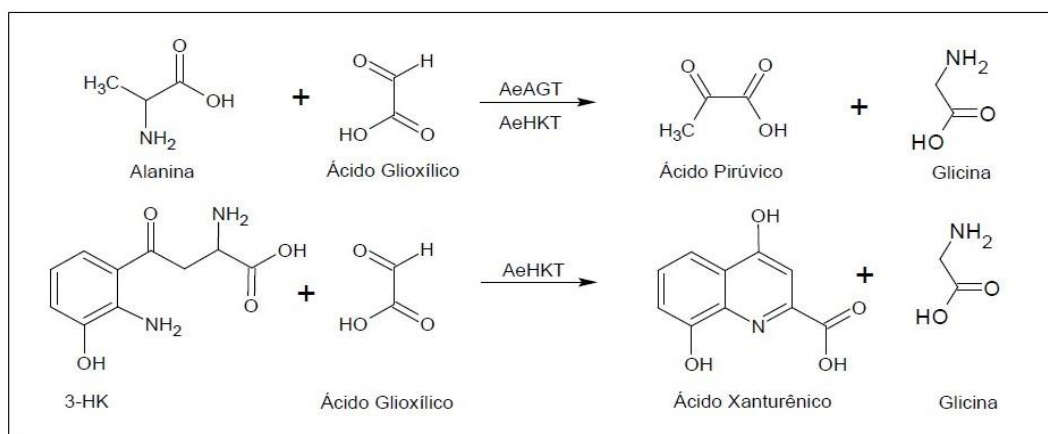


Figura 11 – Ação das enzimas transaminases HKT e AGT de *Aedes aegypti* (Han *et al.* 2006).

O substrato natural da enzima 3-HKT de *Anopheles spp.* é uma molécula bastante semelhante com o inibidor encontrado na literatura, diferindo apenas em um grupo amino presente em 3-HK, e que está ausente no inibidor. Esse fato, possivelmente, justifica a inibição da enzima, uma vez que naturalmente a enzima é responsável pela transaminação do grupo amino do substrato amino-doador para amino-receptor (ROSSI *et al.*, 2006). Pode-se observar na Figura 12 que a estrutura desse inibidor tem similaridade aos de ácidos 3-aryl-5-il-1,2,4-oxadiazol propanóicos. Tendo em vista tal similaridade, várias séries de 1,2,4-oxadiazóis contendo um grupo ácido na cadeia lateral em C-5 foram testados por nosso grupo como prováveis inibidores da AeHKT (Alves *et al.* 2013; Oliveira *et al.* 2013; Maciel, 2016).

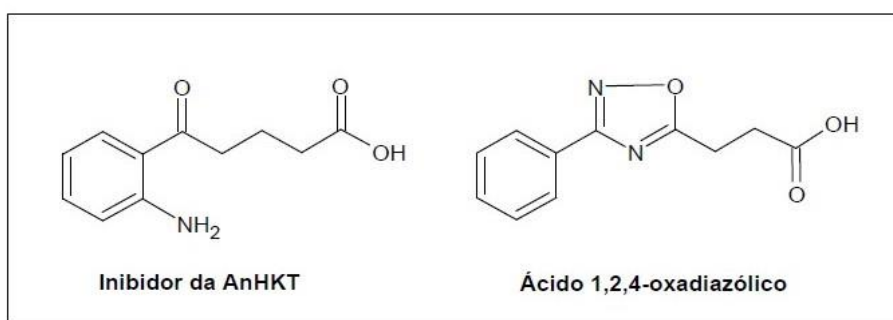


Figura 12 - Comparação estrutural entre o inibidor testado e um protótipo proposto por nosso grupo (autor).

### 1.5 Os 1,2,4-oxadiazóis

Oxadiazóis são compostos heterocíclicos de cinco membros com um oxigênio e dois nitrogênios (Figura 13). Seus heteroátomos podem estar organizados em isômeros constitucionais de quatro possíveis formas diferentes. (CLAPP, 1976). Seu anel é resistente à hidrólise e atua como bioisótero de grupos amidas e ésteres, mostrando-se promissores candidatos a fármacos (ANDERSEN *et al.*, 1996).

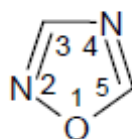
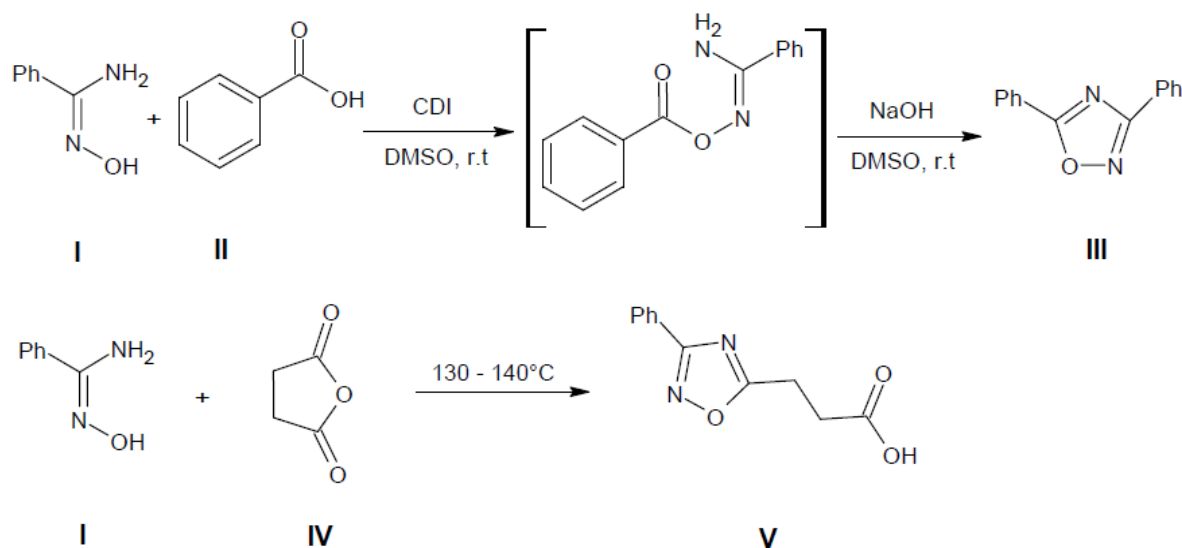


Figura 13 – Estrutura geral dos 1,2,4-oxadiazóis (autor).



Os 1,2,4-Oxadiazóis podem ser sintetizados por diversos métodos, sendo o mais comum a *O*-acilação de amidoximas (**I**) com ácidos carboxílicos (**II**) na presença de agentes ativadores de carbonila como dicicloexilcarbodiimida (DCC), *N,N'*-carbonildiimidazol (CDI) ou tetrafluorborato de 2-(1-*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (TBTU), seguido de ciclodesidratação térmica (Esquema 1) para formar o heterociclo do 1,2,4-oxadiazol (**III**) correspondente (LADE *et al.*, 2017; BAYKOV *et al.*, 2017; SHARONOVA *et al.*, 2018). Ainda, podem ser sintetizados fazendo uso de derivados de ácidos carboxílicos como anidridos ou cloretos de ácido. Por exemplo, para a síntese de ácido de oxadiazóis, o anidrido succínico (**IV**) pode reagir com a benzamidoxima (**I**), na ausência de solvente, para formar os 1,2,4-oxadiazóis após acilação e ciclodesidratação térmica (**V**) (SRIVASTAVA *et al.*, 1984; LEITE *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2005; ALVES *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013; MACIEL, 2016).



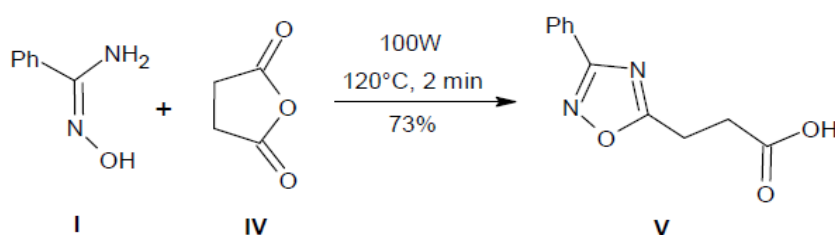
Esquema 1 – Formação de oxadiazóis via reação de amidoximas com o ácido benzóico (**II**) e com o anidrido succínico (**IV**).

Utilizando cloretos de ácido e substituindo a etapa de ciclização térmica pelo uso de fluoreto de tetrabutilamônio (TBAF) em temperatura ambiente, Gangloff *et al.* (2001) desenvolveram uma nova metodologia para a síntese de oxadiazóis que possuem substituintes sensíveis a altas temperaturas e/ou condições extremamente básicas. O Esquema 2 mostra que



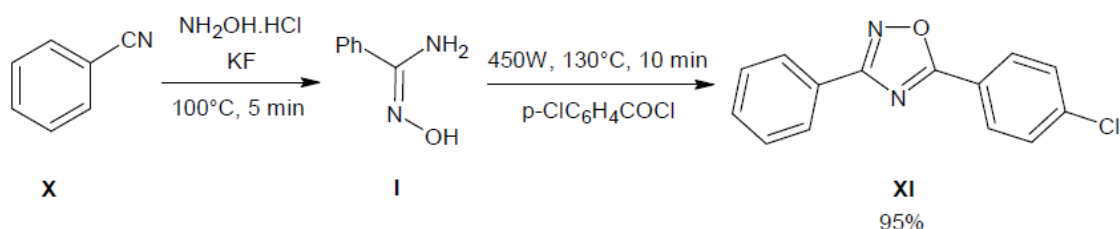


Com uma perspectiva ecologicamente sustentável, a síntese de heterociclos como 1,2,4-oxadiazóis vem sendo realizada via micro-ondas de maneira mais prática, com a redução do número de etapas reacionais, na ausência de solventes e atingindo altos rendimentos (AMARASINGHE *et al.*, 2006; DU *et al.*, 2006; DU *et al.*, 2007; ROSTAMIZADEH *et al.*, 2010; KANDRE *et al.*, 2013). Neves *et al.* (2009) realizaram o acoplamento da amidoxima (**I**) ao anidrido succínico (**IV**) formando o 1,2,4-oxadiazol (**V**), via micro-ondas, com altos rendimentos como observado no Esquema 4.



Esquema 4 – Formação do 1,2,4-oxadiazol via micro-ondas, reação livre de solvente.

Outros pesquisadores relatam a obtenção de 1,2,4-oxadiazóis via micro-ondas a partir de procedimentos do tipo *one-pot* (ADIB *et al.*, 2006; ROSTAMIZADEH *et al.*, 2010; KANDRE *et al.*, 2013). Partindo de benzonitrilas (**X**) e hidroxilaminas (**I**), na ausência de solventes e sob irradiação de micro-ondas, benzamidoximas podem ser formadas. Em seguida, a benzamidoxima resultante reage com cloreto de ácido, também sob ação de micro-ondas, formando o 3-fenil-5-(*p*-clorofenil)-1,2,4-oxadiazol (**XI**) em rendimento de 95%, conforme descrito no Esquema 5.



Esquema 5 – Síntese do 3-fenil-5-(*p*-clorofenil)-1,2,4-oxadiazol via micro-ondas, livre de solvente.

O 1,2,4-oxadiazol é um anel amplamente citado na literatura, uma vez que moléculas que contêm este heterociclo possuem diversas aplicações farmacológicas como, por exemplo, ações anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, larvicida, entre outras (ALVES *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013; GOBEC *et al.*, 2015; MACIEL, 2016; JANARDHANAN *et al.*, 2016; MAFTEI *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2019). Alguns exemplos de moléculas que contêm o núcleo 1,2,4-oxadiazol e que são dotadas de atividade biológica são mostradas na Figura 14.

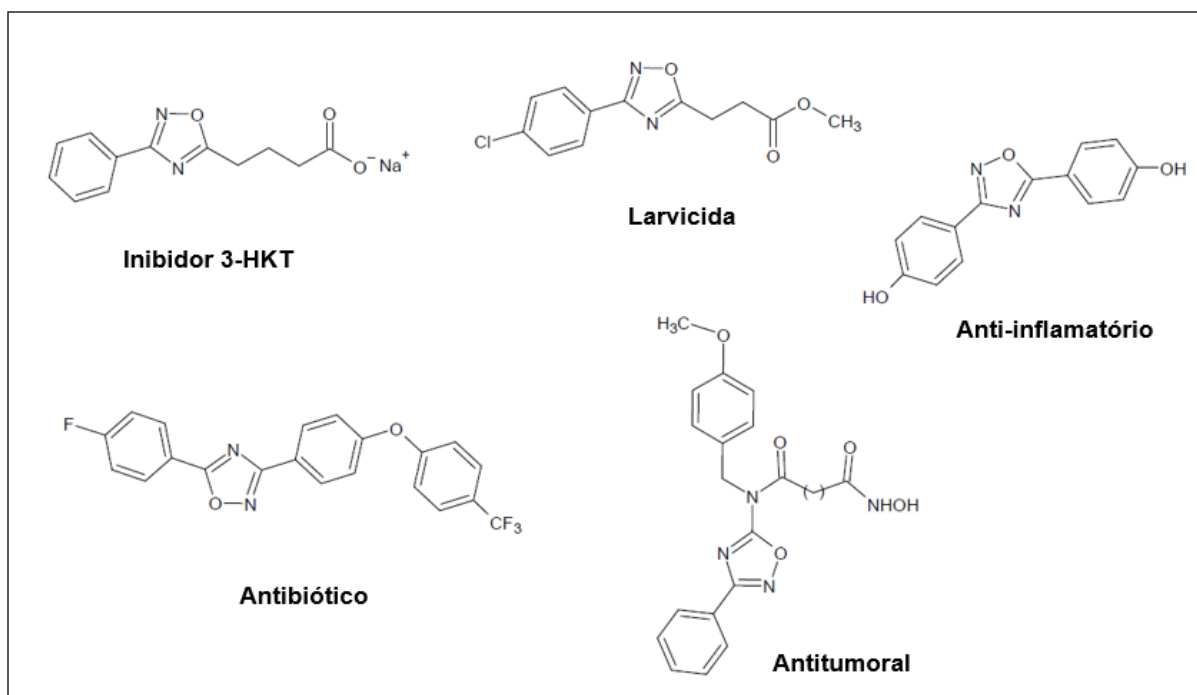


Figura 14 – Estruturas de 1,2,4-oxadiazóis biologicamente ativos (autor).

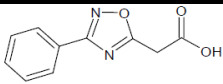
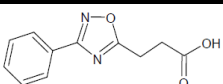
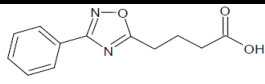
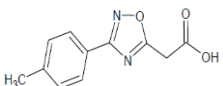
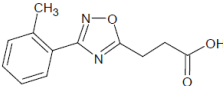
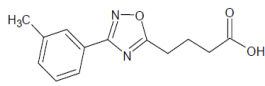
### 1.6 1,2,4-Oxadiazóis e seu uso na interrupção do ciclo de vida de *Aedes aegypti*

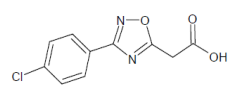
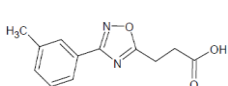
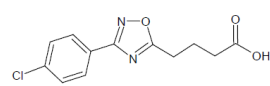
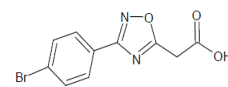
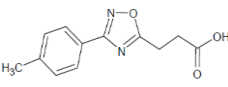
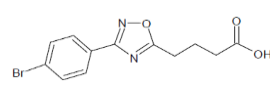
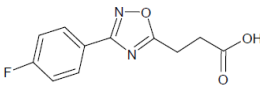
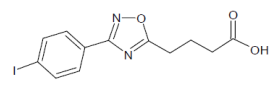
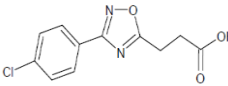
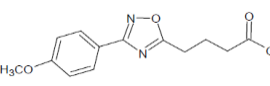
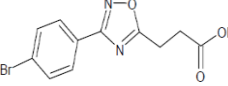
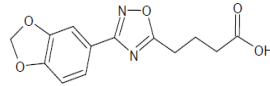
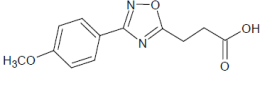
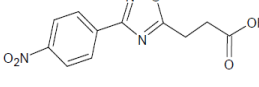
Em estudos anteriores, nosso grupo de pesquisa sintetizou três séries de ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il) com cadeia lateral formada por grupos etanóicos (2C), propanóicos (3C) e butanóicos (4C), onde se estabeleceu a atividade larvicida para *Aedes aegypti* de ácidos de oxadiazóis (NEVES FILHO *et al.*, 2008; NEVES FILHO *et al.*, 2009; ALVES, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Ultraestruturadamente, observou-se que estes novos larvicidas atuariam promovendo alterações nas válvulas laríngeas espirangulares do sifão e papilas anais, levando à morte do inseto (NEVES FILHO *et al.*, 2009).

Além de modificações na cadeia alquílica alifática dos ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il), foram realizadas variações de substituintes em seu anel aromático, derivatizações no grupo ácido por éster, álcool e cetona, e também modificação do anel 1,2,4-oxadiazol pelo anel do isoxazol. Os resultados obtidos mostraram que a atividade larvicida para a série de ácidos 2C segue um padrão análogo aos da série 3C, com os melhores resultados obtidos para compostos contendo substituintes halogenados no anel aromático em C-5 do heterociclo. A redução da cadeia alquílica alifática em C-5 (série 2C, com um grupo metileno entre o anel e a carbonila) resultou em compostos larvicidas menos efetivos, com  $CL_{50}$  (concentração letal para 50% da população larval, em partes por milhão) acima de 45 ppm. Seguindo a mesma tendência, o alongamento da cadeia alifática com a série de 4C apresentou os melhores resultados para atividade larvicida (OLIVEIRA *et al.*, 2013). A Tabela 1 mostra os resultados de atividade larvicida das três séries de ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il), em que a cadeia alquílica alifática foi reduzida e alongada, sendo que o melhor larvicida teve o valor de  $CL_{50}$  igual a 10,6 ppm.

As substituições realizadas no grupo arila localizado em C-3 de ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il) mostraram-se bastantes significativas. Os ácidos contendo bromo e cloro apresentaram boa atividade larvicida, com valores de  $CL_{50}$  abaixo de 30,0 ppm. Em contrapartida, o composto contendo flúor mostrou baixa atividade larvicida com um alto valor de  $CL_{50}$  (81,3 ppm). Esses resultados indicam que os efeitos eletrônicos são tão importantes quanto os efeitos estéricos, já que há uma diferença significativa no perfil larvicida das três séries de compostos (Tabela 1).

Tabela 1 - Derivações da cadeia alquílica alifática e atividade larvicida dos 1,2,4-oxadiazóis.

Série 2C	$CL_{50}$ (ppm)	Série 3C	$CL_{50}$ (ppm)	Série 4C	$CL_{50}$ (ppm)
	>100 <sup>a</sup>		98,6 <sup>a</sup>		92,7 <sup>a</sup>
	92,3 <sup>a</sup>		70,9 <sup>a</sup>		75,9 <sup>a</sup>

	49,3 <sup>a</sup>		63,8 <sup>a</sup>		34,9 <sup>a</sup>
	67,9 <sup>a</sup>		65,8 <sup>a</sup>		10,6 <sup>a</sup>
			81,2 <sup>a</sup>		16,2 <sup>a</sup>
			28,1 <sup>a</sup>		>100 <sup>a</sup>
			15,2 <sup>a</sup>		72,9 <sup>a</sup>
			71,5 <sup>a</sup>		
			50,5 <sup>a</sup>		

<sup>a</sup>Oliveira *et al.*, 2013.

Modificações no grupo ácido também já foram realizadas, e destas alterações ficou patente que a modificação para um grupamento éster é a mais vantajosa. Essas alterações apresentaram ésteres que tiveram melhores desempenho larvicida quando comparados com seus ácidos correspondentes. A atividade larvicida desses ésteres foi superior, em todos os casos, quando comparados aos ácidos equivalentes. Esse efeito pode estar relacionado à maior lipofilicidade da função éster que facilita a penetração dos compostos na mucosa das larvas (ALVES, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Apesar de melhores resultados apresentados pelos ésteres, sua lipofilicidade torna-se um fator preocupante, tendo em vista que larvicidas devem possuir boa afinidade pelo meio aquoso, uma vez que o mosquito *Aedes aegypti* deposita seus ovos em água.

Modificações no anel heterocíclico também foram realizadas, alterando-se o átomo de nitrogênio da posição 4 do 1,2,4-oxadiazol por um grupo CH formando, portanto, compostos com o anel do isoxazol. A única diferença entre esses compostos é o seu anel heterocíclico. No entanto, ao analisar e comparar seus valores de CL<sub>50</sub>, os compostos

contendo o anel isoxazol são ligeiramente mais potentes que os 1,2,4-oxadiazóis. Apesar disso, quando comparados aos 1,2,4-oxadiazóis, os isoxazóis são sinteticamente mais difíceis de serem obtidos, são fotossensíveis e seu anel heterocíclico pode abrir e gerar as amino-cetonas ou as ciano-cetonas correspondentes em meio aquoso (AKHREM *et al.*, 1981; CICCHI *et al.*, 2011; HAN *et al.*, 2014; VITALE e SCILIMATI, 2017). Isto limita a introdução do anel do isoxazol nas estruturas de compostos larvicidas, já que a estabilidade em meio aquoso é uma característica imprescindível, uma vez que o *A. aegypti* se reproduz em água e estes compostos deverão permanecer em ambiente aquoso nos criadouros por longos períodos de tempo, muitas vezes expostos à luz solar.

Nosso grupo de pesquisa, através de estudos computacionais e experimentais, buscou ainda propor um mecanismo de ação para os compostos sintetizados. A enzima HKT pode ser um alvo molecular plausível para a inibição por este tipo de estrutura de anel heterocíclico. A primeira evidência experimental que levou a essa suposição foi a coloração escura em larvas de *Aedes aegypti* quando submetidas à ação dos larvicidas 1,2,4-oxadiazólicos (ALVES, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Apesar de a 3-HK ser um metabólito neurotóxico para insetos, essa substância apresenta fundamental importância fisiológica, uma vez que durante a fase pupa essa substância é responsável pela formação dos omocromos, que são pigmentos responsáveis pela coloração das asas e olhos compostos dos mosquitos (HAN *et al.*, 2006). Surgiu, então, a hipótese: o larvicida ao inibir a enzima HKT, promove o acúmulo de 3-HK, o que promoveria a pigmentação escura observada nas larvas quando tratadas com compostos 1,2,4-oxadiazólicos. A Figura 15 mostra um esquema explicativo demonstrando a ação do larvicida frente às larvas de *Aedes aegypti*.

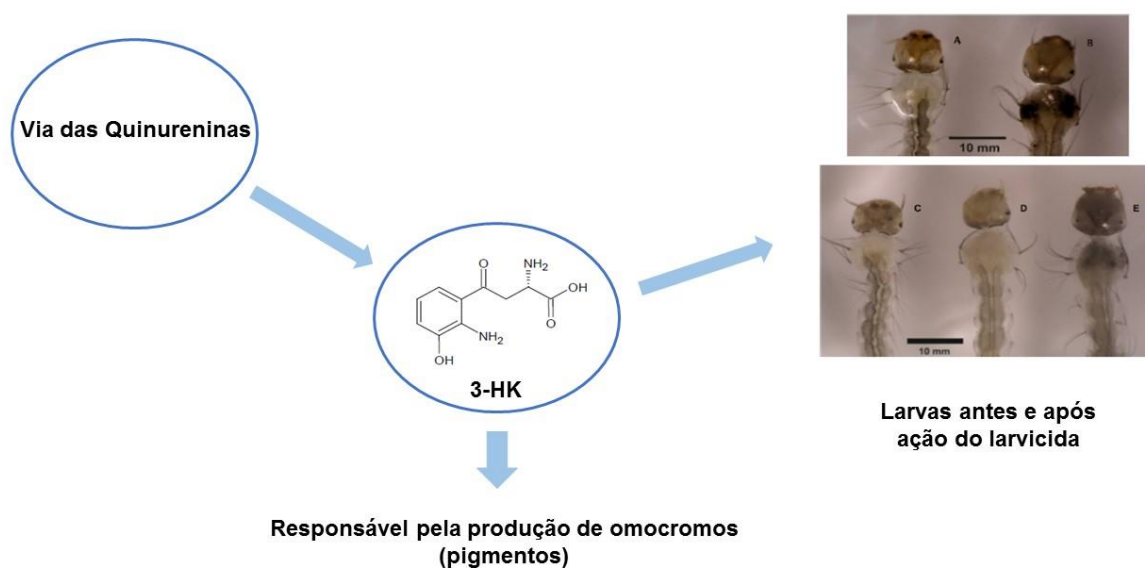


Figura 15 - Atuação do larvicida e evidência do acúmulo de 3-HK em larvas de *Aedes aegypti* (autor).

Buscando então a elucidação desse mecanismo de ação, em um primeiro momento, foram realizados estudos de *docking molecular* entre os compostos sintetizados em um modelo estrutural da enzima HKT do mosquito *Aedes aegypti* (AeHKT), que foi adquirida por homologia a partir da estrutura cristalográfica da enzima correspondente de *Anopheles gambiae* (AgHKT) (NASCIMENTO, 2010, OLIVEIRA *et al.*, 2013). As coordenadas atômicas da estrutura AgHKT foram extraídas do banco de dados PDB (Protein Data Bank, ID: 2CH1 e 2CH2) e utilizadas como matriz para o sequenciamento de aminoácidos correspondentes à enzima HKT de *A. aegypti* resultando, portanto, em 73% de similaridade. Nestes estudos, os cálculos indicaram que os compostos heterocíclicos (oxadiazóis e isoxazóis) ácidos e ésteres se ligam à AeHKT com conformação e energia de ligação semelhantes ao inibidor cristalográfico, o ácido 4-(2-aminofenil)-4-oxobutanóico (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Com uma nova hipótese formulada, Maciel (2016) clonou, expressou e purificou uma proteína HKT fusionada à glutathione-S-transferase, a partir de *Escherichia coli*, para avaliar a inibição de 12 inéditos sais sódicos (com melhores solubilidades em água que os ácidos ou ésteres correspondentes) dos compostos 1,2,4-oxadiazólicos da série de ácidos butanóicos (série 4C). Estes últimos haviam apresentado os melhores resultados para atividade larvicida. Uma metodologia para os testes de inibição foi padronizada e a inibição

da enzima foi mensurada a partir do acúmulo de 3-HK no teste enzimático. Se a hipótese de inibição da HKT é real, esperar-se-ia, ao final da reação, uma maior quantidade de 3-HK em relação ao produto da reação, o ácido xanturênico. A partir desses ensaios de inibição, foi possível concluir que os sais sintetizados são inibidores da proteína HKT recombinante, promovendo o acúmulo de 3-HK, metabólito tóxico e responsável pela morte das células neuronais do inseto, no meio reacional.

Diante de tudo o que foi exposto, este estudo visou a síntese de uma série de 19 sais sódicos de ácidos 4-[3-(aril)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanóicos com variações nos substituintes do anel aromático. Estes sais tiveram seu potencial anti-HKT testado *ex vivo* frente à HKT recombinante de *Aedes aegypti*, com a finalidade de se obter melhores candidatos a larvicidas sintéticos contendo o anel do 1,2,4-oxadiazol.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

Desenvolver novas substâncias contendo o anel do 1,2,4-oxadiazol capazes de agir como antagonistas competitivos da enzima HKT de *Aedes aegypti*, gerando acúmulo de 3-HK e consequentemente a morte do inseto.

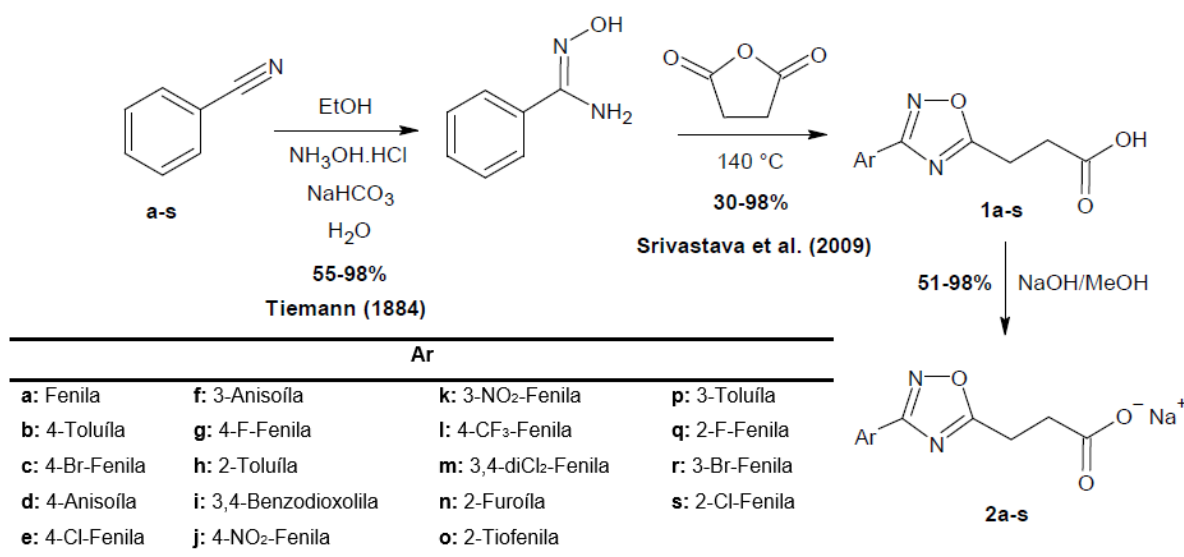
### 2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar 19 sais sódicos do ácido 4-(3-(aril)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanóico;
- Avaliar a cinética da reação de inibição dos compostos sintetizados frente a enzima AeHKT a partir de um método espectrométrico;
- Determinar a  $CI_{50}$  dos compostos da série de 4-(3-(aril)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoatos de sódio e evidenciar o potencial de inibição da enzima AeHKT;
- Estudar as tendências relacionadas aos substituintes presentes em cada composto a partir de seus valores de  $CI_{50}$  encontrados, a fim de desenvolver melhores inibidores futuramente.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Síntese dos sais sódicos de 1,2,4-oxadiazóis

Sabe-se que os ácidos e derivados de 1,2,4-oxadiazóis são dotados de atividade larvícida. Uma limitação do uso dessas moléculas é a baixa solubilidade em água (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Sabendo-se que os protótipos finais, como larvicidas, deverão ser usados em criadouros de larvas como agentes larvicidas e que os testes de inibição da HKT são realizados em ambiente aquoso, fez-se necessária a conversão dos ácidos 4-[3-(aril)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanóicos nos respectivos sais sódicos (Esquema 6).



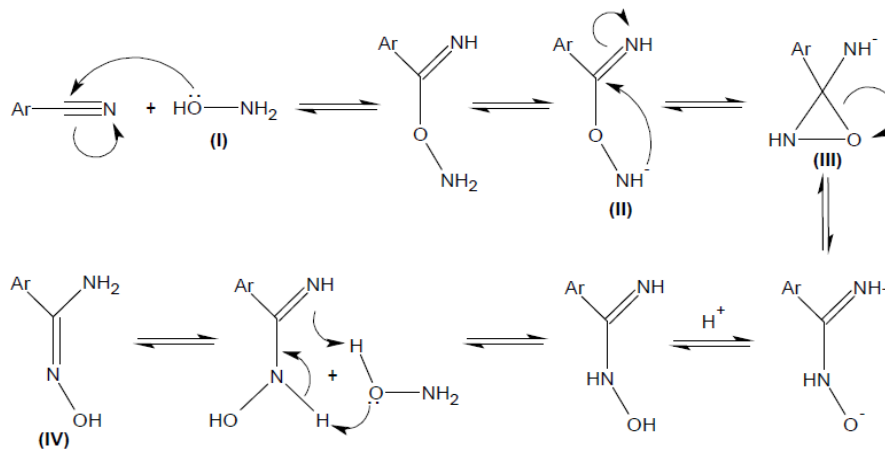
Esquema 6 - Síntese geral dos sais sódicos **2a-s**.

A Tabela 2 mostra os rendimentos dos sais sódicos, que variaram de 51 a 98%, e seus respectivos pontos de fusão. Estes foram obtidos a partir de amidoximas com seus respectivos substituintes, reagidas com anidrido succínico para obtenção dos respectivos ácidos 4-[3-(aril)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanóicos e posteriormente desprotonados em meio contendo NaOH para formar os sais sódicos (Esquema 6).

Tabela 2 - Dados experimentais das substâncias **2a-s**.

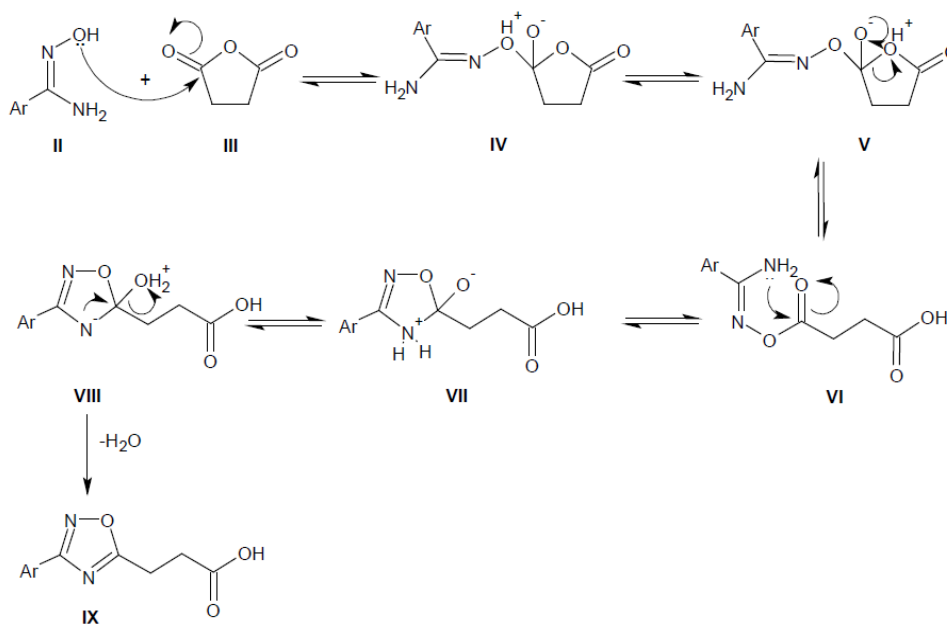
<b>Substância</b>	<b>Rendimento (%)</b>	<b>Ponto de Fusão (°C)</b>
<b>2a</b>	93	171-172
<b>2b</b>	98	179-180
<b>2c</b>	90	238-240
<b>2d</b>	92	214-215
<b>2e</b>	97	217-218
<b>2f</b>	76	148-150
<b>2g</b>	96	190-192
<b>2h</b>	92	170-172
<b>2i</b>	94	185-186
<b>2j</b>	97	225-226
<b>2k</b>	95	202-203
<b>2l</b>	98	194-195
<b>2m</b>	98	270-272
<b>2n</b>	51	228-230
<b>2o</b>	96	188-190
<b>2p</b>	93	108-109
<b>2q</b>	86	170-172
<b>2r</b>	62	118-120
<b>2s</b>	98	100-102

Por ser um nucleófilo ambidente, a hidroxilamina (**I**) possibilita dois tipos de ataques. Quando o ataque é feito pelo átomo de oxigênio (uma base dura atacando um ácido intermediário), uma amida, mediada pelo controle cinético, poderá ser formada. Ocorre então um ataque intramolecular realizado pelo átomo de nitrogênio (**II**), pois o átomo de carbono atacado continua ácido, o que facilita o processo. O intermediário (**III**) formado é um anel de três membros, oxaziridínio, bastante instável, o que possibilita a clivagem da ligação C-O e consequentemente acontece a formação da arilamidoxima (**IV**), conforme observado no Esquema 7 (SRIVASTAVA *et al.*, 2009).



Esquema 7 - Formação da arilamidoxima a partir de nitrilas aromáticas.

Após a síntese da arilamidoxima, a etapa seguinte consiste em sintetizar os ácidos propanóicos fundindo a arilamidoxima (**II**) com anidrido succínico (**III**). O intermediário **IV** é formado e, em seguida ocorre uma transferência de hidrogênio (**V**) e a ciclização (**VI**), formando o anel 1,2,4-oxadiazólico (**VII**). Por fim, ocorre uma desidratação (**VIII**), e o ácido final é formado (**IX**), como explicado no Esquema 8.



Esquema 8 - Mecanismo de formação do ácido 4-(3-Aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanóico.

### 3.2 Caracterização dos 4-[3-(aril)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoatos de sódio

Para os 19 compostos sais sódicos foram realizadas análises de espectroscopia na região infravermelho com transformada de fourier (FT-IR), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  e espectrometria de massas (MALDI-TOF). Os resultados discutidos aqui se aplicam para os compostos **2a**, **2e**, **2i** e **2o**. Os demais compostos apresentaram padrões espectroscópicos semelhantes.

Nos espectros de infravermelho, foi possível identificar as bandas de estiramento C-H<sub>Ar</sub>, C=O, C=N e N-O dos sais sódicos sintetizados, que correspondem respectivamente ao estiramento C-H do anel aromático, estiramento da ligação C=O do grupamento carboxílico, estiramento da dupla ligação C=N do anel de 5 membros e por fim estiramento da ligação N-O, também do anel heterocíclico. Os valores obtidos, correspondem, na devida ordem, a 2925; 1691; 1582; 1205  $\text{cm}^{-1}$ . A Figura 16 mostra o padrão de bandas obtidas a partir da análise de FT-IR.

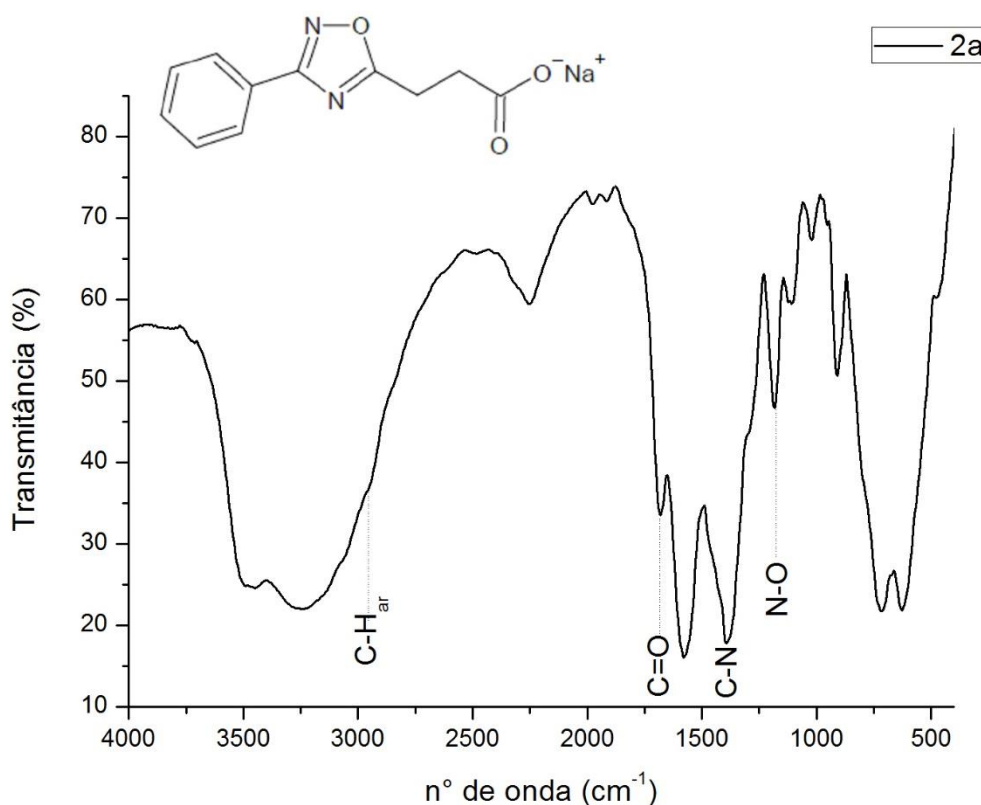


Figura 16 – Espectro de infravermelho do sal sódico **2a**.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para a substância **2a**, verifica-se a presença de dois tripletos, o primeiro em 2,56 ppm com constante de acoplamento  $J = 7,35$  Hz, relativo ao  $\text{CH}_2$  da cadeia alifática mais próxima do grupo carboxilato. Já em 2,98 ppm com constante de acoplamento  $J = 7,35$  e integração para dois hidrogênios, corresponde ao metileno mais desblindado e próximo do anel do heterociclo. O multipletto no intervalo de 7,44-7,32 ppm é relativo a três hidrogênios na região aromática, reconhecidos pela integração do pico. Por outro lado, em 7,66 ppm o sinal corresponde a um dubleto com constante de acoplamento de  $J=7,8$  Hz, com integração para dois hidrogênios, referentes aos hidrogênios mais próximos do anel do 1,2,4-oxadiazol, sofrendo então efeito de desblindagem por conta do anel (Figura 17).

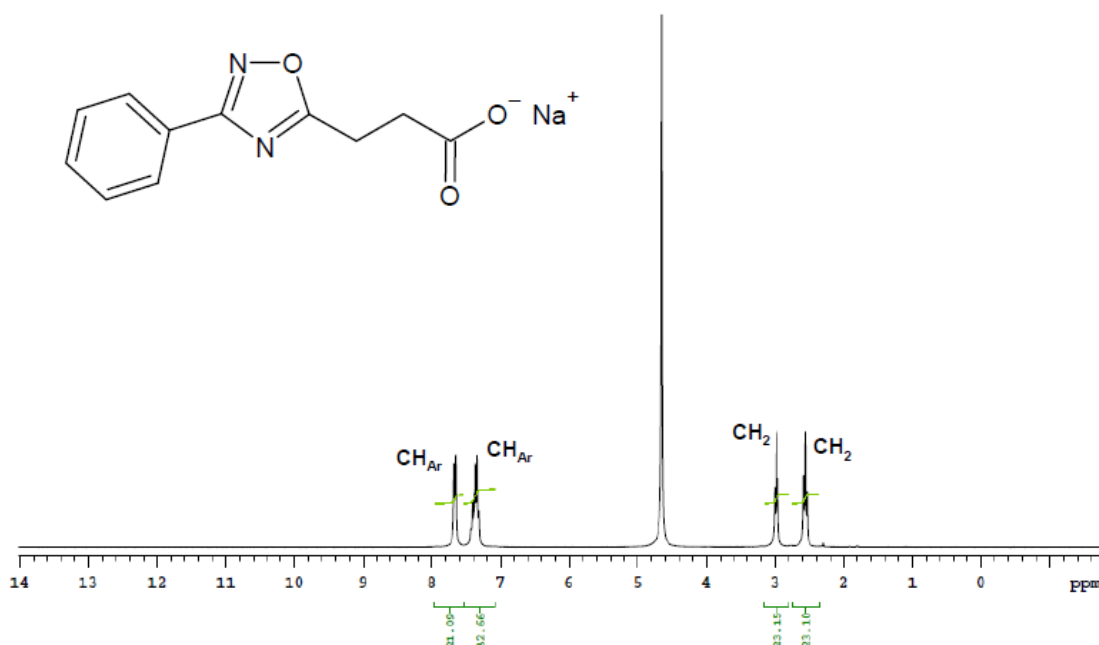


Figura 17 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do sal sódico **2a**.

A Figura 18 corresponde ao espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do sal sódico **2a**, em que cada sinal corresponde a um carbono presente em sua estrutura molecular, exceto pelos sinais em 126,9 e 129,0 ppm, que correspondem a equivalência simétrica dos carbonos presentes no anel aromático. Os picos em 125,2 e 131,6 ppm correspondem, respectivamente, ao carbono ligado diretamente ao anel de 5 membros e ao carbono na posição *para* do anel aromático em relação ao anel do heterociclo. Os picos dos grupos metilenos são os de menor deslocamento químico 23,0 e 33,0 ppm. Já os sinais na região de 167,4 e 179,6 ppm são relativos aos

carbonos do heterociclo, na devida ordem, C<sub>3</sub> e C<sub>5</sub>. Por conseguinte, o sinal mais desblindado é referente ao carbono do grupo carboxilato, em 180,6 ppm.

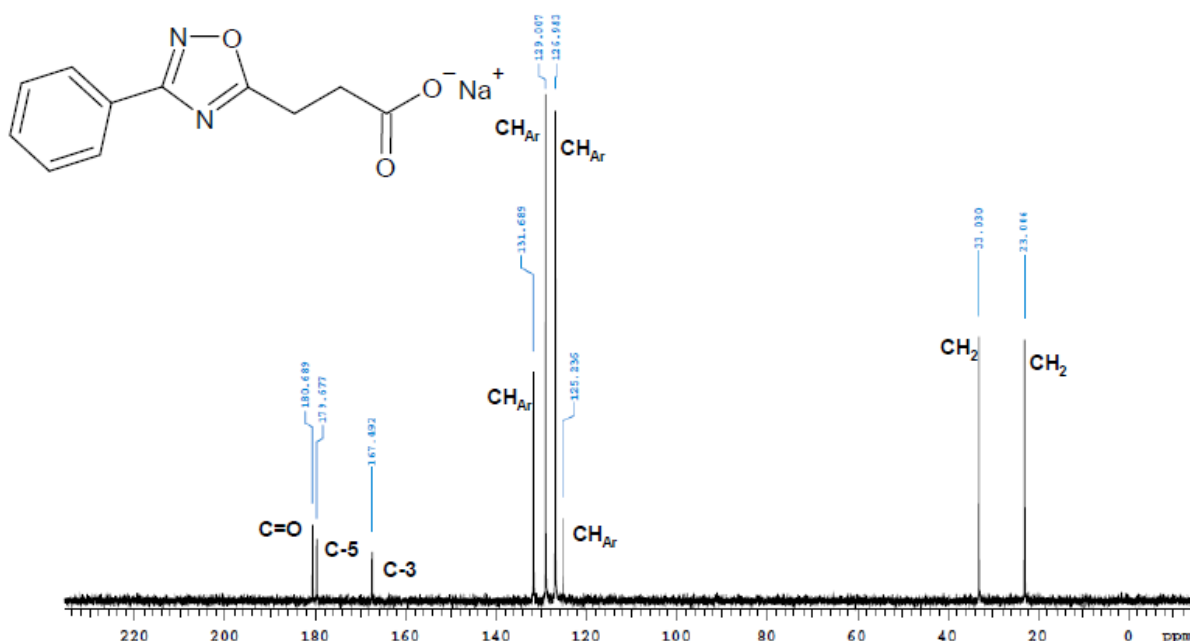


Figura 18 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (300 MHz, D<sub>2</sub>O) do sal sódico **2a**.

A Figura 19 corresponde ao espectro de infravermelho do sal sódico **2e**, em que foi possível identificar bandas em 2962 cm<sup>-1</sup>, que corresponde ao estiramento em C-H<sub>Ar</sub> do anel aromático; 1589 cm<sup>-1</sup>, atribuída ao estiramento da ligação C=O do carbono carboxílico; 1423 cm<sup>-1</sup>, C=N e a banda em 1195 cm<sup>-1</sup>, equivalente ao estiramento da ligação N-O presente no anel 1,2,4-oxadiazólico.

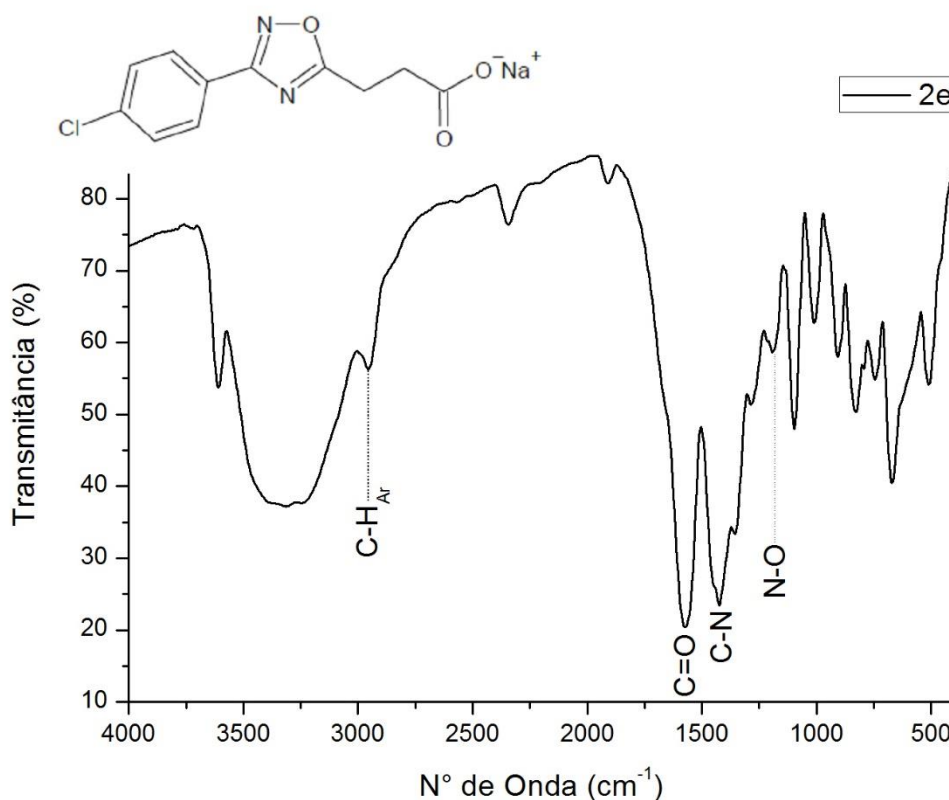


Figura 19 – Espectro de infravermelho do sal sódico **2e**.

Analogamente ao composto **2a**, observam-se, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **2e** (Figura 20), dois tripletos na região de campo alto, sendo o primeiro com integração para dois hidrogênios, em 2,64 ppm e com constante de acoplamento  $J = 7,2$  Hz relativo ao  $\text{CH}_2$  da cadeia alifática mais próxima da carbonila e, em 3,10 ppm, com constante de acoplamento  $J = 7,35$  Hz e integração para dois hidrogênios, o metileno mais desblindado, próximo ao anel do heterociclo. Na região que corresponde ao anel aromático, tem-se dois dubletos em 7,40 e 7,73 ppm com integração para dois hidrogênios cada, e ambos com constante de acoplamento  $J = 8,7$  Hz. Este padrão de deslocamento químico é típico de anéis aromáticos *para*-dissubstituídos (sistemas AA'BB').



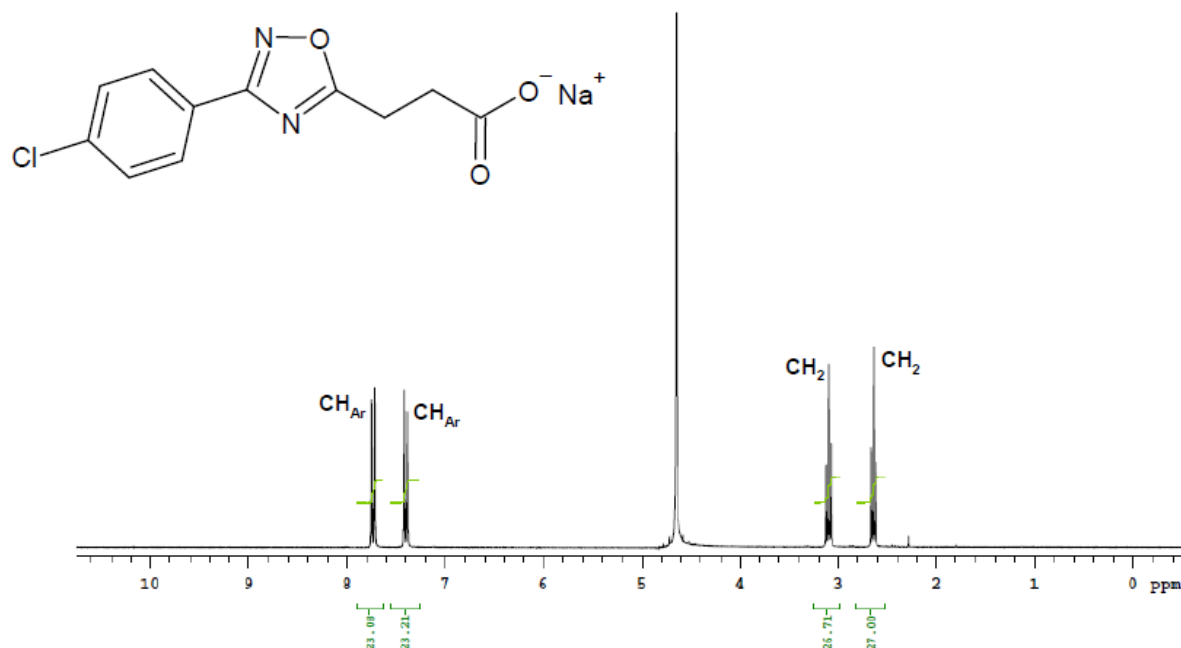


Figura 20 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do sal sódico **2e**.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  correspondente ao composto **2e**, Figura 21, cada sinal corresponde a um carbono presente em sua estrutura molecular, em que os picos 20,9 e 30,9 ppm representam os carbonos dos grupos metileno da cadeia alifática. Os sinais em 121,6 e 134,8 ppm são compatíveis, respectivamente, aos carbonos aromáticos ligados diretamente ao anel heterociclo e o carbono ligado ao átomo de cloro na posição *para* e que está mais afastado devido ao efeito de desblindagem causado pelo átomo de cloro mais eletronegativo. Os picos em 126,2 e 126,8 ppm correspondem aos carbonos que estão no mesmo ambiente químico devido a simetria apresentada no anel aromático. Já na região de 164,5 e 177,4 ppm, esses sinais, são relativos aos carbonos do anel heterociclo  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_5$ . Finalmente, o sinal mais desblindado é referente ao carbono do grupo carboxilato em 178,7 ppm.

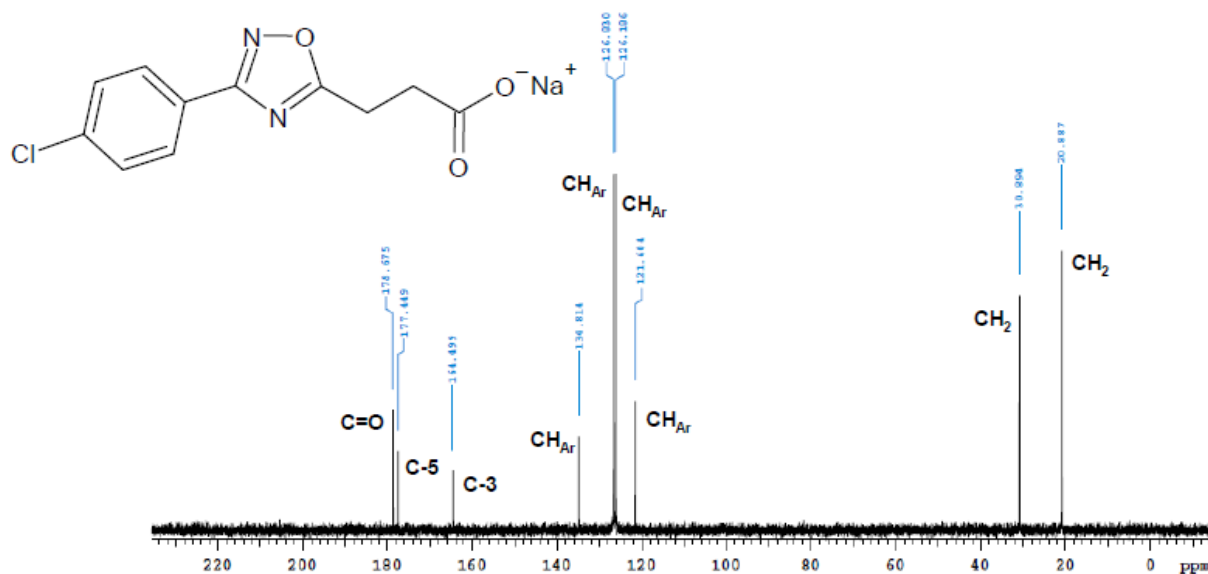


Figura 21 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (300 MHz, D<sub>2</sub>O) do sal sódico **2e**.

A Figura 22 exibe o espectro de infravermelho do composto **2i**, em que as bandas 2902 cm<sup>-1</sup>, 1582 cm<sup>-1</sup>, 1582 cm<sup>-1</sup>, 1230 cm<sup>-1</sup>, 1023 cm<sup>-1</sup> foram evidenciadas e correspondem, na devida ordem, ao estiramento em C-H<sub>Ar</sub> do anel aromático, estiramento da ligação C=O do carbono carboxílico, estiramento das ligações C=N e N-O presente no anel 1,2,4-oxadiazólico e, por fim, estiramento da ligação C-O do anel benzo[*d*][1,3]dioxolila.

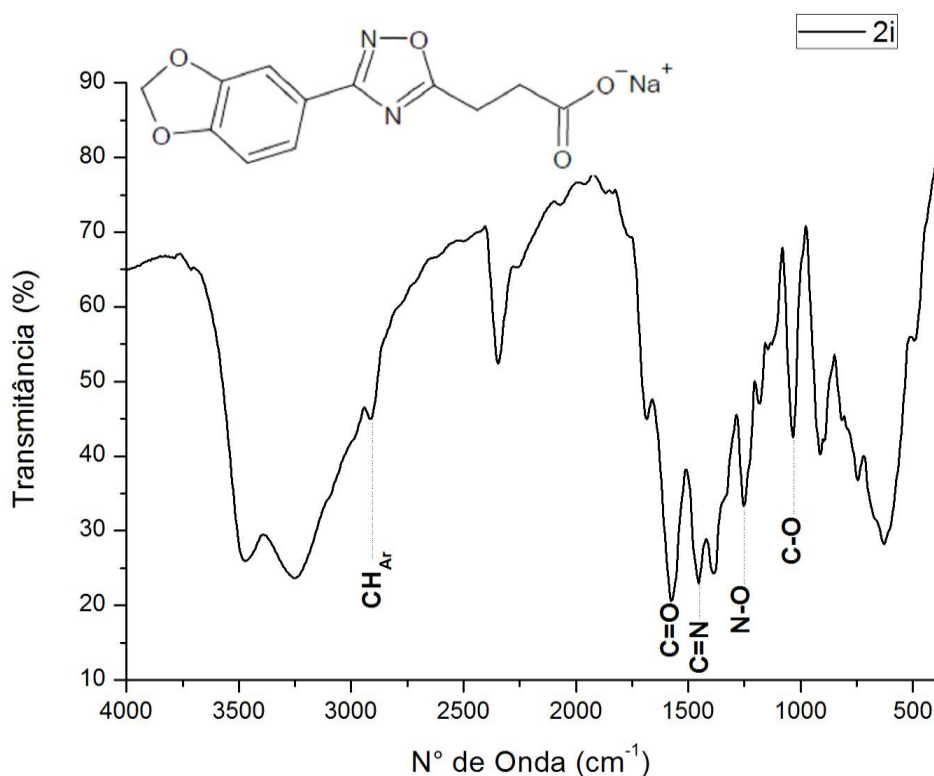


Figura 22 – Espectro de infravermelho do sal sódico **2i**.

Ao espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **2i** apresentado na Figura 23, atribui-se dois tripletos na região de campo alto para os deslocamentos químicos de 2,62 e 3,07 ppm. Ambos os sinais têm integração para dois hidrogênios e possuem a mesma constante de acoplamento  $J = 7,5$  Hz. Esses picos representam os grupos metileno da cadeia alifática entre o anel 1,2,4-oxadiazólico e o grupo carboxílico. Em seguida, temos um simpleto com deslocamento químico de 5,94 ppm referente ao grupo metileno do anel benzo[*d*][1,3]dioxolila. Já na região correspondente ao anel aromático, tem-se duplete em 6,86 ppm, com constante de acoplamento  $J = 8,4$  Hz, duplete em 7,23 ppm, com constante de acoplamento  $J = 1,2$  Hz e duplo duplete em 7,36 ppm, com constantes de acoplamento  $J = 8,7$  e 1,2 Hz. O sinal em 1,80 ppm foi atribuído a impurezas na amostra, mesmo com o aparecimento desse pico podemos confirma um alto grau de pureza ao composto quando verificado pelo RMN de  $^{13}\text{C}$ , onde não foi verificado sinais excedentes daqueles atribuídos aos carbonos encontrados na estrutura do composto.

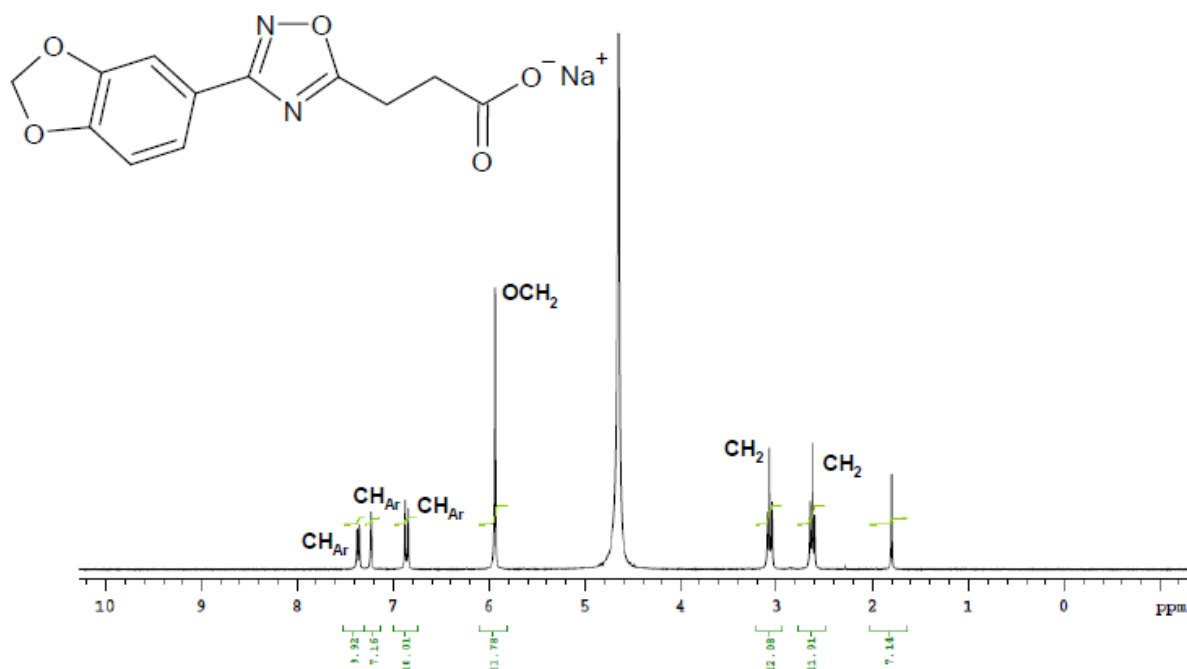


Figura 23 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O) do sal sódico **2i**.

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C correspondente ao composto **2k** (Figura 24). Os sinais que se encontram em campo alto correspondem aos carbonos do grupo metileno presentes na cadeia alifática lateral ao anel 1,2,4-oxadiazólico, e que aparecem em 20,8 e 30,9 ppm. Em 99,7 ppm encontra-se o carbono referente ao grupo metileno do anel benzo[*d*][1,3]dioxolila. Todos os carbonos do anel aromático são visualizados, assim, os seis carbonos possuem deslocamento químico em 104,6; 106,5; 116,8; 120,0; 145,3; 147,7 ppm, sendo os último, mais desblindado, correspondente aos carbono ligado diretamente ao oxigênio do grupo benzo[*d*][1,3]dioxolila. Já na região de 166,0 e 179,6 ppm, encontram-se os sinais relativos aos carbonos C<sub>3</sub> e C<sub>5</sub> do anel heterociclo. Por fim, o sinal mais desblindado é referente ao carbono do grupo carboxilato em 181,5 ppm.

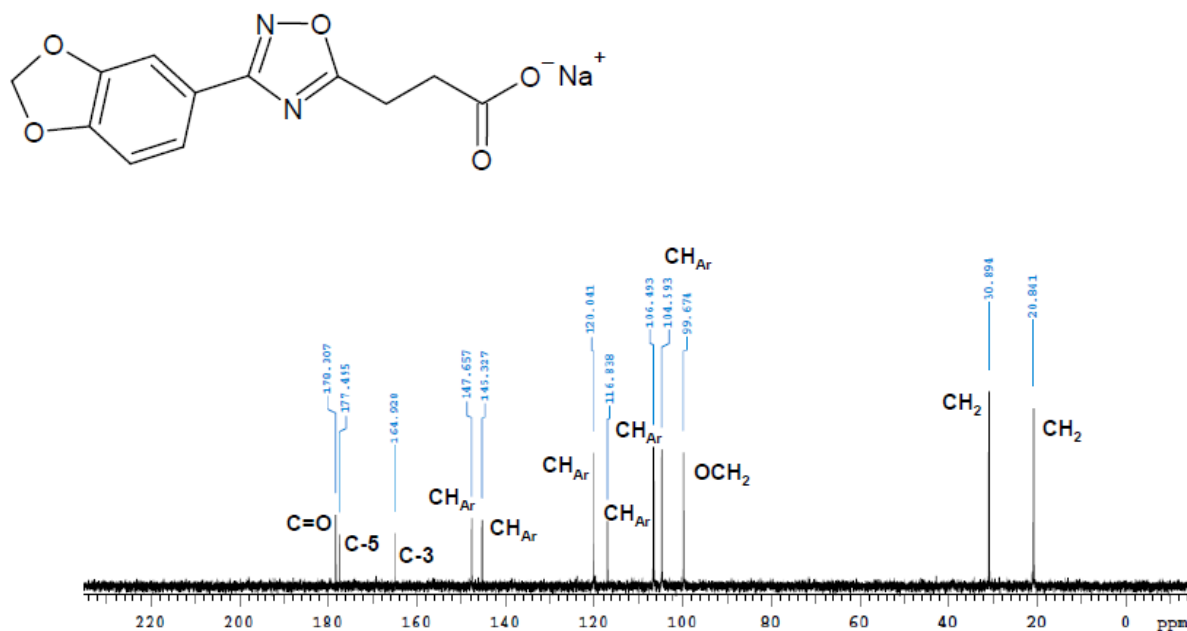


Figura 24 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do sal sódico **2i**.

Para o composto **2o** foram atribuídas as seguintes bandas em seu espectro de infravermelho, apresentado na Figura 25. Em  $2925\text{ cm}^{-1}$  há o estiramento em  $\text{C-H}_{\text{Ar}}$  do anel aromático; em  $1572\text{ cm}^{-1}$  há o estiramento da ligação  $\text{C=O}$  do carbono da carbonila; a banda em  $1417\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento da ligação  $\text{C=N}$  e a banda em  $1313\text{ cm}^{-1}$  seria correspondente ao estiramento da ligação  $\text{N-O}$  presente no anel 1,2,4-oxadiazólico.

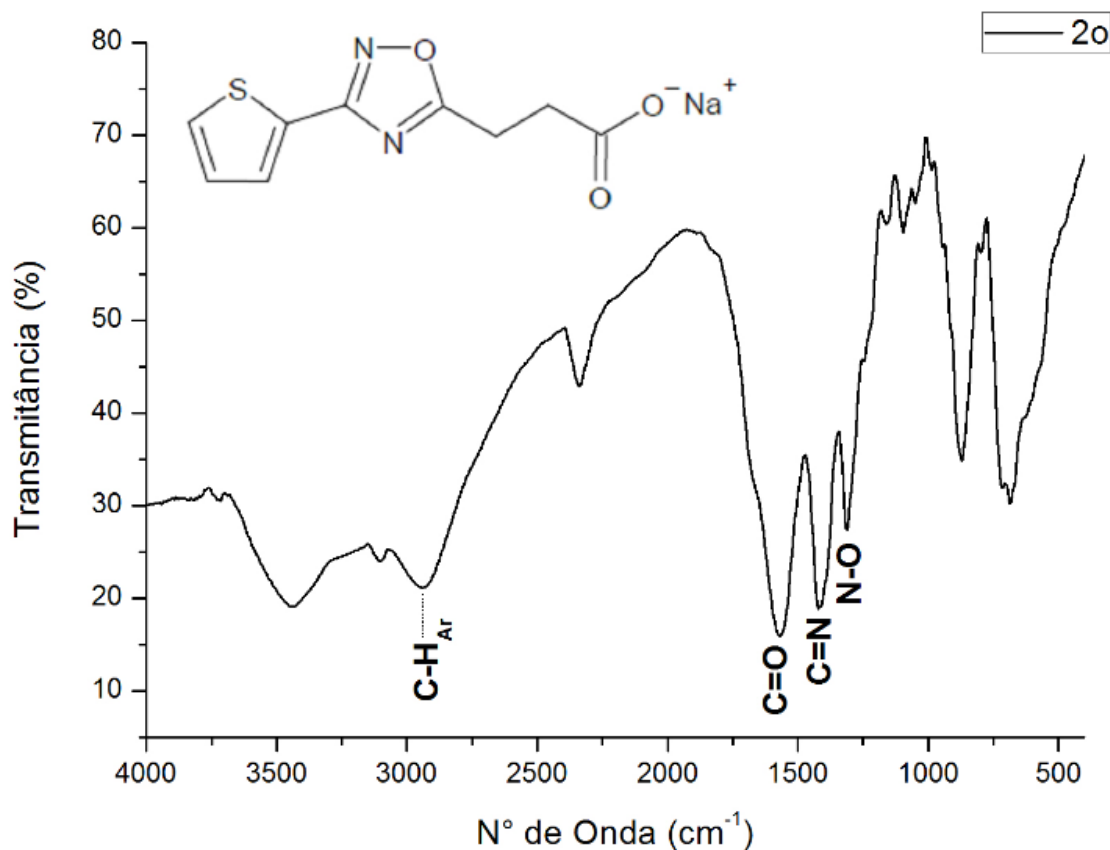


Figura 25 – Espectro de infravermelho do sal sódico **2o**.

Observa-se, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , do composto **2o** apresentado na Figura 26, dois tripletos na região de campo alto, sendo o primeiro com integração para dois hidrogênios, em 2,73 ppm e com constante de acoplamento  $J = 7,2$  Hz, relativo ao  $\text{CH}_2$  da cadeia alifática mais próxima da carbonila. Já o segundo, em 3,16 ppm, também com constante de acoplamento  $J = 7,2$  Hz e integração para dois hidrogênios, equivale ao  $\text{CH}_2$  mais desblindado, próximo ao anel do oxadiazol. Na região que corresponde ao anel aromático, tem-se um duplo duplete em 7,20 ppm com integração para dois hidrogênios e com constante de acoplamento  $J = 4,2$  e  $4,2$  Hz e, finalmente, simpleto em 7,67 ppm com integração para dois hidrogênios. Este padrão de acoplamento é típico de anéis heterocíclicos aromáticos.

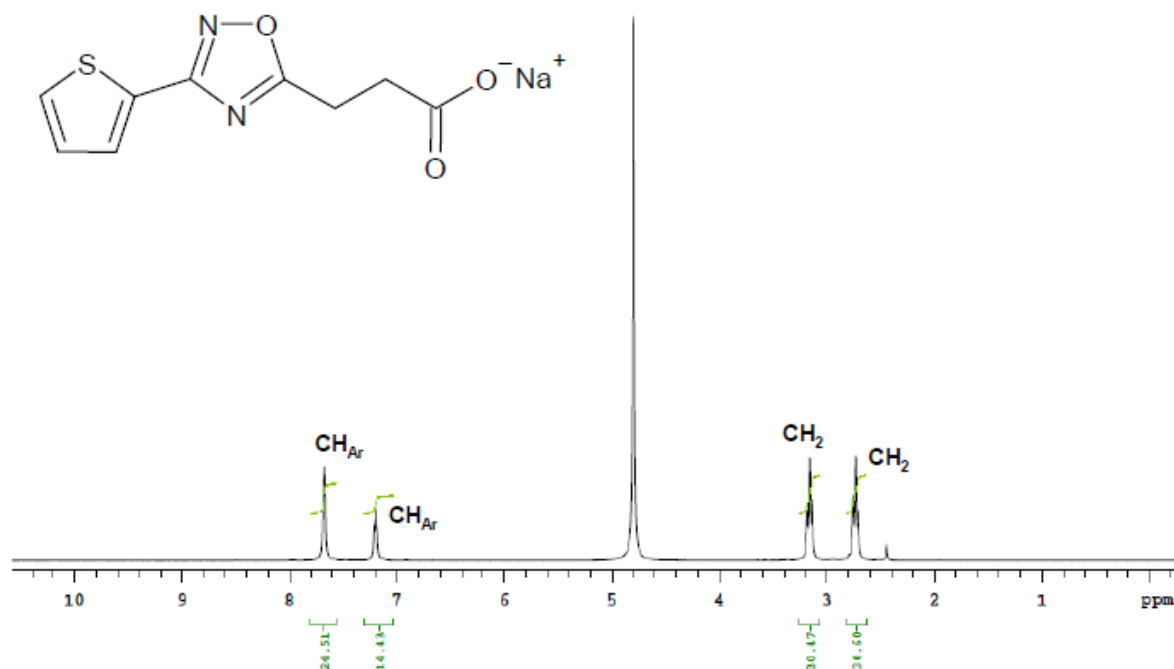


Figura 26 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do sal sódico **20**.

A Figura 28 corresponde ao espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do sal sódico **20**, em que cada sinal corresponde a um carbono presente em sua estrutura molecular. Os picos dos grupos metilenos estão em 23,0 e 33,0 ppm. A região dos carbonos aromáticos é compreendida entre 126,4 e 130,4 ppm. Os sinais em 130,4 e 130,1 ppm estão sobrepostos devido às semelhanças no ambiente químico dos carbonos. Os sinais na região de 163,5 e 179,6 ppm são relativos aos carbonos do heterociclo, na devida ordem,  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_5$ . O sinal mais desblindado é referente ao carbono do grupo carboxilato em 180,7 ppm.

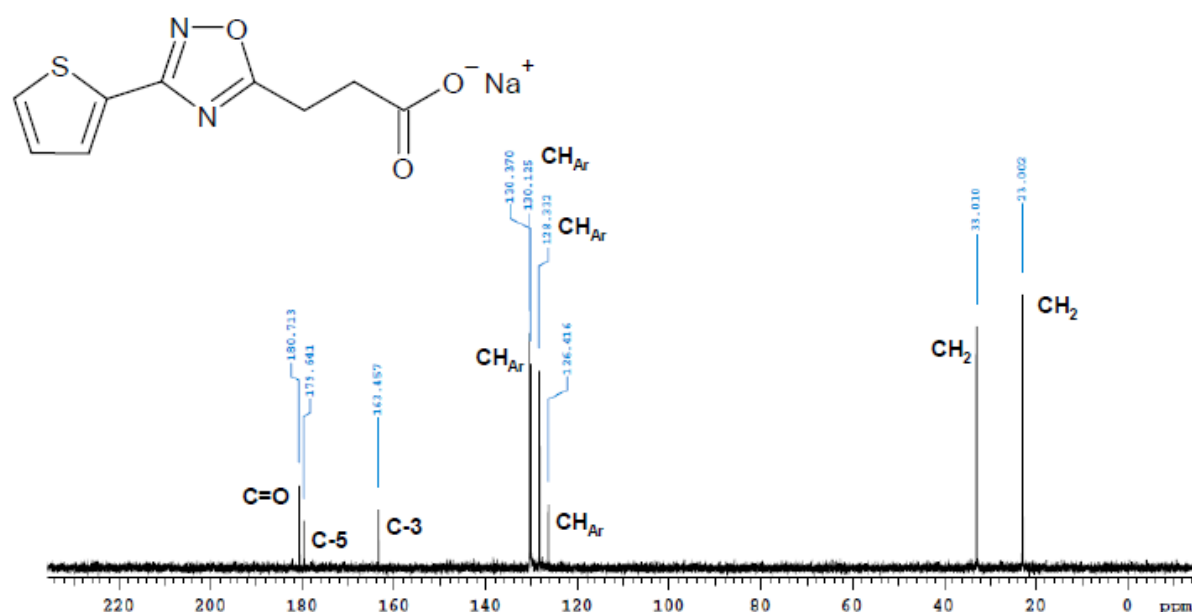


Figura 27 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do sal sódico **2o**.

### 3.3 Cinética de inibição enzimática

O mecanismo de inibição da enzima HKT recombinante de *Aedes aegypti* foi investigado através do estudo de sua cinética enzimática. De acordo com a Figura 28, que representa a curva de saturação, a reação da enzima na presença e ausência do inibidor de referência (**2a**) satisfaz o modelo de Michaelis-Menten (Eq. 1), e assim é estabelecido seu duplo-recíproco para gerar gráficos lineares de Lineweaver-Burk, objetivando estimar o tipo de mecanismo de inibição.

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Equação 1}$$

O gráfico de Lineweaver-Burk mostra um comportamento típico para cinética de inibição competitiva. Nesse tipo de inibição, **2a** ocupa o sítio ativo impedindo que o substrato 3-HK se ligue à enzima AeHKT, e um complexo enzima-inibidor é formado coibindo a função de transaminação da enzima AeHKT recombinante. Nesse sentido, pode-se determinar a saturação dos sítios ativos da enzima AeHKT a partir da teoria de Michaelis-Menten.



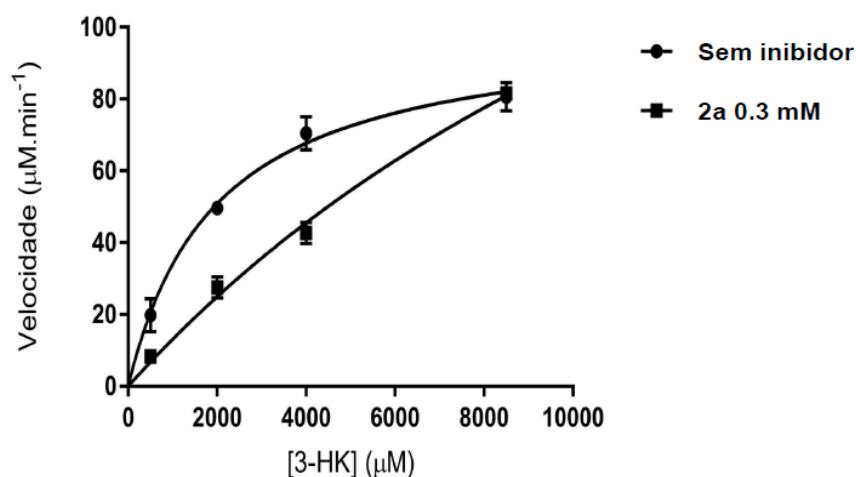


Figura 28 – Modelo cinético de inibição de Michaelis-Menten na presença e ausência do inibidor **2a**.

Em uma inibição competitiva a equação de Michaelis-Menten ganha um novo arranjo tornando-se,

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{\alpha K_m + [S]} \quad \text{Equação 2}$$

Em que:

$$V_0 = 1 + \frac{[I]}{K_i} \quad \text{Equação 3}$$

$$K_i = \frac{[I][S]}{[EI]} \quad \text{Equação 4}$$

A equação acima descreve características importantes da inibição competitiva. A constante de Michaelis-Menten,  $K_m$ , é uma variável determinada experimentalmente que representa a afinidade do sítio ativo da enzima pelo substrato, sendo dada pela concentração de substrato no ponto em que a metade da velocidade máxima é atingida. Em uma inibição competitiva, essa constante aumenta com um fator  $\alpha$  que representa a parcela de contribuição do inibidor. Em reações enzimáticas reversíveis do tipo competitivas as retas geradas no gráfico de Lineweaver-Burk se encontram no eixo y e representam o inverso da velocidade

máxima atingida pela reação, isso ocorre porque tanto o substrato quanto o inibidor competem pelo mesmo sítio ativo da enzima. Por ser reversível é possível deslocar o inibidor do sítio ativo com uma alta concentração de substrato sendo adicionada na reação, assim, o equilíbrio da reação é restabelecido e reação atinge sua velocidade máxima como apresentada na Figura 29, confirmando assim que nossa reação é do tipo competitiva.

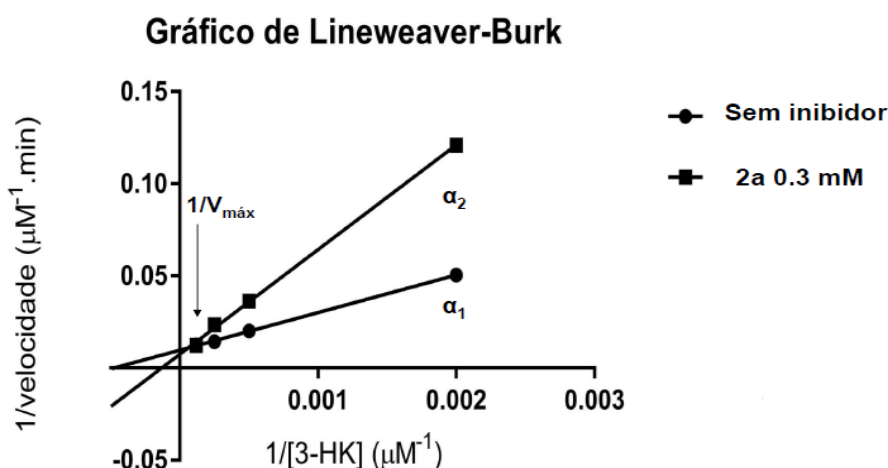


Figura 29 – Gráfico de Lineweaver-Burk para cinética da reação na presença e ausência do inibidor **2a**.

### 3.4 Estudo da inibição da AeHKT recombinante pelos sais sintetizados 2a-s

A atividade inibitória dos 19 compostos recém-sintetizados derivados dos 4-(3-(aril)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoatos de sódio foi investigada a partir de um método espectrométrico *ex vivo* capaz de detectar, com bastante sensibilidade, a atividade de inibição da enzima AeHKT. A partir da atividade inibitória dos ensaios enzimáticos com diferentes concentrações, uma curva dose-resposta foi construída para determinar a metade da concentração inibitória ( $CI_{50}$ ) máxima dos inibidores. O valor de  $CI_{50}$  foi obtido a partir da regressão não-linear da curva dose-resposta de cada um dos inibidores aqui sintetizados. Por exemplo, na Figura 30, há a curva dose-resposta para o inibidor **2d**, que apresentou o menor valor de  $CI_{50}$ , concentração inibitória para 50% da população de receptores, ou seja, é o melhor inibidor aqui sintetizado. O mesmo padrão de curva dose-resposta foi encontrado para os demais inibidores (Figura 31).

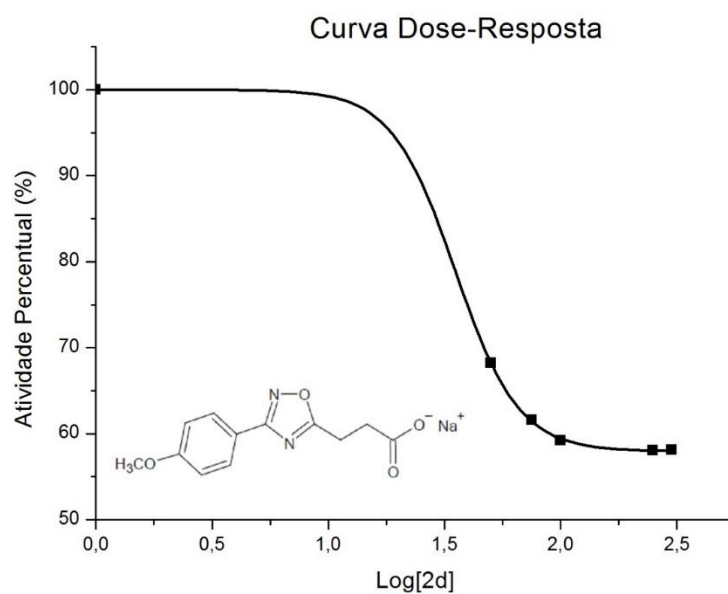


Figura 30 – Curva Dose-Resposta da reação de inibição entre AeHKT e o composto **2d**.

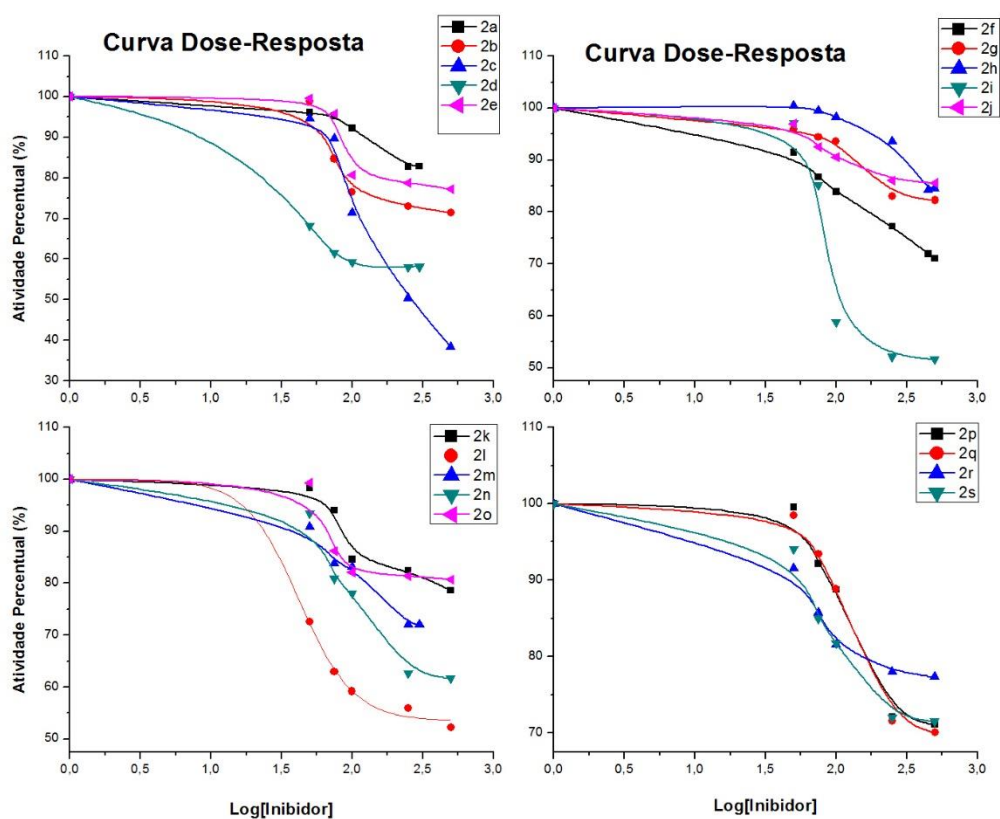


Figura 31 – Curvas Dose-Resposta para a atividade de todos os 19 inibidores **2a-s**.

Os valores de  $CI_{50}$  para os 19 sais estão compilados na Tabela 3. Algumas tendências com relação à estrutura dos compostos sintetizados e os valores de  $CI_{50}$  foram observadas.

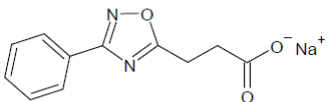
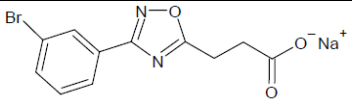
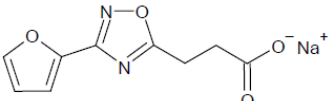
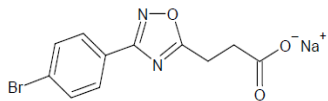
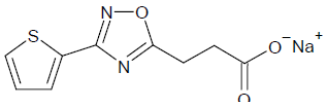
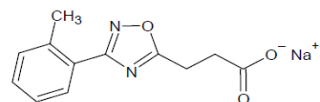
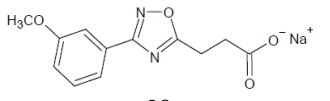
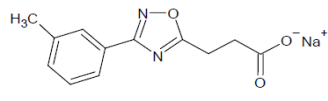
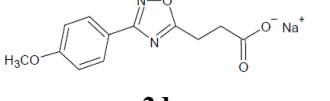
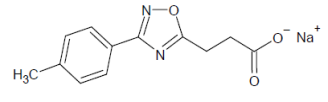
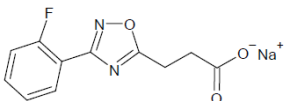
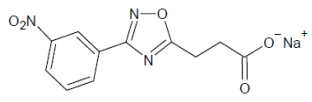
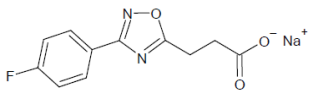
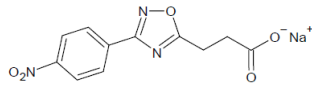
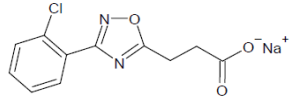
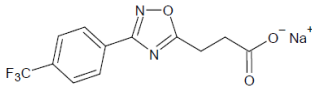
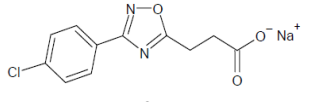
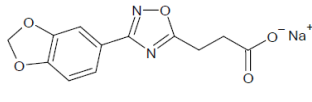
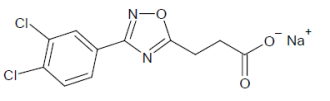
Por exemplo, a modificação do grupo aromático de 6 membros (**2a**, fenil) para anéis aromáticos de 5 membros em **2n** (2-furil) e/ou **2o** (2-tiofenil) foi positiva para a reação de inibição de AeHKT, já que o valor de  $CI_{50}$  diminuiu da seguinte forma **2a** (139,5 mM) > **2n** (83,6 mM) > **2o** (67,6 mM). De fato, o anel tiofeno é considerado bioisóstero de grupos fenila, uma vez que o anel do tiofeno é aromático e possui características eletrônicas semelhantes (BARREIRO; FRAGA, 2001). Isto pode estar relacionado aos tamanhos dos anéis, favorecendo o encaixe no sítio ativo da HKT.

Para os inibidores que possuem substituintes doadores de densidade eletrônica em seu anel aromático, os valores de  $CI_{50}$  diminuíram de acordo com a posição do substituinte em relação a seu afastamento com o anel 1,2,4-oxadiazólico, onde a seguinte tendência foi observada *para* < *meta* < *orto*. Essa propensão foi observada tanto para os inibidores **2b** (73,0 mM), **2h** (110,3 mM) e **2p** (339,0 mM) que possuem o grupo metila, como substituinte no anel aromático, quanto para os compostos **2j** (76,0 mM) e **2k** (84,5 mM) que possuem o grupo  $NO_2$  presente em seu anel aromático, indicando que compostos *orto* e *meta* dissustituídos configuram melhores candidatos a larvicidas. Dessa maneira, podemos sugerir que quanto mais distante a substituição no grupo aromático ao anel 1,2,4-oxadiazólico, mais efetiva é a inibição da enzima AeHKT. Porém, não foi observada essa tendência para os inibidores **2d** (*p*-anisoíla) e **2f** (*m*-anisoíla) que possuem o mesmo grupo retirador de densidade eletrônica, em que o *para* dissustituído é mais promissor que o *meta*.

Já os inibidores que possuem substituintes retiradores de densidade eletrônica se mostraram mais efetivos para inibir a atividade de AeHKT, com destaque para os inibidores **2d** (*p*-anisoíla) com  $CI_{50}$  = 35 mM e **2l** (*p*-trifluorometila) com  $CI_{50}$  = 42,3 mM que apresentaram os melhores desempenhos frente aos 17 outros compostos restantes, mesmo tendo a substituição em *para*, divergindo do que fora concluído anteriormente.

O efeito de inibição para compostos dissustituídos no anel aromático não foi tão eficaz, uma vez que o inibidor **2m** (3,4-diclorofenil) teve valor de  $IC_{50}$  = 85,9 mM semelhante à dos inibidores **2e** (84,8 mM) e **2s** (77,1 mM), que foram ligeiramente mais efetivos na reação de inibição e possuíam apenas um substituinte.

Tabela 3 - Valores de  $IC_{50}$  dos sais de oxadiazóis sintetizados na reação de inibição da HKT.

Inibidor	$IC_{50}(mM)$	Inibidor	$IC_{50}(mM)$
 <b>2a</b>	$139,2 \pm 1,55$	 <b>2r</b>	$60,7 \pm 1,02$
 <b>2n</b>	$83,6 \pm 1,10$	 <b>2c</b>	$119,2 \pm 1,23$
 <b>2o</b>	$67,6 \pm 1,02$	 <b>2h</b>	$339,0 \pm 1,53$
 <b>2f</b>	$157,1 \pm 1,73$	 <b>2p</b>	$110,3 \pm 1,09$
 <b>2d</b>	$35,0 \pm 1,02$	 <b>2b</b>	$73,0 \pm 1,07$
 <b>2q</b>	$116,0 \pm 1,04$	 <b>2k</b>	$84,5 \pm 1,07$
 <b>2g</b>	$124,2 \pm 1,28$	 <b>2j</b>	$76,0 \pm 1,04$
 <b>2s</b>	$77,1 \pm 1,06$	 <b>2l</b>	$42,3 \pm 1,09$
 <b>2e</b>	$84,8 \pm 1,02$	 <b>2i</b>	$82,6 \pm 1,01$
 <b>2m</b>	$85,9 \pm 1,33$		

## 4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

### Conclusões

Foram sintetizados 19 sais sódicos do ácido 4-(3-(aril)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanóico. Estes sais foram sintetizados em 3 etapas: síntese da amidoxima, reação entre a amidoxima e o anidrido succínico, reação para a formação do sal. Os sais foram obtidos em rendimentos que variaram entre 51 e 98%.

Estes sais foram testados em relação à inibição da enzima HKT de *A. aegypti* (AeHKT). A partir dessa reação, foi possível determinar a  $CI_{50}$  dos compostos da série de 4-(3-(aril)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoatos de sódio e evidenciar o potencial de inibição da enzima AeHKT.

O método espectroscópico *ex vivo* a partir da formação de um complexo entre o íon  $Fe^{+3}$  e ácido xanturênico foi eficiente para realização dos ensaios de inibição enzimática, já que a cinética da reação de inibição foi determinada satisfatoriamente foi possível obter curvas dose-resposta para definir os valores de  $CI_{50}$  dos 19 inibidores aqui sintetizados.

Os compostos contendo os grupos *p*-anisoíla e *p*-trifluorometila exibiram os melhores valores de  $CI_{50}$ , 35,0 e 42,3 mM, respectivamente. Os resultados mostraram, em linhas gerais, que os inibidores que possuem substituintes doadores de densidade eletrônica têm menores valores de  $CI_{50}$  sendo, portanto, candidatos mais promissores a inibidores da HKT de *A. aegypti*.

A partir dos ensaios de inibição, foi possível concluir que os sais sintetizados são inibidores competitivos da enzima AeHKT, promovendo o acúmulo de 3-HK no meio reacional. Este é um metabólito tóxico para as larvas, que provavelmente causaria a morte por estresse oxidativo devido a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

### Perspectivas

- Realizar estudos computacionais a fim de obter melhores correlações para entender como se dá a relação estrutura-atividade com os compostos sintetizados e testados.
- Sintetizar séries de compostos contendo o grupo 1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio com maior número de variações no anel substituído na posição C-3 do oxadiazol e depois avaliar o potencial desses inibidores em ensaios de inibição com a HKT.

- Sintetizar sais sódicos das séries de compostos 2C, 4C, 5C para futuros ensaios de inibição da enzima HKT de *Aedes aegypti*.
- Sintetizar sais sódicos de 3-(3-aryl-isoxazol-5-yl) das séries de compostos 2C, 3C, 4C, 5C para futuros ensaios de inibição da enzima HKT de *Aedes aegypti*.

## 5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 5.1 Procedimentos gerais

Os reagentes e solventes utilizados foram obtidos através dos fornecedores Aldrich®, Vetec®, Dinâmica®, Merck®. A técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada utilizando-se placas de sílica em suporte de alumínio contendo indicador fluorescente F254 do fornecedor Fluka® e para a revelação das manchas utilizou-se lâmpada ultravioleta.

### 5.2 Equipamentos utilizados

Os sais sódicos foram sintetizados com auxílio de um equipamento ultrassom da marca Soni-tech modelo BRANSONIC 2510E-DTH, que possui uma potência de 100 W. Um aparelho Electro-thermal modelo Mel-Temp do tipo analógico foi utilizado para determinar os pontos de fusão dos compostos, que não são corrigidos. Os espectros de infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro de tipo FT-IR da Shimadzu, modelo IR Prestige-21, na região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  usando pastilhas KBr como agente dispersante. As pastilhas foram preparadas pela mistura de aproximadamente 0,7 mg de cada composto. A mistura foi homogeneizada em um almofariz de ágata, transferida para o pastilhador e submetida a uma pressão de 8,0  $\text{ton cm}^{-2}$ , formando uma pastilha fina e translúcida. As massas moleculares dos compostos sintetizados foram obtidas em um Espectrômetro de Massa MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) com laser de Nd:YAG Smartbeam® com comprimento de onda de 355 nm em uma frequência de 100 Hz. Para a obtenção dos espectros de massas usou-se o método de matriz externa de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico, (10 mg/mL) em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 0,3%. Espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos em Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) Varian Unit Plus 300 MHz e Varian UNRMS 400 MHz. Os espectros foram obtidos a partir de 35 mg de cada composto, em que água deuterada foi utilizada como solvente para os sais sódicos e clorofórmio deuterado para os ácidos **1k**, **1l**, **1n**, **1q** e **1s**. Os dados para a reação da HKT com os inibidores foram adquiridos em espectrofotômetro de absorvância BIOTEK ELx800®.



### 5.3 Síntese dos ácidos 3-(aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanóicos

Para a síntese dos ácidos 3-(aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanóicos partiu-se de arilamidoximas que foram sintetizadas de acordo com o método de Tiemann, (1884). Em um balão de reação de 150 mL foram adicionados 7,35 mmol da arilamidoxima correspondente e 11,02 mmol do anidrido succínico (1,5 equivalente molar) sob forte agitação com barra magnética até fusão dos sólidos em banho de óleo a aproximadamente 140 °C. A reação terminou, em média, em 2 horas, onde verificou-se seu término com o consumo total da arilamidoxima a partir de CCD.

Foram então adicionados 10 mL de uma solução de bicarbonato de sódio saturado e 10 mL de diclorometano. A extração foi realizada *overnight* sob forte agitação magnética para manter a mistura entre as duas fases. No dia seguinte, as fases foram separadas, a fase orgânica descartada e foi adicionada solução saturada de ácido cítrico anidro à fase aquosa até pH ácido. A solução foi transferida para um funil de separação e foram realizadas extrações com diclorometano (2 x 10 mL). As fases orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O sólido obtido foi lavado com água para remoção de ácido cítrico remanescente. O sólido foi recristalizado com uma mistura de clorofórmio e hexano. A Tabela 4 compara os rendimentos percentuais e pontos de fusão dos ácidos 3-(aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanóicos obtidos e os valores descritos pela literatura.

Tabela 4 – Rendimento percentual, ponto de fusão e solvente de recristalização dos ácidos obtidos comparados com valores encontrados na literatura.

Substância	Rendimento (%)	Rendimento (%) Lit.	P. F (°C)	P. F (°C) Lit.	Solvente de Recristalização
<b>1a</b>	80	73	102-103	119-120 <sup>a</sup>	CHCl <sub>3</sub> :Hexano
<b>1b</b>	62	76	108-110	144-145 <sup>a</sup>	CHCl <sub>3</sub> :Hexano
<b>1c</b>	65	77	118-120	156-157 <sup>a</sup>	CHCl <sub>3</sub> :Hexano
<b>1d</b>	61	82	115-116	138-139 <sup>a</sup>	CHCl <sub>3</sub> :Hexano
<b>1e</b>	79	77	130-132	153-154 <sup>a</sup>	CHCl <sub>3</sub> :Hexano
<b>1f</b>	70	71	75-76	113-115 <sup>b</sup>	CHCl <sub>3</sub> :Hexano
<b>1g</b>	63	78	130-131	146-147 <sup>a</sup>	CHCl <sub>3</sub> :Hexano
<b>1h</b>	63	74	82-84	101-102 <sup>a</sup>	CHCl <sub>3</sub> :Hexano

<b>1i</b>	82	51	125-126	126-128 <sup>b</sup>	CHCl <sub>3</sub> :Hexano
<b>1j</b>	76	84	118-120	134-135 <sup>a</sup>	CHCl <sub>3</sub> :Hexano
<b>1k</b>	80	-	121-122	-	CHCl <sub>3</sub> :Hexano
<b>1l</b>	62	-	110-112	-	CHCl <sub>3</sub> :Hexano
<b>1m</b>	70	70	125-127	133-135 <sup>b</sup>	CHCl <sub>3</sub> :Hexano
<b>1n</b>	30	-	75-76	-	CHCl <sub>3</sub> :Hexano
<b>1o</b>	57	49	91-93	95 <sup>b</sup>	CHCl <sub>3</sub> :Hexano
<b>1p</b>	98	74	79-80	101-102 <sup>a</sup>	CHCl <sub>3</sub> :Hexano
<b>1q</b>	53	-	83-85	-	CHCl <sub>3</sub> :Hexano
<b>1r</b>	82	82	103-104	131-134 <sup>a</sup>	CHCl <sub>3</sub> :Hexano
<b>1s</b>	73	-	78-80	-	CHCl <sub>3</sub> :Hexano

<sup>a</sup>Neves Filho *et al.* (2009).

<sup>b</sup>Alves, (2011).

**Ácido 4-[3-(3-Nitrofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanóico (1k):** sólido amarelo claro; rendimento 80%; P.F.: 121-122 °C. RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ(ppm): 3,04 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz, CH<sub>2</sub>); 3,29 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz, CH<sub>2</sub>); 7,68 (d, 1H, *J* = 8,4;7,6 Hz, H<sub>aromatic</sub>); 8,40-8,34 (dd, 2H, *J* = 8,4; 8,0 Hz, H<sub>aromatic</sub>); 8,91 (s, 1H, H<sub>aromatic</sub>). RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ(ppm): 21,7; 29,9; 122,6; 125,7; 128,5; 130,0; 133,0; 166,7; 175,7; 178,9.

**Ácido 4-[3-(4-Trifluorometilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanóico (1l):** sólido branco; rendimento 62%; P.F.; 110-112 °C. RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 3,02 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz, CH<sub>2</sub>); 3,27 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz, CH<sub>2</sub>); 7,73 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz H<sub>aromatic</sub>); 8,18 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, H<sub>aromatic</sub>). RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 21,7; 30,1; 122,3; 125,0; 125,8; 125,8; 127,7; 130,0; 133,1; 167,3; 176,8; 178,6. EMAS[MALDI-TOF] calculada para C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M-H]<sup>+</sup>: 285,0481; encontrado: 284,1118.

**Ácido 4-[3-(2-furilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanóico (1n):** sólido branco; rendimento 62%; P.F.; 110-112 °C. RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 2,99 (t, 2H, *J* = 7,6 Hz, CH<sub>2</sub>); 3,23 (t, 2H, *J* = 7,6 Hz, CH<sub>2</sub>); 6,55-6,51 (m, 1H, H<sub>aromatic</sub>); 7,11 (d, 2H, *J* = 3,2 Hz, H<sub>aromatic</sub>); 7,59 (d, 2H, *J* = 0,8 Hz, H<sub>aromatic</sub>). RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 21,6; 30,0; 111,8; 113,8; 141,9; 145,2; 161,2; 176,5; 178,2. EMAS[MALDI-TOF] calculada para C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 209,0556; encontrado: 210,6012.

**Ácido 4-[3-(2-Fluorfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanóico (1q):** sólido branco; rendimento 53%; P.F.; 83-85 °C. RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 3,02 (t, 2H, *J* = 6,8 Hz, CH<sub>2</sub>);

3,29 (t, 2H,  $J = 6,8$  Hz, CH<sub>2</sub>); 7,29-7,20 (m, 2H, H<sub>aromático</sub>); 7,25-7,46 (m, 1H, H<sub>aromático</sub>); 8,02-8,06 (m, 1H, H<sub>aromático</sub>). RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 21,6; 30,2; 116,8; 124,4; 130,7; 132,8; 159,4; 161,9; 165,1; 176,8; 177,7. EMAS[MALDI-TOF] calculada para C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 237,0669; encontrado: 237,7582.

**Ácido 4-[3-(2-Clorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanóico (1s):** sólido branco; rendimento 73%; P.F.: 78-80 °C. RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 3,02 (t, 2H,  $J = 7,2$  Hz, CH<sub>2</sub>); 3,30 (t, 2H,  $J = 7,2$  Hz, CH<sub>2</sub>); 7,35-7,45 (m, 2H, H<sub>aromático</sub>); 7,53 (dd, 2H,  $J = 7,6$ ; 1,2 Hz, H<sub>aromático</sub>); 7,90 (dd, 1H,  $J = 7,2$ ; 2,0 Hz, H<sub>aromático</sub>). RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 21,6; 30,2; 125,8; 126,4; 130,8; 131,6; 131,7; 133,4; 167,0; 176,9; 177,6. EMAS[MALDI-TOF] calculada para C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 253,0374; encontrado: 252,7416.

#### 5.4 Síntese dos 3-(aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoatos de sódio

Em um balão de 20 mL, dissolveu-se 0,956 mmol do ácido (ácido 4-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il) propanóico) correspondente em 4,8 mL (38,2 mg, 0,956 mmol) de uma solução de hidróxido de sódio 1% (m/v) em metanol. A mistura resultante foi mantida sob sonicação durante 60 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o solvente foi evaporado em rotaevaporador e o sólido final foi lavado com clorofórmio a quente, seguido de filtração a vácuo.

**4-(3-Fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de sódio (2a):** sólido branco; rendimento 93%; P.F.: 171-172 °C. RMN de <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 300 MHz)  $\delta$ (ppm): 2,56 (t, 2H,  $J = 7,35$  Hz, CH<sub>2</sub>); 2,98 (t, 2H,  $J = 7,35$  Hz, CH<sub>2</sub>); 7,44-7,32 (m, 3H, H<sub>aromático</sub>); 7,66 (d, 2H,  $J = 7,8$ Hz, H<sub>aromático</sub>). RMN de <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O, 100 MHz)  $\delta$ (ppm): 23,0; 33,0; 125,2; 126,9; 129,0; 131,6; 167,4; 179,6; 180,6. FT-IR (pastilha de KBr)  $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$ : 2925 (C-H<sub>arom</sub>); 1691 (C=O); 1582 (C=N); 1205 (N-O). EMAS[MALDI-TOF] calculada para C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 241,0583; encontrado: 241,0707.

**4-[3-(4-Metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio (2b):** sólido branco; rendimento 98%; P.F.: 179-180 °C. RMN de <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 300 MHz)  $\delta$ (ppm): 2,19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,54 (t, 2H,  $J = 7,5$  Hz, CH<sub>2</sub>); 2,95 (t, 2H,  $J = 7,5$  Hz, CH<sub>2</sub>); 7,11 (d, 2H,  $J = 8,1$ Hz, H<sub>aromático</sub>); 7,50 (d, 2H,  $J = 8,1$  Hz, H<sub>aromático</sub>). RMN de <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O, 100 MHz)  $\delta$  (ppm): 20,5; 22,9; 32,9; 122,2; 126,8; 129,5; 142,5; 167,3; 179,6; 180,4. FT-IR (pastilha de KBr)  $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$ : 2939 (C-

H<sub>arom</sub>); 1650 (C=O); 1561 (C=N); 1223 (N-O). EMAS[MALDI-TOF] calculada para C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 255,0740; encontrado: 255,0982.

**4-[3-(4-Bromofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio (2c):** sólido branco; rendimento 90%; P.F.; 238-240 °C. RMN de <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 300 MHz) δ (ppm): 2,62 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz, CH<sub>2</sub>); 3,06 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz, CH<sub>2</sub>); 7,36 (d, 2H, *J* = 8,7 Hz H<sub>aromático</sub>); 7,43(d, 2H, *J* = 8,7 Hz, H<sub>aromático</sub>). RMN de <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O, 100 MHz) δ (ppm): 23,1; 33,0; 124,1; 125,4; 128,4; 131,9; 166,7; 179,6; 180,8. FT-IR (pastilha de KBr) ν<sub>máx</sub>/cm<sup>-1</sup>: 2943 (C-H<sub>arom</sub>) 1589 (C=O); 1473 (C=N); 1195 (N-O). EMAS[MALDI-TOF] calculada para C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>BrN<sub>2</sub>NaO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 318,9688; encontrado: 319,8952.

**4-[3-(4-Metóxfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio (2d):** sólido marrom claro; rendimento 92%; P.F.; 214-215 °C. RMN de <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 300 MHz) δ (ppm): 2,63 (t, 2H, *J* = 6,9 Hz, CH<sub>2</sub>); 3,07 (t, 2H, *J* = 6,9 Hz, CH<sub>2</sub>); 3,77 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6,98 (d, 2H, *J* = 8,7 Hz, H<sub>aromático</sub>); 7,76 (dd, *J* = 8,7 Hz, 1,8 Hz, H<sub>aromático</sub>). RMN de <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O, 100 MHz) δ (ppm): 20,8; 30,8; 53,2; 112,1; 115,7; 126,5; 159,2; 164,9; 177,5; 178,2. FT-IR (pastilha de KBr) ν<sub>máx</sub>/cm<sup>-1</sup>: 2966 (C-H<sub>arom</sub>); 1609 (C=O); 1423 (C=N); 1237 (N-O). EMAS[MALDI-TOF] calculada para C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 271,0689; encontrado: 271,1074.

**4-[3-(4-Clorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio (2e):** sólido branco; rendimento 97%; P.F.; 217-218 °C. RMN de <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 300 MHz) δ (ppm): 2,64 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz, CH<sub>2</sub>); 3,10 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz, CH<sub>2</sub>); 7,40(d, 2H, *J* = 8,7 Hz, H<sub>aromático</sub>); 7,73 (d, 2H, *J* = 8,7 Hz, H<sub>aromático</sub>). RMN de <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O, 100 MHz) δ (ppm): 20,9; 30,9; 121,6; 126,2; 126,8; 134,8; 164,5; 177,4; 178,7. FT-IR (pastilha de KBr) ν<sub>máx</sub>/cm<sup>-1</sup>: 2962 (C-H<sub>arom</sub>); 1589 (C=O); 1423 (C=N); 1195 (N-O). EMAS[MALDI-TOF] calculada para C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>2</sub>NaO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 275,0193; encontrado: 275,0217.

**4-[3-(3-Metóxfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio (2f):** sólido branco; rendimento 76%; P.F.; 148-150 °C. RMN de <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 300 MHz) δ (ppm): 2,29 (s, 1H); 2,64 (t, 2H, *J* = 7,35 Hz, CH<sub>2</sub>); 3,09 (t, 2H, *J* = 7,35 Hz, CH<sub>2</sub>); 3,76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 7,05 (ddd, 2H, *J* = 8,1 Hz; 7,8 Hz; 1,2 Hz, H<sub>aromático</sub>); 7,33-7,44 (m, 3H, H<sub>aromático</sub>). RMN de <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O, MHz) δ (ppm): 14,6; 20,9; 30,9; 37,0; 53,2; 109,6; 115,3; 117,5; 124,4; 128,2; 156,8; 165,1; 177,5; 178,5; 180,2. FT-IR (pastilha de KBr) ν<sub>máx</sub>/cm<sup>-1</sup>: 2953 (C-H<sub>arom</sub>); 1582 (C=O); 1452 (C=N); 1230 (N-O). EMAS[MALDI-TOF] calculada para C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 271,0689; encontrado: 271,0772.

**4-[3-(4-Fluorfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio (2g):** sólido branco; rendimento 96%; P.F.; 190-192 °C. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 2,58 (t, 2H,  $J = 7,35$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 3,02 (t, 2H,  $J = 7,35$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 7,02 (dd, 2H,  $J = 8,7$  Hz e 9,0 Hz,  $\text{H}_{\text{aromático}}$ ); 7,61-7,66 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{aromático}}$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm): 22,9; 33,0; 115,8; 116,1; 121,56; 121,6; 129,3; 129,4; 162,7; 166,0; 166,7; 179,6; 180,8. FT-IR (pastilha de KBr)  $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$ : 2939 ( $\text{C-H}_{\text{arom}}$ ); 1608 ( $\text{C=O}$ ); 1554 ( $\text{C=N}$ ); 1241 ( $\text{N-O}$ ). EMAS[MALDI-TOF] calculada para  $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{FN}_2\text{NaO}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 259,0489; encontrado: 259,0794.

**4-[3-(2-Metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio (2h):** sólido branco; rendimento 92%, P.F.; 170 °C (Decomposição). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 2,31 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 2,63 (t, 2H,  $J = 6,9$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 3,08 (t, 2H,  $J = 6,9$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 7,22-7,37 (m, 3H,  $\text{H}_{\text{aromático}}$ ); 7,56 (d, 1H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{H}_{\text{aromático}}$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm): 18,01; 20,8; 30,9; 32,0; 122,7; 123,9; 127,4; 128,9; 130,0; 135,7; 165,8; 177,5; 177,8. FT-IR (pastilha de KBr)  $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$ : 2973 ( $\text{C-H}_{\text{arom}}$ ); 1575 ( $\text{C=O}$ ); 1444 ( $\text{C=N}$ ); 1195 ( $\text{N-O}$ ). EMAS[MALDI-TOF] calculada para  $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{NaO}_3$   $[\text{M}]^+$ : 254,0661; encontrado: 254,7268.

**4-[3-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio (2i):** sólido branco; rendimento 94%, P.F.; 185-186 °C. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 2,62 (t, 2H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 3,07 (t, 2H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 5,94 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ); 6,86 (d, 1H,  $J = 8,4$  Hz,  $\text{H}_{\text{aromático}}$ ); 7,23 (d, 1H,  $J = 1,2$  Hz,  $\text{H}_{\text{aromático}}$ ); 7,36 (dd, 1H,  $J = 8,7$  Hz e 1,2 Hz,  $\text{H}_{\text{aromático}}$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm): 20,8; 30,9; 99,7; 104,6; 106,5; 116,8; 120,0; 145,3; 147,7; 164,9; 177,5; 178,30. FT-IR (pastilha de KBr)  $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$ : 2902 ( $\text{C-H}_{\text{arom}}$ ); 1582 ( $\text{C=O}$ ); 1458 ( $\text{C=N}$ ); 1230 ( $\text{N-O}$ ); 1023 ( $\text{C-O}$ ). EMAS[MALDI-TOF] calculada para  $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_2\text{NaO}_5$   $[\text{M}]^+$ : 284,0403; encontrado: 284,7558.

**4-[3-(4-Nitrofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio (2j):** sólido amarelo claro; rendimento 97%; P.F.; 225-226 °C. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 2,67 (t, 2H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 3,15 (t, 2H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 8,05 (d, 2H,  $J = 8,7$  Hz,  $\text{H}_{\text{aromático}}$ ); 8,25 (d, 2H,  $J = 8,7$  Hz,  $\text{H}_{\text{aromático}}$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm): 23,1; 33,1; 124,1; 128,2; 131,6; 148,9; 166,2; 179,7; 181,6. FT-IR (pastilha de KBr)  $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$ : 2925 ( $\text{C-H}_{\text{arom}}$ ); 1589 ( $\text{C=O}$ ); 1506 ( $\text{C=N}$ ); 1306 ( $\text{N-O}$ ). EMAS[MALDI-TOF] calculada para  $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_3\text{NaO}_5$   $[\text{M}-\text{H}]^+$ : 284,0277; encontrado: 284,0463.

**4-[3-(3-Nitrofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio (2k):** sólido amarelo claro; rendimento 96%; P.F.; 202-203 °C. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 2,88 (t, 2H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 3,33 (t, 2H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 7,73 (dd, 1H,  $J = 8,1$  e 8,4 Hz,  $\text{H}_{\text{aromático}}$ ); 8,20 (d, 1H,

$J = 8,4$  Hz,  $H_{\text{aromatic}}$ ), 8,34 (d, 1H,  $J = 8,1$  Hz,  $H_{\text{aromatic}}$ ), 8,53 (s, 1H,  $H_{\text{aromatic}}$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm): 23,1; 33,0; 121,7; 126,0; 126,9; 130,5; 133,1; 147,7; 166,0; 179,6; 181,5. FT-IR (pastilha de KBr)  $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$ : 2953 ( $\text{C-H}_{\text{arom}}$ ); 1592 ( $\text{C=O}$ ); 1506 ( $\text{C=N}$ ); 1327 ( $\text{N-O}$ ). EMAS[MALDI-TOF] calculada para  $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_3\text{NaO}_5$   $[\text{M-H}]^+$ : 284,0277; encontrado: 284,0625.

**4-[3-(4-Trifluorometilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio (2l):** sólido branco; rendimento 98%; P.F.: 194-195 °C. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 2,66 (t, 2H,  $J = 7,35$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 3,13 (t, 2H,  $J = 7,35$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 7,73 (d, 2H,  $J = 8,1$  Hz  $H_{\text{aromatic}}$ ); 7,96 (d, 2H,  $J = 8,1$  Hz,  $H_{\text{aromatic}}$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm): 23,1; 33,1; 125,4; 127,4; 128,8; 132,4; 166,5; 179,6; 181,2. FT-IR (pastilha de KBr)  $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$ : 2939 ( $\text{C-H}_{\text{arom}}$ ); 1568 ( $\text{C=O}$ ); 1437 ( $\text{C=N}$ ); 1320 ( $\text{N-O}$ ). EMAS[MALDI-TOF] calculada para  $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{F}_3\text{N}_2\text{NaO}_3$   $[\text{M+H}]^+$ : 309,0457; encontrado: 309,0762.

**4-[3-(3,4-Diclorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio (2m):** sólido branco; rendimento 98%; P.F.: 270-272 °C. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 2,77 (t, 2H,  $J = 7,35$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 3,23 (t, 2H,  $J = 7,35$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 7,40 (d, 1H,  $J = 8,1$  Hz,  $H_{\text{aromatic}}$ ); 7,51 (d, 1H,  $J = 8,1$  Hz,  $H_{\text{aromatic}}$ ); 7,64 (s, 1H,  $H_{\text{aromatic}}$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm): 23,1; 33,1; 125,1; 126,2; 128,3; 130,8; 132,4; 134,9; 165,6; 179,5; 181,0. FT-IR (pastilha de KBr)  $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$ : 2925 ( $\text{C-H}_{\text{arom}}$ ); 1692 ( $\text{C=O}$ ); 1582 ( $\text{C=N}$ ); 1272 ( $\text{N-O}$ ). EMAS[MALDI-TOF] calculada para  $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{N}_2\text{NaO}_3$   $[\text{M+H}]^+$ : 308,9804; encontrado: 308,7603.

**4-[3-(2-Furil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio (2n):** sólido amarelo claro; rendimento 51%; P.F.: 239-240 °C. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 2,45 (s, 1H,); 2,77 (t, 2H,  $J = 7,05$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 3,22 (t, 2H,  $J = 7,05$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 6,70 (s, 1H,  $H_{\text{aromatic}}$ ); 7,18 (s, 1H,  $H_{\text{aromatic}}$ ); 7,76 (s, 1H,  $H_{\text{aromatic}}$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm): 22,9; 32,9; 34,2; 112,0; 114,5; 140,8; 146,1; 160,3; 179,7; 180,9. FT-IR (pastilha de KBr)  $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$ : 2910 ( $\text{C-H}_{\text{arom}}$ ); 1635 ( $\text{C=O}$ ); 1549 ( $\text{C=N}$ ); 1222 ( $\text{N-O}$ ); 1024 ( $\text{C-O-C}$ ). EMAS[MALDI-TOF] calculada para  $\text{C}_9\text{H}_7\text{N}_2\text{NaO}_4$   $[\text{M}]^+$ : 230,0298; encontrado: 230,7160.

**4-[3-(2-Tiofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio (2o):** sólido branco; rendimento 96%; P.F.: 188-190 °C. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 2,73 (t, 2H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 3,16 (t, 2H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 7,20 (dd, 1H,  $J = 4,2$ ; 4,2 Hz,  $H_{\text{aromatic}}$ ); 7,67 (s, 2H,  $H_{\text{aromatic}}$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm): 23,0; 33,0; 126,4; 128,2; 130,1; 130,4; 163,4; 179,6; 180,7. FT-IR (pastilha de KBr)  $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$ : 2925 ( $\text{C-H}_{\text{arom}}$ ); 1572 ( $\text{C=O}$ ); 1417 ( $\text{C=N}$ ); 1313

(N-O). EMAS[MALDI-TOF] calculada para  $C_9H_7N_2NaO_3S$   $[M+H]^+$ : 247,0147; encontrado: 247,0458.

**4-[3-(3-Metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio (2p):** sólido branco; rendimento 93%; P.F.; 95-97 °C. RMN de  $^1H$  ( $D_2O$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 2,70 (t, 2H,  $J = 7,8$  Hz,  $CH_2$ ); 3,12 (t, 2H,  $J = 7,8$  Hz,  $CH_2$ ); 7,33 (d, 2H,  $J = 4,2$  Hz,  $H_{aromatic}$ ); 7,56 (d, 2H,  $J = 5,7$  Hz,  $H_{aromatic}$ ). RMN de  $^{13}C$  ( $D_2O$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm): 20,3; 23,0; 33,0; 123,9; 125,1; 127,3; 128,8; 132,3; 139,1; 167,4; 179,6; 180,8. FT-IR (pastilha de KBr)  $\nu_{max}/cm^{-1}$ : 2946 (C- $H_{arom}$ ); 1691 (C=O); 1589 (C=N); 1216 (N-O). EMAS[MALDI-TOF] calculada para  $C_{12}H_{11}N_2NaO_3$   $[M]^+$ : 254,0661; encontrado: 254,7474.

**4-[3-(2-Fluorfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio (2q):** sólido branco; rendimento 86%; P.F.; 170-172 °C. RMN de  $^1H$  ( $D_2O$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 2,75 (t, 2H,  $J = 7,35$  Hz,  $CH_2$ ); 3,20 (t, 2H,  $J = 7,35$  Hz,  $CH_2$ ); 7,31-7,21 (m, 2H,  $H_{aromatic}$ ); 7,58-7,52 (m, 1H,  $H_{aromatic}$ ); 7,80 (dd, 1H,  $J = 7,2$ ; 7,5 Hz,  $H_{aromatic}$ ). RMN de  $^{13}C$  ( $D_2O$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm): 22,9; 33,1; 34,2; 113,3; 116,6; 124,7; 130,0; 133,6; 158,3; 161,6; 164,2; 179,6; 180,2. FT-IR (pastilha de KBr)  $\nu_{max}/cm^{-1}$ : 3049 (C- $H_{arom}$ ); 1685 (C=O); 1596 (C=N); 1285 (N-O). EMAS[MALDI-TOF] calculada para  $C_{11}H_8FN_2NaO_3$   $[M+H]^+$ : 259,0489; encontrado: 259,1279.

**4-[3-(3-Bromofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio (2r):** sólido branco; rendimento 62%; P.F.; 118-120 °C. RMN de  $^1H$  ( $D_2O$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 2,75 (t, 2H,  $J = 7,35$  Hz,  $CH_2$ ); 3,19 (t, 2H,  $J = 7,35$  Hz,  $CH_2$ ); 7,26 (dd, 1H,  $J = 8,1$ ; 7,5 Hz,  $H_{aromatic}$ ); 7,53 (d, 1H,  $J = 8,1$  Hz,  $H_{aromatic}$ ); 7,64 (d, 1H,  $J = 8,1$  Hz,  $H_{aromatic}$ ); 7,74 (s, 1H,  $H_{aromatic}$ ). RMN de  $^{13}C$  ( $D_2O$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm): 23,1; 33,1; 122,2; 125,6; 127,0; 129,5; 130,6; 134,3; 166,2; 179,6; 180,8. FT-IR (pastilha de KBr)  $\nu_{max}/cm^{-1}$ : 2939 (C- $H_{arom}$ ); 1671 (C=O); 1561 (C=N); 1202 (N-O). EMAS[MALDI-TOF] calculada para  $C_{11}H_8BrN_2NaO_3$   $[M+H]^+$ : 318,9688; encontrado: 318,7591.

**4-[3-(2-Clorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio (2s):** sólido branco; rendimento 98%; P.F.; 118-120 °C. RMN de  $^1H$  ( $D_2O$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 2,61 (t, 2H,  $J = 6,8$  Hz,  $CH_2$ ); 3,06 (t, 2H,  $J = 6,8$  Hz,  $CH_2$ ); 7,23-7,36 (m, 3H,  $H_{aromático}$ ); 7,53 (d, 1H,  $J = 7,6$  Hz,  $H_{aromatic}$ ). RMN de  $^{13}C$  ( $D_2O$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm): 22,9; 33,0; 34,2; 124,4; 127,3; 130,6; 131,3; 132,4; 166,2; 179,6; 180,3. FT-IR (pastilha de KBr)  $\nu_{max}/cm^{-1}$ : 2944 (C- $H_{arom}$ ); 1721 (C=O); 1558 (C=N); 1292 (N-O). EMAS[MALDI-TOF] calculada para  $C_{11}H_8ClN_2NaO_3$   $[M+H]^+$ : 274,6355; encontrado: 274,6786.

### 5.5 Clonagem, expressão e purificação da enzima 3-HKT recombinante de *Aedes aegypti*

A enzima 3-HKT recombinante de *Aedes aegypti* foi adquirida através das mesmas técnicas de clonagem, expressão e purificação descritas por Maciel, (2016).

### 5.6 Ensaios de inibição enzimática

O teste de inibição foi realizado segundo Maciel e colaboradores (2019). Os ensaios de inibição foram realizados com pré-incubação de cada composto **2a-s** em concentrações variando de 0,5 mM a 0,05 mM juntamente com o cofator PLP (piridoxal 5'-fosfato) e a HKT. Sendo assim, as reações foram realizadas em placas de 96 poços contendo, em cada poço, 8 µL de PLP a 0,5 mM, 30 µL do referido sal de oxadiazol na concentração desejada (5 mM a 0,05 mM), todos diluídos em tampão HEPES 200 mM, pH 7,5/ NaCl 100 mM, adicionados de 2 µg de HKT recombinante em tampão HEPES, atingindo um volume final de 58 µL. Após 30 minutos de pré-incubação a 50°C, foram adicionados 8 µL de 3-hidróxi-D,L-quinurenina a 25 mM e 4 µL de piruvato de sódio a 50 mM, além do tampão HEPES 200 mM, pH 7,5/ NaCl 100 mM, atingindo um volume final de 100 µL. As placas foram incubadas a 50 °C durante 5 minutos e depois foram adicionados 100 µL de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O a 10 mM em HCl 0,1 N para interromper a reação e gerar o complexo AX-Fe<sup>+3</sup>. Os dados foram adquiridos no espectrofotômetro de absorbância BIOTEK ELx800®. As amostras foram realizadas em duplicata e as absorbâncias foram lidas a 570 nm. Em cada teste, o controle negativo foi adicionado para calcular a porcentagem de atividade de cada sal.



## REFERÊNCIAS

- ACCORSI, A.; ZIBAEE, A.; MALAGOLI, D. The multifaceted activity of insect caspases. **Journal of Insect Physiology**, [s.l.], v. 76, p.17-23, maio 2015.
- ADIB, Mehdi et al. Microwave-assisted efficient, one-pot, three-component synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles under solvent-free conditions. **Tetrahedron Letters**, [s.l.], v. 47, n. 17, p.2965-2967, abr. 2006.
- AKHREM, A. A.; LAKHVICH, F. A.; KHRIPACH, V. A. Isoxazole derivatives in the synthesis of bifunctional compounds by cleavage of the heteroring (review). **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, [s.l.], v. 17, n. 9, p.853-868, set. 1981.
- AKINER, M. M.; SIMSEK, F. M.; CAGLAR, S. S. Insecticide resistance of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in Turkey. **Journal of Pesticide Science**, [s.l.], v. 34, n. 4, p.259-264, 2009.
- ALVES, Diana Carolina Barbosa da Silva. Síntese, avaliação da atividade larvicida e estudo de alvo biológico de protótipos moleculares contendo anéis do 1,2,4-oxadiazol e do isoxazol. 2011. 104 f. **Dissertação** (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.
- ALVES, Diana C. B. S. et al. Larvicidal isoxazoles: Synthesis and their effective susceptibility towards *Aedes aegypti* larvae. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 21, n. 4, p.940-947, fev. 2013.
- AMARASINGHE, Kande K. D. et al. One-pot synthesis of 1,2,4-oxadiazoles from carboxylic acid esters and amidoximes using potassium carbonate. **Tetrahedron Letters**, [s.l.], v. 47, n. 22, p.3629-3631, maio 2006.
- ANDERSEN, K. E. et al. Oxadiazoles as bioisosteric transformations of carboxylic functionalities. II. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 31, n. 5, p.417-425, jan. 1996.
- APONTE, H. Angélica et al. The pyrethroid resistance status and mechanisms in *Aedes aegypti* from the Guerrero state, Mexico. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s.l.], v. 107, n. 2, p.226-234, out. 2013.
- ATTAULLAH, Mohammad et al. Serum organochlorine pesticides residues and risk of cancer: A case-control study. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s.l.], v. 25, n. 7, p.1284-1290, nov. 2018.
- BARREIRO, E. J., Fraga, C. A. M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**, Porto Alegre, Artes Médicas, 2001.
- BARRET, A. D. T.; Hombach, J. Opportunities in the development of dengue vaccines. *Geneva: World Health Organization* 2006, 61-65.
- BRAGA, I. A.; Valle, D. Epidemiologia e Serviços Saúde. **Revista do Sistema Único de Saúde do Brasil**. [s.l.], v. 16, n. 4, p.279-293, out./dez. 2007.
- BRAGA, Vanildo Martins L. et al. Synthesis of new 1,2,4-oxadiazoles carrying (1'S,2'S)-t-butyloxycarbonyl-1-amino-2-methyl-1-butyl and (1'S)-t-butyloxycarbonyl-1'-amino-1'-ethyl groups at C-5. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 15, n. 4, p.603-607, ago. 2004.

- BAYKOV, Sergey et al. The first one-pot ambient-temperature synthesis of 1,2,4-oxadiazoles from amidoximes and carboxylic acid esters. **Tetrahedron**, [s.l.], v. 73, n. 7, p.945-951, fev. 2017.
- CALISHER, C. H. et al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. **Journal of General Virology**. [s.1], v. 70, p.37-43. out. 1989.
- CLARK, B. M. et al. Dengue virus infection in Australia following occupational exposure: a reflection of increasing numbers of imported cases. *J. Clin. Virol.* [s.1], v. 54, n. 4, p.376-377, 2012.
- CHO, Hyong Jin et al. Sleep disturbance and kynurenine metabolism in depression. **Journal of Psychosomatic Research**, [s.l.], v. 99, p.1-7, ago. 2017.
- CHEN, Y.; Guillemin, G. J. Kynurenine Pathway Metabolites in Humans: Disease and Healthy States. **International Journal Tryptophan Research**. [s.1] v. 2, n. 1, p.1-19. jan. 2009.
- CICCHI, Stefano; CORDERO, Franca M.; GIOMI, Donatella. Five-Membered Ring Systems with O and N Atoms. **Progress in Heterocyclic Chemistry**, [s.l.], p.303-327, 2011.
- CLAPP, L. B. In *Advances in Heterocyclic Chemistry*. **Academic Press**, v. 20, p. 65-116. 1976.
- DU, Wu; HAGMANN, William K.; HALE, Jeffrey J.. A 'one-pot' synthesis of  $\alpha$ -1,2,4-oxadiazolo esters from malonic diesters and amidoximes under solvent-free conditions. **Tetrahedron Letters**, [s.l.], v. 47, n. 25, p.4271-4274, jun. 2006.
- DU, Wu 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**, [s.l.], v. 48, n. 13, p. 2231-2235, mar. 2007.
- DHOUB, I. B et al. Carbamates pesticides induced immunotoxicity and carcinogenicity in human: A review. **Journal of Applied Biomedicine**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.85-90, abr. 2016.
- ECOBICHON, D. J., Carbamic acid ester insecticides, in: D.J. Ecobichon, R.M. Joy (Eds.), *Pesticides and Neurological Diseases*. **CRC Press**, [s.1], v. 2, p. 251-289, 1994.
- FRITEL, X. et al. Chikungunya virus infection during pregnancy, Reunion, France, 2006. **Emerg. Infect. Dis**, v. 16, p. 418-425, mar. 2010.
- GANGLOFF, Anthony R et al. Synthesis of 3,5-disubstituted-1,2,4-oxadiazoles using tetrabutylammonium fluoride as a mild and efficient catalyst. **Tetrahedron Letters**, [s.l.], v. 42, n. 8, p.1441-1443, fev. 2001.
- GÉRARDIN, P. et al. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Reunion. **PLoS Medicine**[s.1], v. 5, n. 3, 2008.
- GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global health problem. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed.) *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York: CAB International, p.1-22, 1997.
- GOBEC, Martina et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of 1,2,4-oxadiazole analogs of resveratrol. **Chemico-biological Interactions**, [s.l.], v. 240, p.200-207, out. 2015.
- GULAJ, E. et al. Kynurenine and its metabolites in Alzheimer's disease patients. **Advances in Medical Sciences**, [s.l.], v. 55, n. 2, p.204-211, 2010.

- GUIDETTI, Paolo et al. Elevated brain 3-hydroxykynurenine and quinolinate levels in Huntington disease mice. **Neurobiology of Disease**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.190-197, jul. 2006.
- HADDOW, A. D. et al. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. [s.l.], v. 6, 2012.
- Han, Q. Li, J. Comparative characterization of Aedes 3-hydroxykynurenine transaminase/alanine glyoxylate transaminase and Drosophila serine pyruvate aminotransferase. **FEBS Letters** [s.l.], v. 527, n. 1–3, p. 199–204. 2002.
- HAN, Qian et al. Crystal Structures of Aedes aegypti Alanine Glyoxylate Aminotransferase. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 281, n. 48, p.37175-37182, 21 set. 2006. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB).
- HAN, Qian et al. Crystal Structures of Aedes aegypti Alanine Glyoxylate Aminotransferase. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 281, n. 48, p.37175-37182, 21 set. 2006.
- HAN, Qian et al. Evolution of two alanine glyoxylate aminotransferases in mosquito. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 397, n. 3, p.473-481, 1 ago. 2006.
- HAN, Qian; BEERNTSEN, Brenda T.; LI, Jianyong. The tryptophan oxidation pathway in mosquitoes with emphasis on xanthurenic acid biosynthesis. **Journal of Insect Physiology**, [s.l.], v. 53, n. 3, p.254-263, mar. 2007.
- HAN, Liuquan et al. An environmentally benign synthesis of isoxazolines and isoxazoles mediated by potassium chloride in water. **Tetrahedron Letters**, [s.l.], v. 55, n. 14, p.2308-2311, abr. 2014.
- HAZARI, Nandita; BHAD, Roshan. Kynurenine pathway (KP) inhibitors: Novel agents for the management of depression. **Journal of Psychopharmacology**, [s.l.], v. 29, n. 10, p.1133-1134, 7 ago. 2015.
- HEINZ, Franz X.; STIASNY, Karin. Flaviviruses and flavivirus vaccines. **Vaccine**, [s.l.], v. 30, n. 29, p.4301-4306, jun. 2012.
- HIGUERA, Adriana; RAMÍREZ, Juan David. Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An update. **Acta Tropical**, [s.l.], v. 190, p.99-111, fev. 2019.
- JANARDHANAN, Jeshina; CHANG, Mayland; MOBASHERY, Shahriar. The oxadiazole antibacterials. **Current Opinion in Microbiology**, [s.l.], v. 33, p.13-17, out. 2016.
- KANDRE, Shivaji et al. Microwave assisted synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles from substituted amidoximes and benzoyl cyanides. **Tetrahedron Letters**, [s.l.], v. 54, n. 27, p.3526-3529, jul. 2013.
- KIM, Ju Hyeon et al. Identification and interaction of multiple genes resulting in DDT resistance in the 91-R strain of Drosophila melanogaster by RNAi approaches. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s.l.], v. 151, p.90-99, out. 2018.
- KING, Andrew M.; AARON, Cynthia K. Organophosphate and Carbamate Poisoning. **Emergency Medicine Clinics of North America**, [s.l.], v. 33, n. 1, p.133-151, fev. 2015.
- KISHK, Abdelaziz et al. RNA interference of acetylcholinesterase in the Asian citrus psyllid, Diaphorinacitri, increases its susceptibility to carbamate and organophosphate insecticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s.l.], v. 143, p.81-89, nov. 2017.

- KRAEMER, M. U., et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **eLife**, [s.l.], v. 4, p.1-18, 30 jun. 2015.
- LADE, Jatin J. et al. Oxidative cyclization of amidoximes and thiohydroxamic acids: A facile and efficient strategy for accessing 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles and 1,4,2-oxathiazoles. **Tetrahedron Letters**, [s.l.], v. 58, n. 22, p.2103-2108, mai 2017.
- LEITE, Ana Cristina et al. Synthesis, anti-inflammatory and antimicrobial activities of new 1,2,4-oxadiazoles peptidomimetics. **Il Farmaco**, [s.l.], v. 55, n. 11-12, p.719-724, dez. 2000.
- LI, Jianyong; LI, Guoyu. Transamination of 3-hydroxykynurenine to produce xanthurenic acid: a major branch pathway of tryptophan metabolism in the mosquito, *Aedes aegypti*, during larval development. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [s.l.], v. 27, n. 10, p.859-867, out. 1997.
- LI, J. Oxidation of 3-hydroxykynurenine to produce xanthommatin for eye pigmentation: a major branch pathway of tryptophan catabolism during pupal development in the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [s.l.], v. 29, n. 4, p.329-338, abr. 1999.
- LIM, Chai K. et al. Involvement of the kynurenine pathway in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, [s.l.], v. 155, p.76-95, ago. 2017.
- LUND, A. E., NARAHASHI, T. Kinetics of sodium channel modification by the insecticide tetramethrin in squid axon membranes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** [s.l.], v. 219, p.464-473. 1981.
- LUND, A. E., NARAHASHI, T. Modification of sodium channel kinetics by the insecticide tetramethrin in crayfish giant axons. **Neurotoxicology**. [s.l.], v. 2, p. 213-229, 1981.
- MACIEL, Larissa Gonçalves. **3-hidróxi-quinurenina transaminase de *Aedes aegypti*: clonagem, expressão, avaliação funcional e síntese de prováveis inibidores seletivos**. 2016. 85 f. **Dissertação** (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.
- MACIEL, Larissa G. et al. Evidence for the role of 3-hydroxykynurenine transaminase from *Aedes aegypti* as a molecular target for selective inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, artigo no prelo, 2019.
- MAFTEI, Catalin V. et al. Novel 1,2,4-oxadiazoles and trifluoromethylpyridines related to natural products: synthesis, structural analysis and investigation of their antitumor activity. **Tetrahedron**, [s.l.], v. 72, n. 9, p.1185-1199, mar. 2016.
- MEIRA, R. "Urucubaca" gripe ou dengue? Dengue. In: \_\_\_\_\_. *Clínica médica*. São Paulo: Gráfica **O Estado de São Paulo**, 1916. p.273-85.
- MELO, Sebastião J. de et al. Synthesis of Some 3-Aryl-1,2,4-oxadiazoles Carrying a Protected L-Alanine Side Chain. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 9, n. 5, p.465-468, set. 1998.
- MELONI, Giorgio et al. Combined larvicidal and adulticidal treatments to control *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae): Results of a pilot study. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 257, p.28-33, jun. 2018.
- MUSSO, Didier; GUBLER, Duane J. Zika Virus. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 29, n. 3, p.487-524, 30 mar. 2016.

MYINT, A. M. et al. Reversal of imbalance between kynurenic acid and 3-hydroxykynurenine by antipsychotics in medication-naïve and medication-free schizophrenic patients. **Brain, Behavior, And Immunity**, [s.l.], v. 25, n. 8, p.1576-1581, nov. 2011.

NASCIMENTO, Cecília Pimenteira Melo do. **A Enzima 3-Hidróxi-quinurenina Transaminase como Alvo para Compostos Larvicidas: Caracterização do alvo molecular de compostos 1,2,4-oxadiazólicos contra proteína de Aedes aegypti e Anopheles gambiae**. 2010. 51 f. Monografia - Curso de Ciências Biológicas, Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

NEVES FILHO, R. A. W. et al. Improved Microwave-Mediated Synthesis of 3-(3-Aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propionic Acids and Their Larvicidal and Fungal Growth Inhibitory Properties. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. [s.l.], v. 57, p.819, ago. 2009.

NEVES FILHO, R. A. W.; Srivastava, R. M.; Navarro, D. M. A. F. Brazil Patent, 2008.

NEWTON, Ian. OBSOLETE: Organochlorine Pesticides, Rachel Carson, and the Environmental Movement. **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences**, [s.l.], p.97-104, 2018.

NUNES M. R. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**. [s.l.], v.13, p.102. abr. 2015.

OLIVEIRA, Vanessa S. et al. The enzyme 3-hydroxykynurenine transaminase as potential target for 1,2,4-oxadiazoles with larvicide activity against the dengue vector Aedes aegypti. **Bioorganic& Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 21, n. 22, p.6996-7003, nov. 2013.

OSTER, A. M., 2016. Interim guidelines for prevention of sexual transmission of Zika virus — United States, 2016. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.** v.65, n. 5, fev. 2016.

PEDRO, A. O dengue em Nictheroy. **Brazil-Médico**, v.1, n.13, p.173-7, 1923.

PHILLIPS, Robert S. Structure, mechanism, and substrate specificity of kynureninase. **Biochimica et Biophysica Acta (bba) - Proteins And Proteomics**, [s.l.], v. 1814, n. 11, p.1481-1488, nov. 2011.

ROSSI, Franca et al. Identification and biochemical characterization of the Anopheles gambiae 3-hydroxykynurenine transaminase. **Febs Journal**, [s.l.], v. 272, n. 21, p.5653-5662, nov. 2005.

ROSSI, F. et al. Crystal structure of the Anopheles gambiae 3-hydroxykynurenine transaminase. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 103, n. 15, p.5711-5716, 3 abr. 2006.

ROSSINI, G, LANDINI, M. P., SAMBRI, V. Chikungunya Virus: Methods and Protocols. **Methods in Molecular Biology. Evolution and Epidemiology of Chikungunya Virus. Springer Protocols**. v.1426, 2016.

ROSTAMIZADEH, Shahnaz et al. Clean one-pot synthesis of 1,2,4-oxadiazoles under solvent-free conditions using microwave irradiation and potassium fluoride as catalyst and solid support. **Tetrahedron**, [s.l.], v. 66, n. 2, p.494-497, jan. 2010.

SANCHES, S. M., SILVA, C. H. T. P., CAMPOS, S. X., VIEIRA, E. M. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação de água. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, [s.l.], v. 13, p.53-58, 2003.

SANTALADCHAIYAKIT, Yanawath; SRIJARANAI, Supalax; BURAKHAM, Rodjana. Methodological aspects of sample preparation for the determination of carbamate residues: A review. **Journal of Separation Science**, [s.l.], v. 35, n. 18, p.2373-2389, set. 2012.

SRIVASTAVA, RajendraMohan; VIANA, Maria Benedita de Assunção Borges; BIEBER, Lothar. Synthesis of 3-[(aryl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-propionic acids. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, [s.l.], v. 21, n. 4, p.1193-1195, jul. 1984.

SCHWARCZ, R. The kynurenine pathway of tryptophan degradation as a drug target. **Current Opinion in Pharmacology**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.12-17, fev. 2004.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, **Ministério da Saúde**. 2016. Boletim Epidemiológico - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49, 2016.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, **Ministério da Saúde**. 2018. Boletim Epidemiológico - Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionados à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 45 de 2018.

SHARONOVA, Tatyana et al. Facile room-temperature assembly of the 1,2,4-oxadiazole core from readily available amidoximes and carboxylic acids. **Tetrahedron Letters**, [s.l.], v. 59, n. 29, p.2824-2827, jul. 2018.

STONE, Trevor W. Inhibitors of the kynurenine pathway. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 35, n. 2, p.179-186, fev. 2000.

TAMBYAH, Paul A. et al. Dengue Hemorrhagic Fever Transmitted by Blood Transfusion. **New England Journal of Medicine**, [s.l.], v. 359, n. 14, p.1526-1527, 2 out. 2008.

TAN, F. L., LOH, D. L. S. K., PRABHAKARAN, K. Dengue haemorrhagic fever after living donor renal transplantation. **Nephrology Dialysis Transplantation**, [s.l.], v. 20, n. 2, p.447-448, 26 jan. 2005.

TAN, Peng Chiong et al. Dengue Infection in Pregnancy. **Obstetrics & Gynecology**, [s.l.], v. 111, n. 5, p.1111-1117, maio 2008.

TIEMANN, Ferd.; KRÜGER, Paul. Ueber Amidoxime und Azoxime. **Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, [s.l.], v. 17, n. 2, p.1685-1698, jul. 1884.

TOMASHEK, Kay M.; MARGOLIS, Harold S. Dengue: a potential transfusion-transmitted disease. **Transfusion**, [s.l.], v. 51, n. 8, p.1654-1660, ago. 2011.

NARAHASHI, Toshio. Nerve membrane as a target of pyrethroids. **Pesticide Science**, [s.l.], v. 7, n. 3, p.267-272, jun. 1976.

TOWNSON, H. The biology of mosquitoes. Volume 1. Development, nutrition and reproduction. By A.N. Clements. (London: Chapman & Hall, 1992). viii + 509 pp. Hard cover £50. ISBN 0-412-40180-0. **Bulletin of Entomological Research**, [s.l.], v. 83, n. 2, p.307-308, jun. 1993.

VITALE, P.; SCILIMATI, A. Recent Developments in the Chemistry of 3-Arylisoxazoles and 3-Aryl-2-isoxazolines. **Advances in Heterocyclic Chemistry**, [s.l.], p.1-41, 2017.

VIDHYANANDHINI, R; KUMAR, N Pradeep. Characterization of the 3-HKT gene in important malaria vectors in India, viz: Anopheles culicifacies and Anopheles stephensi Diptera. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 103, n. 6, p.595-597, set. 2008.

WAGNER, Dirk et al. Nosocomial Acquisition of Dengue. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 10, n. 10, p.1872-1873, out. 2004.

WEBSTER, Daniel P., FARRAR, Jeremy, ROWLAND-JONES, Sarah. Progress towards a dengue vaccine. **The Lancet Infectious Diseases**, [s.l.], v. 9, n. 11, p.678-687, nov. 2009.

WERNER, I.; YOUNG, T. M. Pyrethroid Insecticides — Exposure and Impacts in the Aquatic Environment. **Encyclopedia of The Anthropocene**, [s.l.], p.119-126, 2018.

WHITEHEAD, Stephen S. et al. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 7, p.518-528, jul. 2007.

WILDER-SMITH, Annelies et al. Dengue. **The Lancet**, [s.l.], v. 393, n. 10169, p.350-363, jan. 2019.

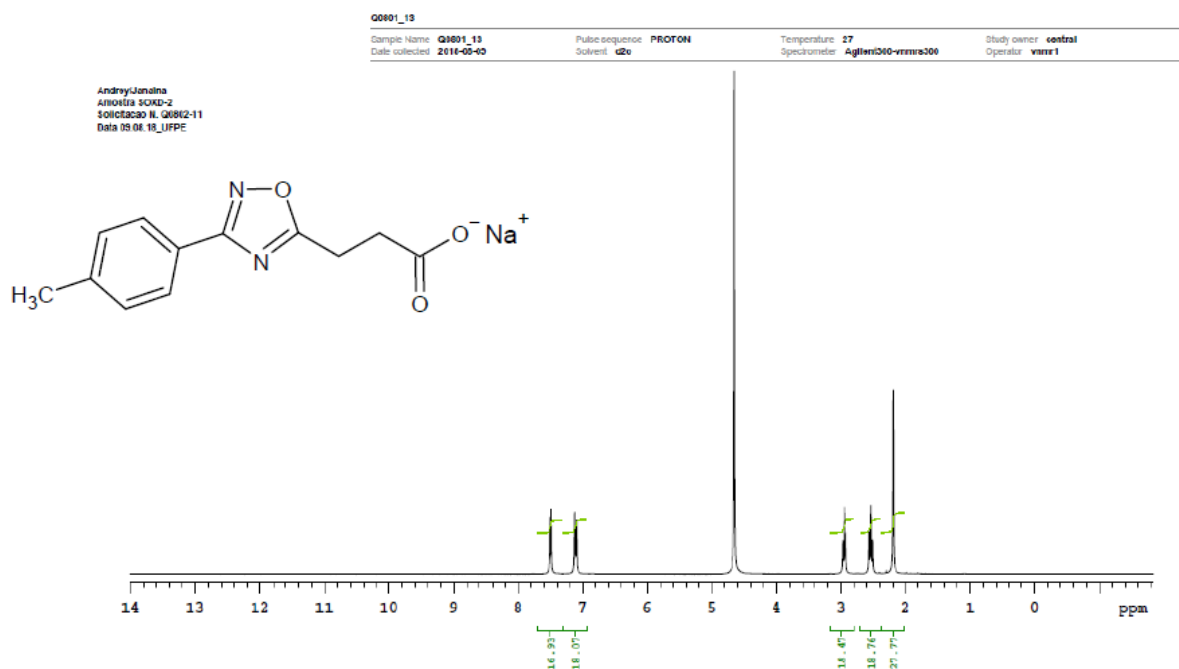
WU, Yujie et al. Kynurenine pathway changes in late-life depression. **Journal of Affective Disorders**, [s.l.], v. 235, p.76-81, ago. 2018.

YANG, Feifei et al. Development of hydroxamate-based histone deacetylase inhibitors containing 1,2,4-oxadiazole moiety core with antitumor activities. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.15-21, jan. 2019.

ZHANG, Han-zhong et al. Discovery and Structure – Activity Relationship of 3-Aryl-5-aryl-1,2,4-oxadiazoles as a New Series of Apoptosis Inducers and Potential Anticancer Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 48, n. 16, p.5215-5223, ago. 2005.

## APÊNDICE A

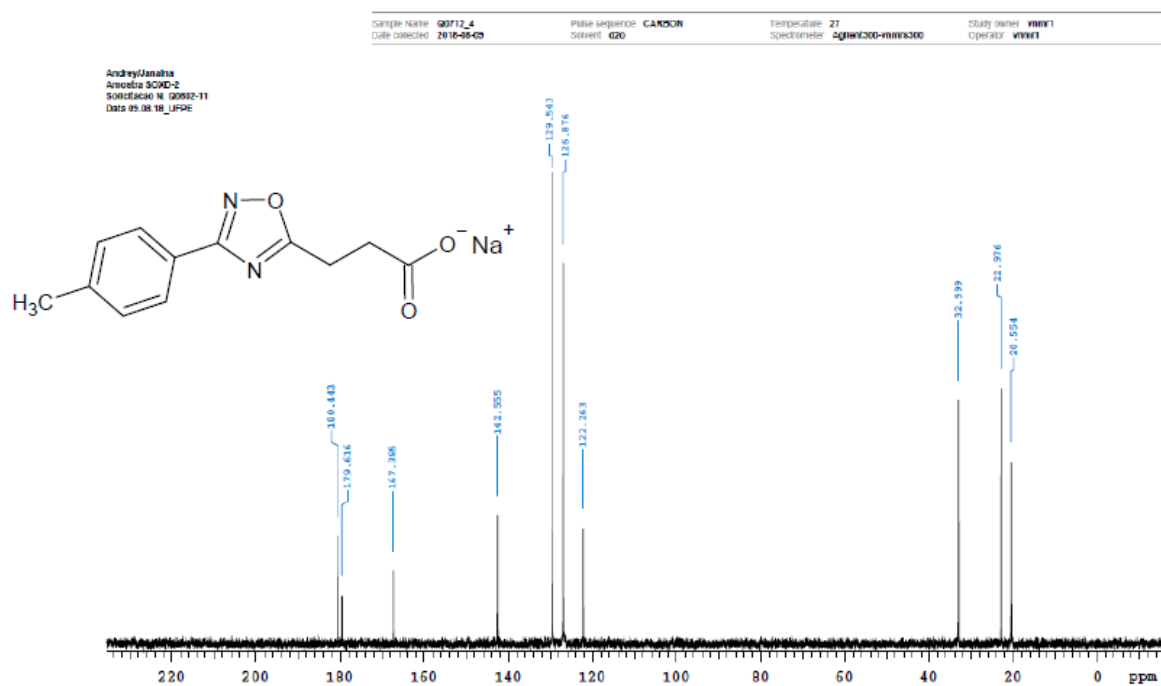
Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(4-Metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2b.





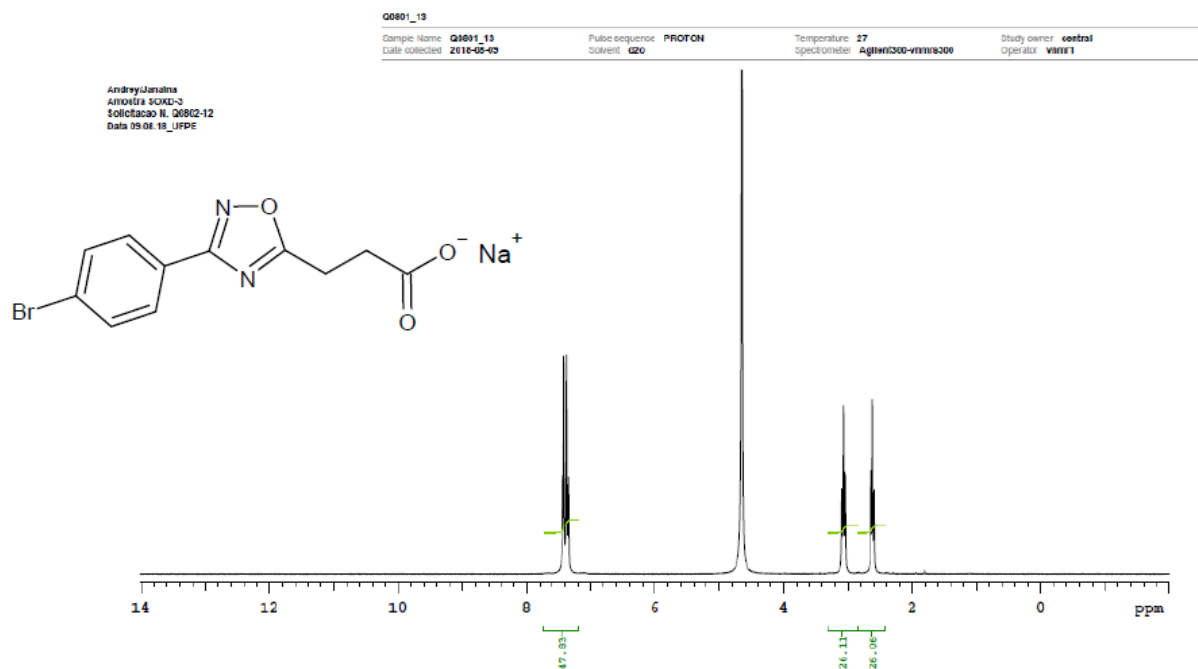
## APÊNDICE B

Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(4-Metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2b.



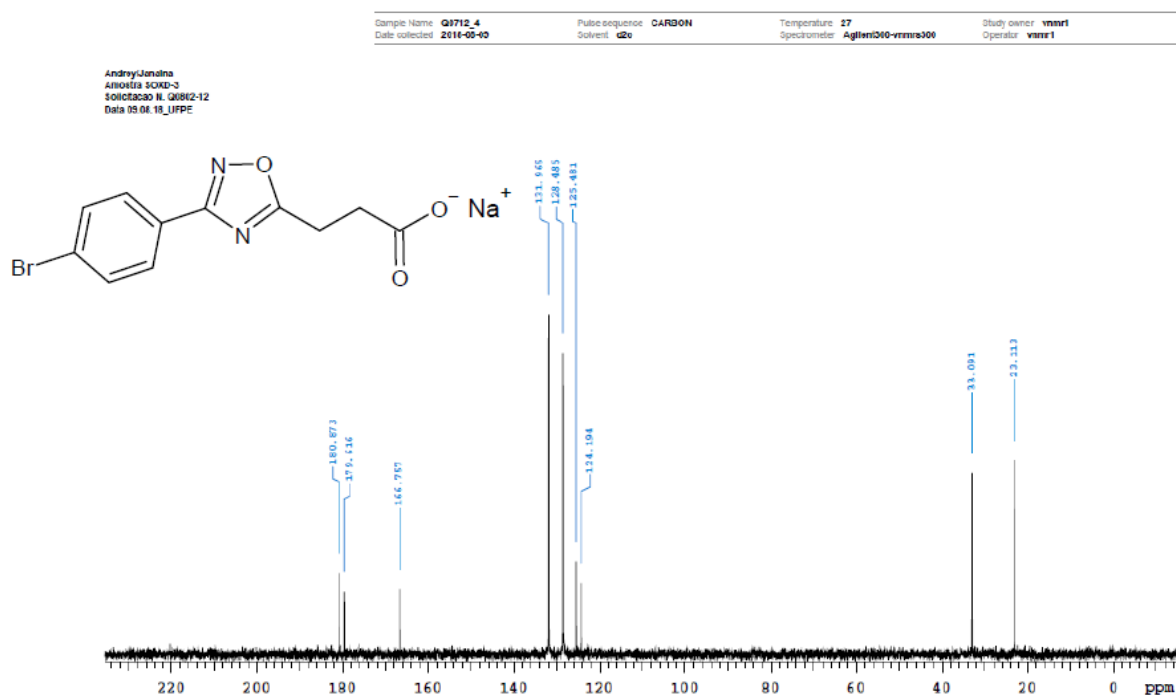
## APÊNDICE C

Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(4-Bromofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2c.



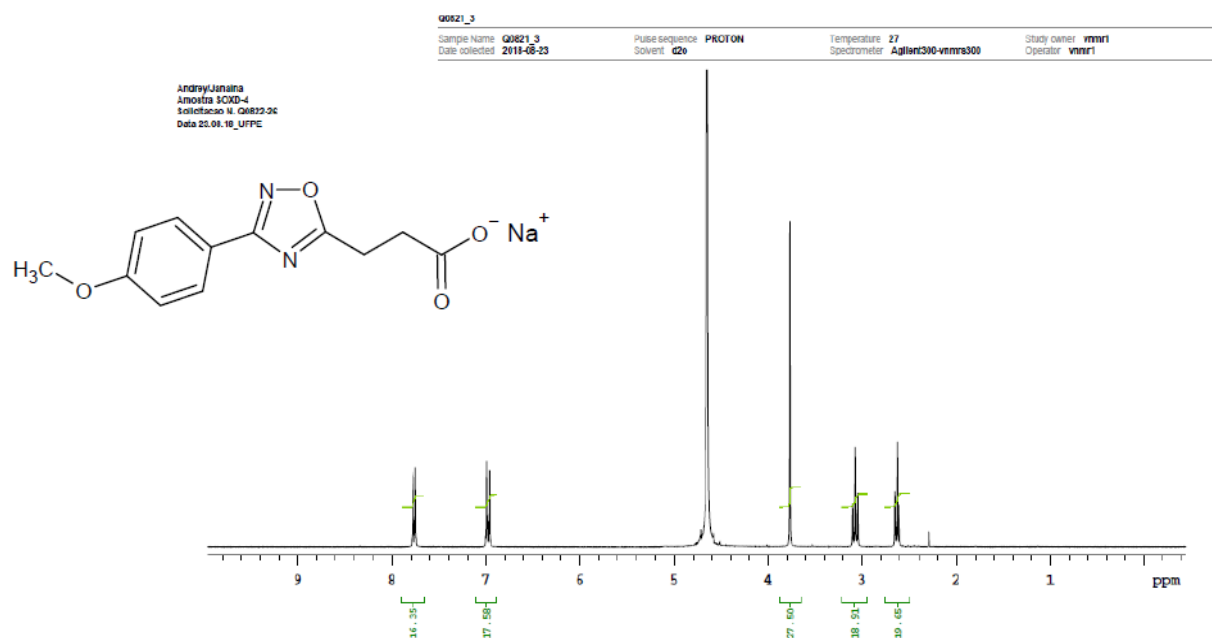
## APÊNDICE D

Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(4-Bromofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2c.



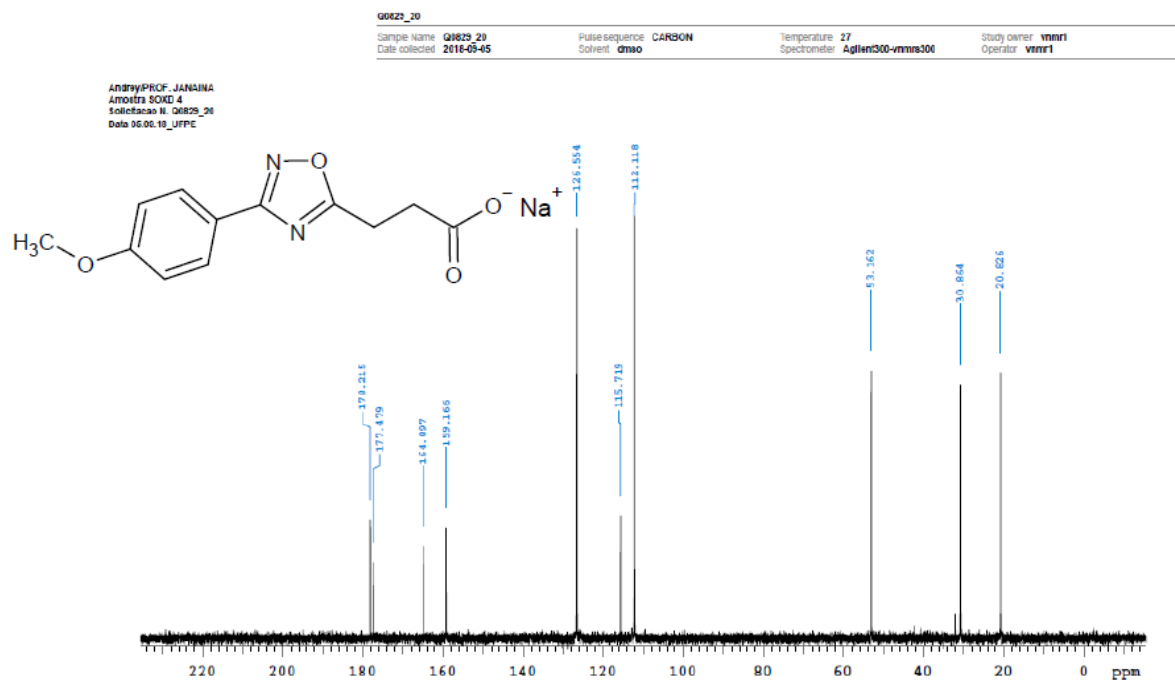
## APÊNDICE E

Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(4-Metóxfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2d.



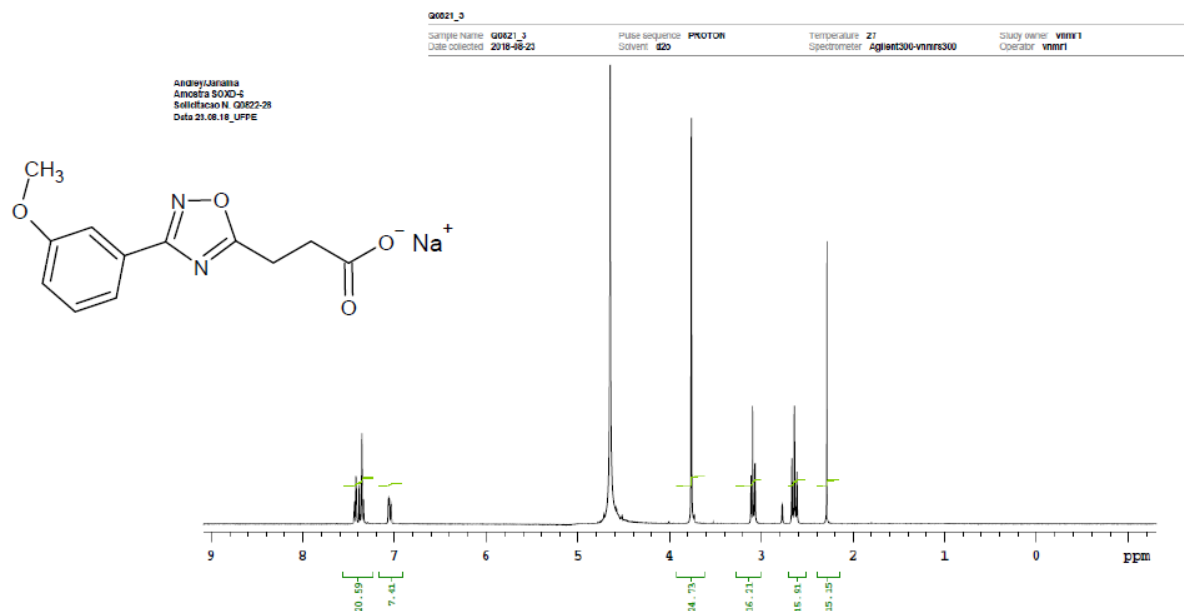
## APÊNDICE F

Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(4-Metóxfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2d.



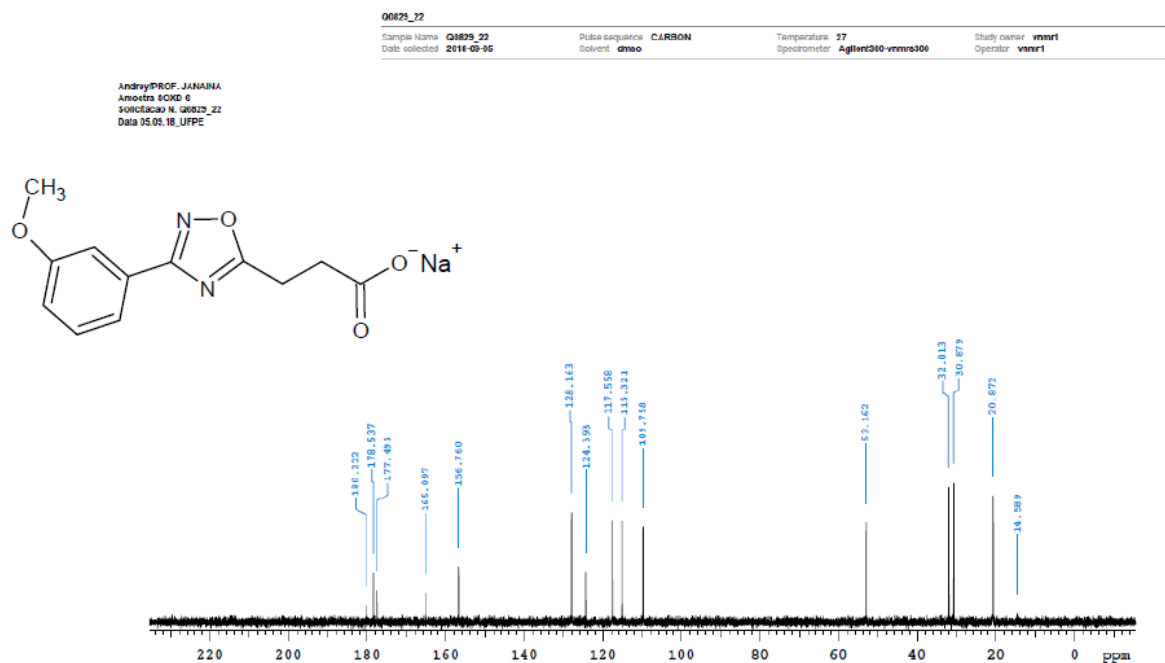
## APÊNDICE G

Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(3-Metóxfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2f.



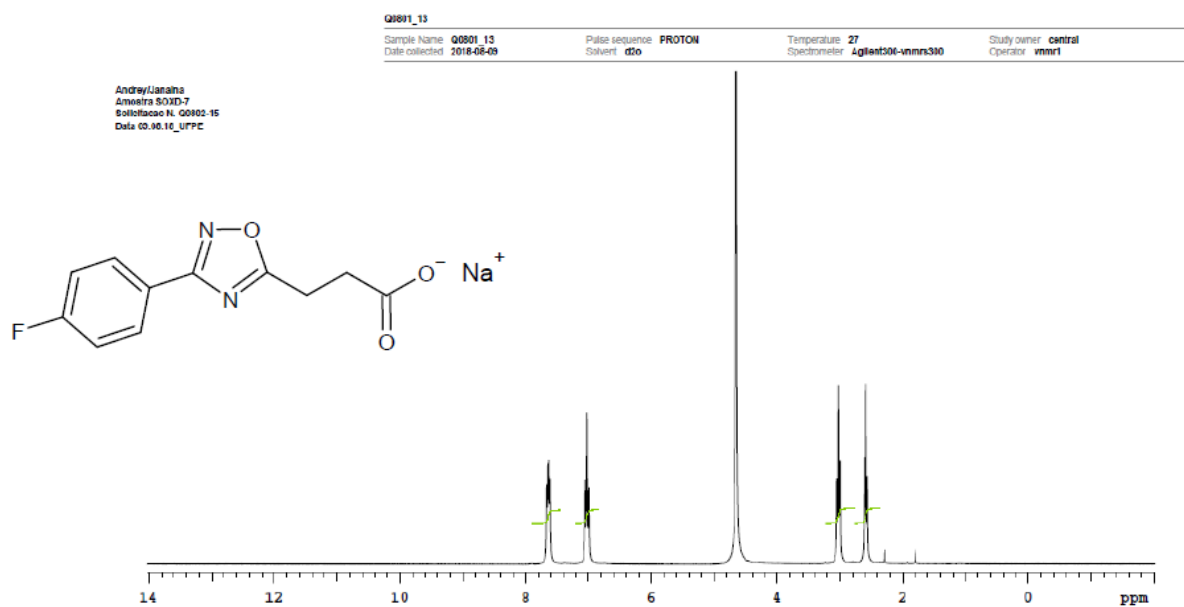
## APÊNDICE H

Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(3-Metóxfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2f.



## APÊNDICE I

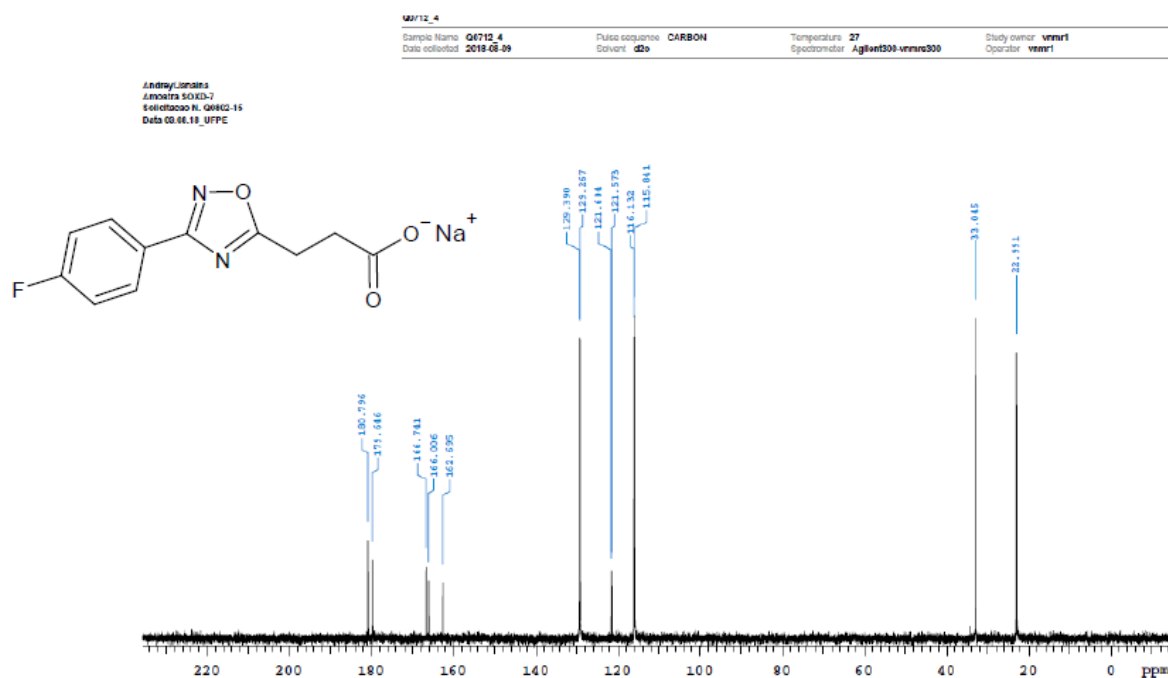
Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(4-Fluorfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2g.





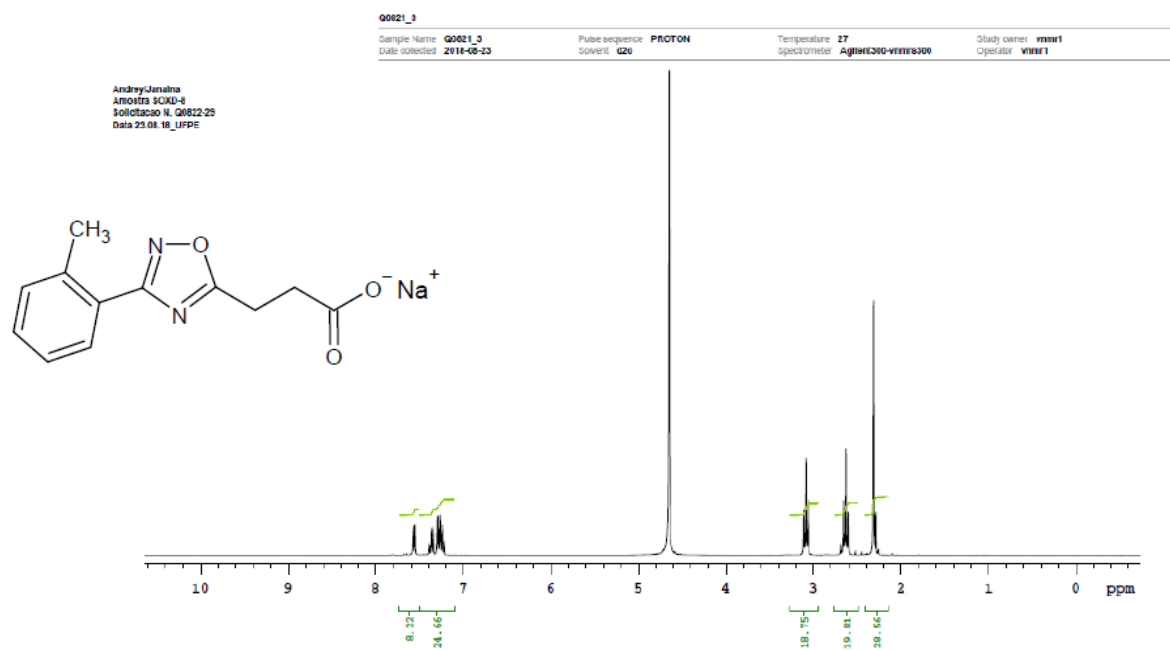
## APÊNDICE J

Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(4-Fluorfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2g.



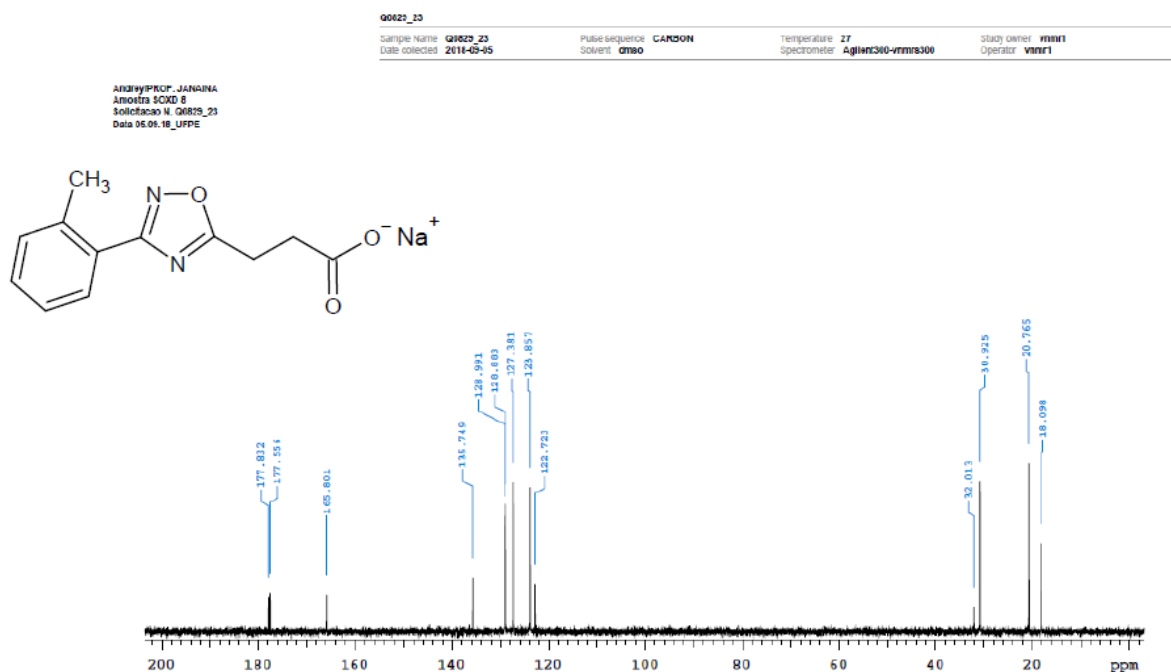
## APÊNDICE L

Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(2-Metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2h.



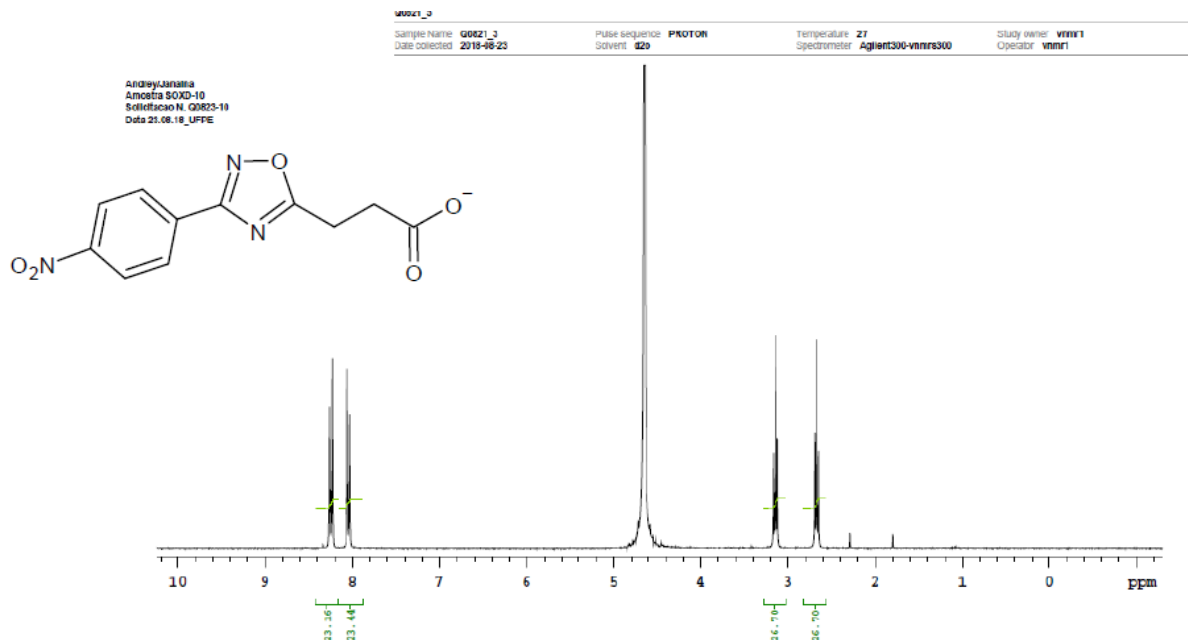
## APÊNDICE K

Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(2-Metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2h.



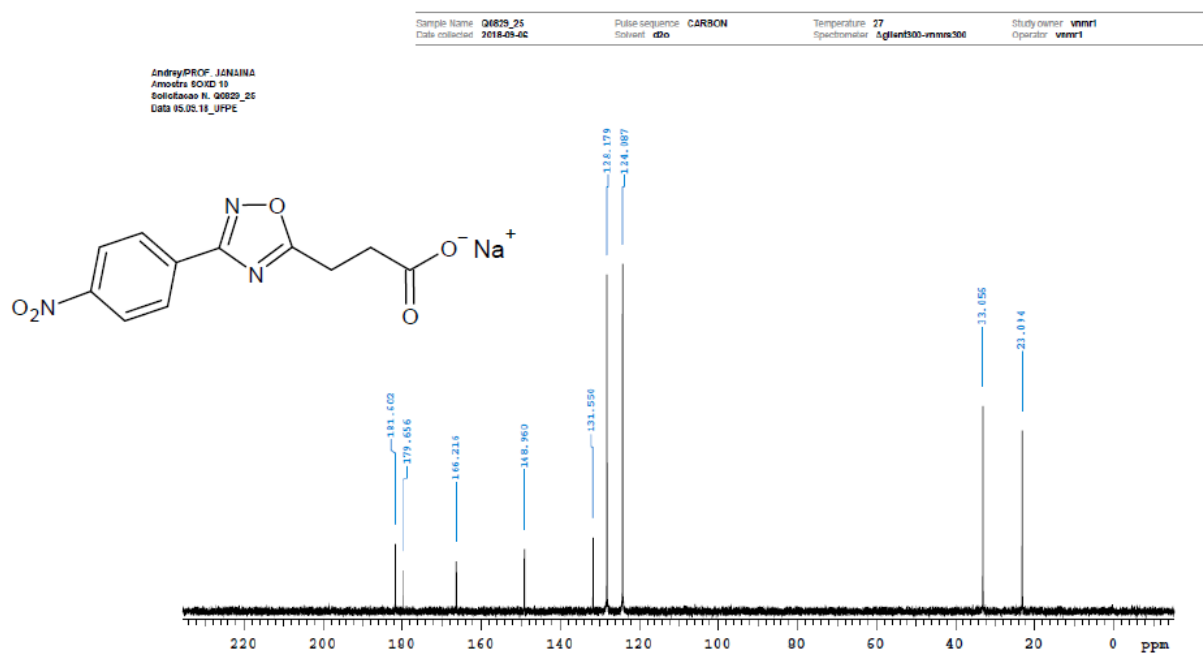
## APÊNDICE M

Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(4-Nitrofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2j.



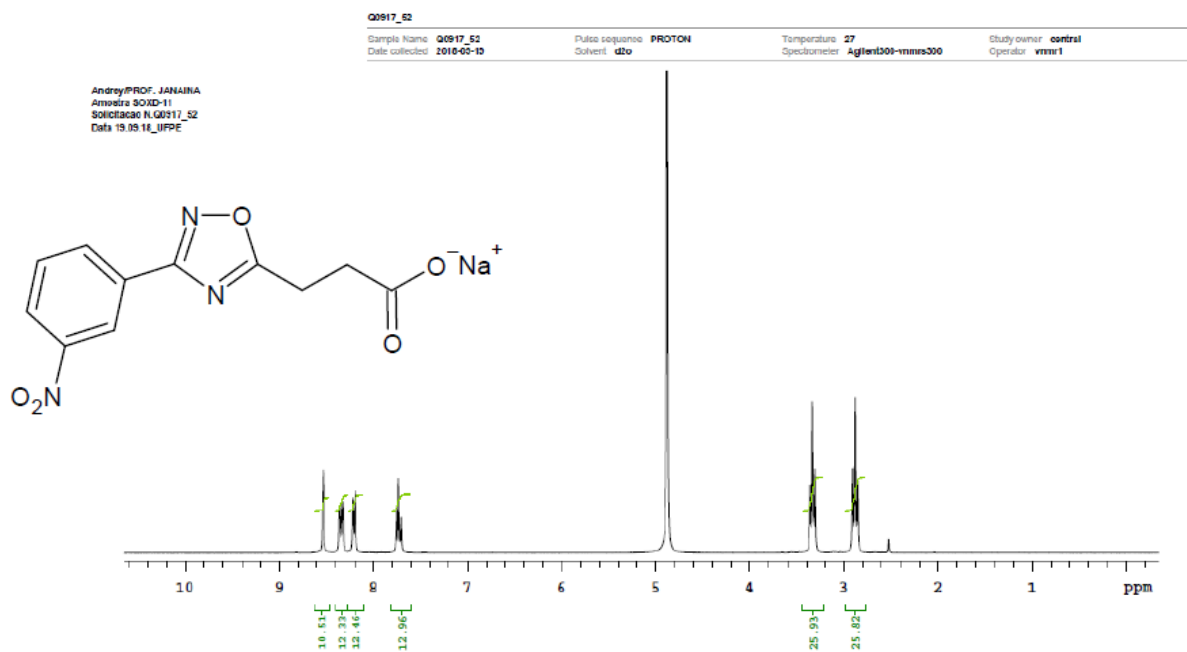
## APÊNDICE N

Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(4-Nitrofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2j.



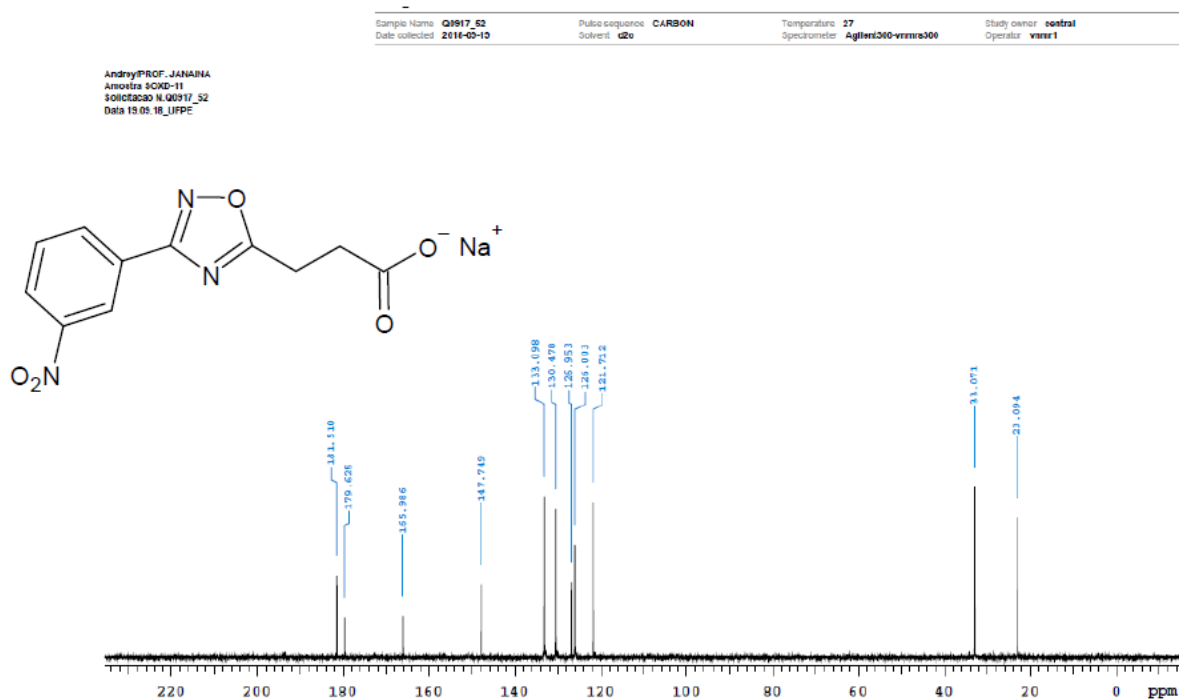
## APÊNDICE O

Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(3-Nitrofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2k.



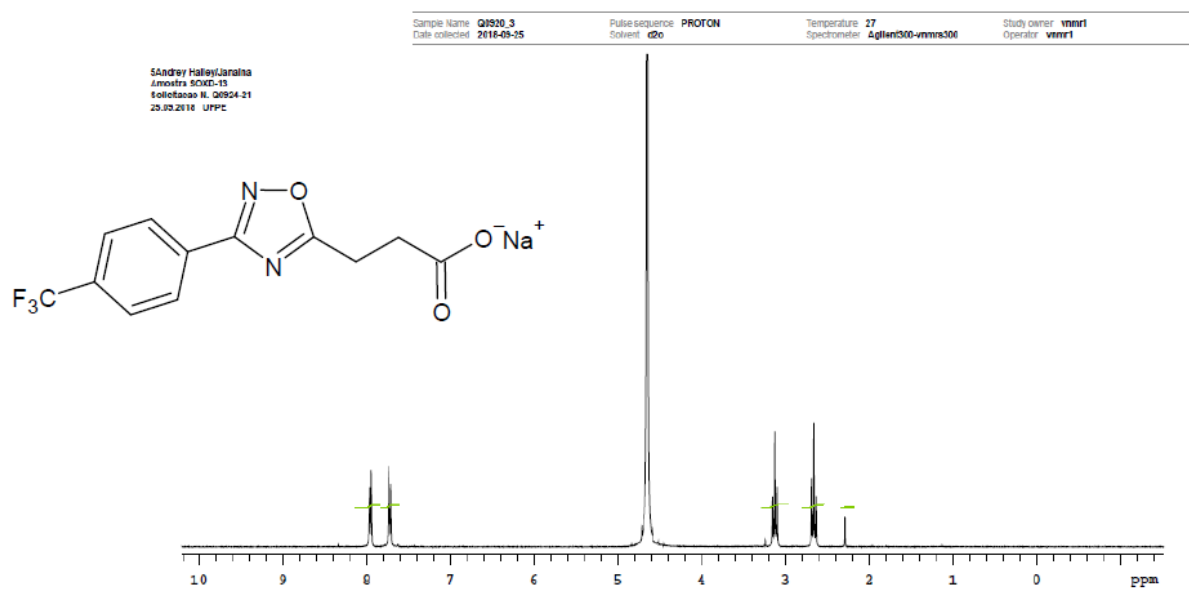
## APÊNDICE P

Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(3-Nitrofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2k.



## APÊNDICE Q

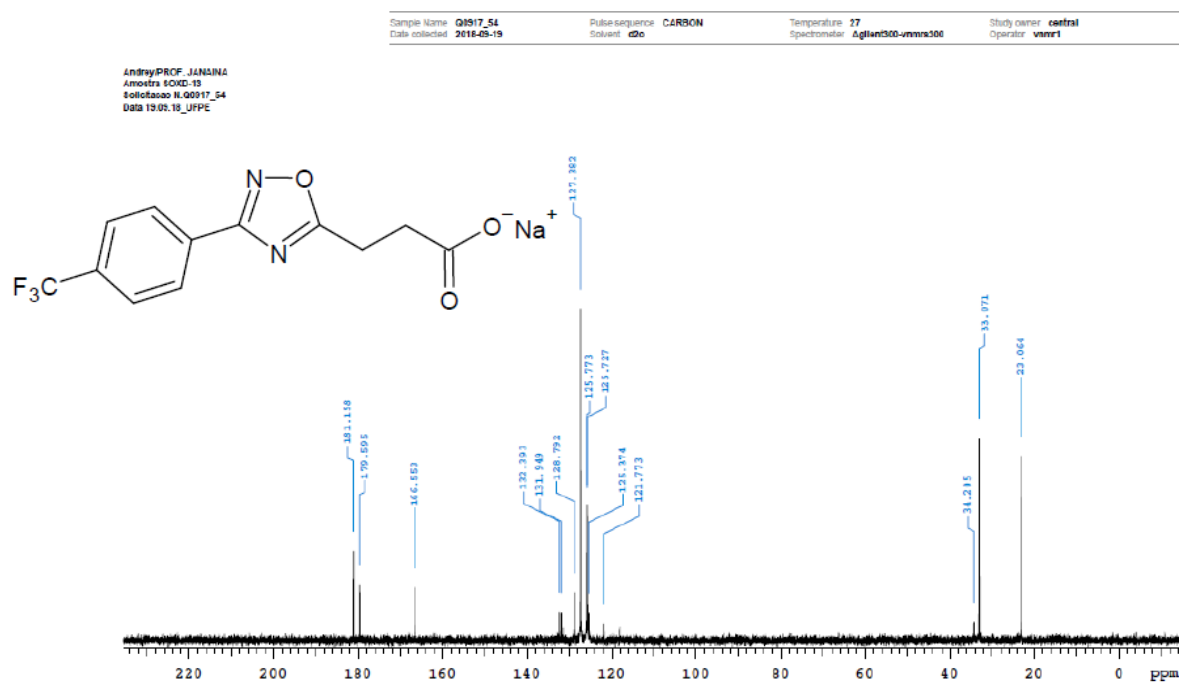
Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(4-Trifluorometilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2l.





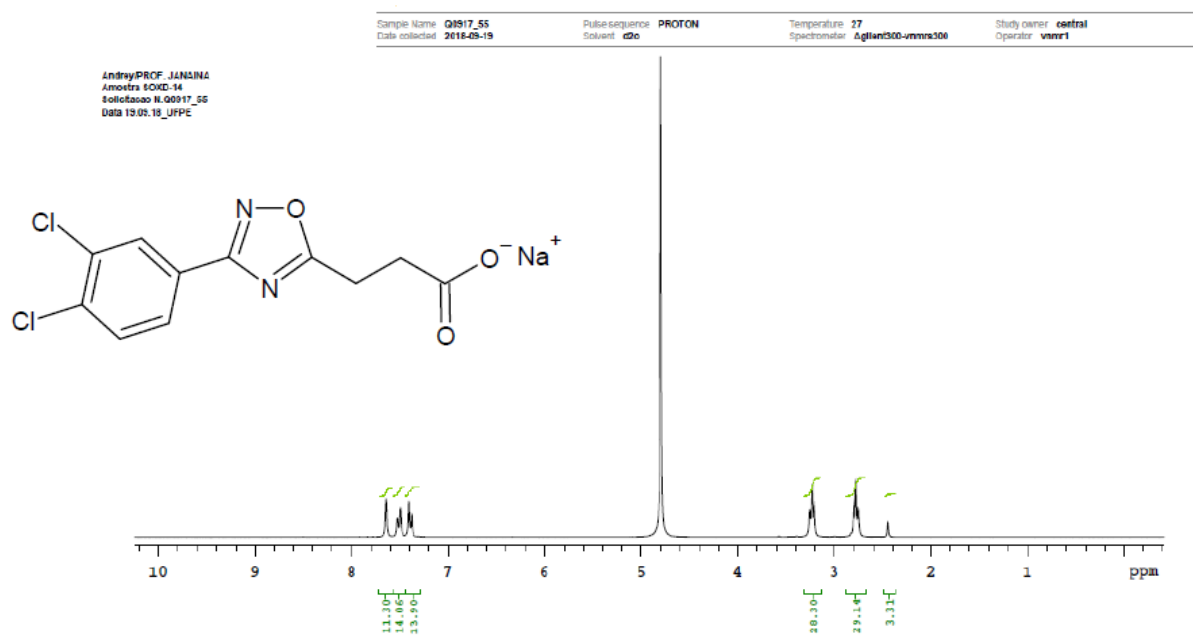
## APÊNDICE R

Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(4-Trifluorometilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2l.



## APÊNDICE S

Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(3,4-Diclorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2m.

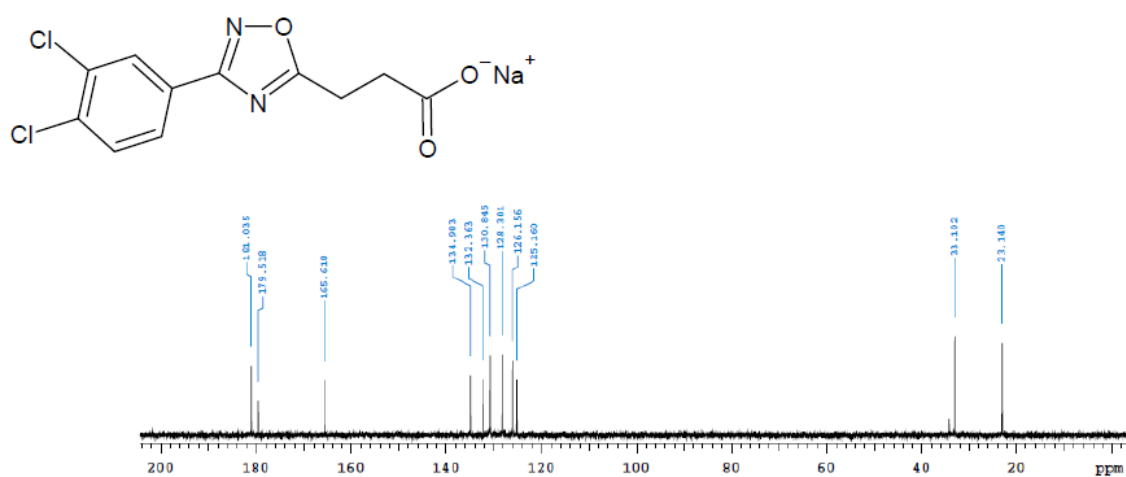


## APÊNDICE T

Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(3,4-Diclorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2m.

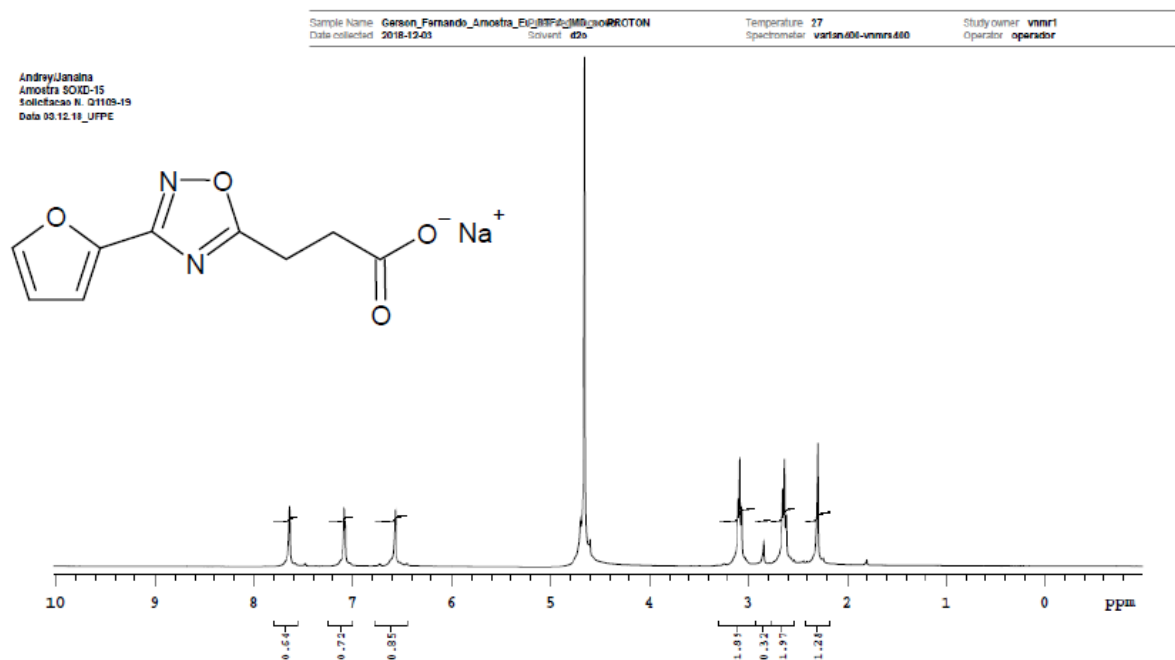
Sample Name	G0917_55	Pulse sequence	CARBON	Temperature	27	Study owner	central
Date collected	2018-05-15	Solvent	d2o	Spectrometer	Agilent300-nmr300	Operator	vinh

ABD91PROP, JANAIA  
Amorfa SOD-14  
Solução em  $\text{D}_2\text{O}$  G0917\_55  
Data 19.09.18\_UFPE



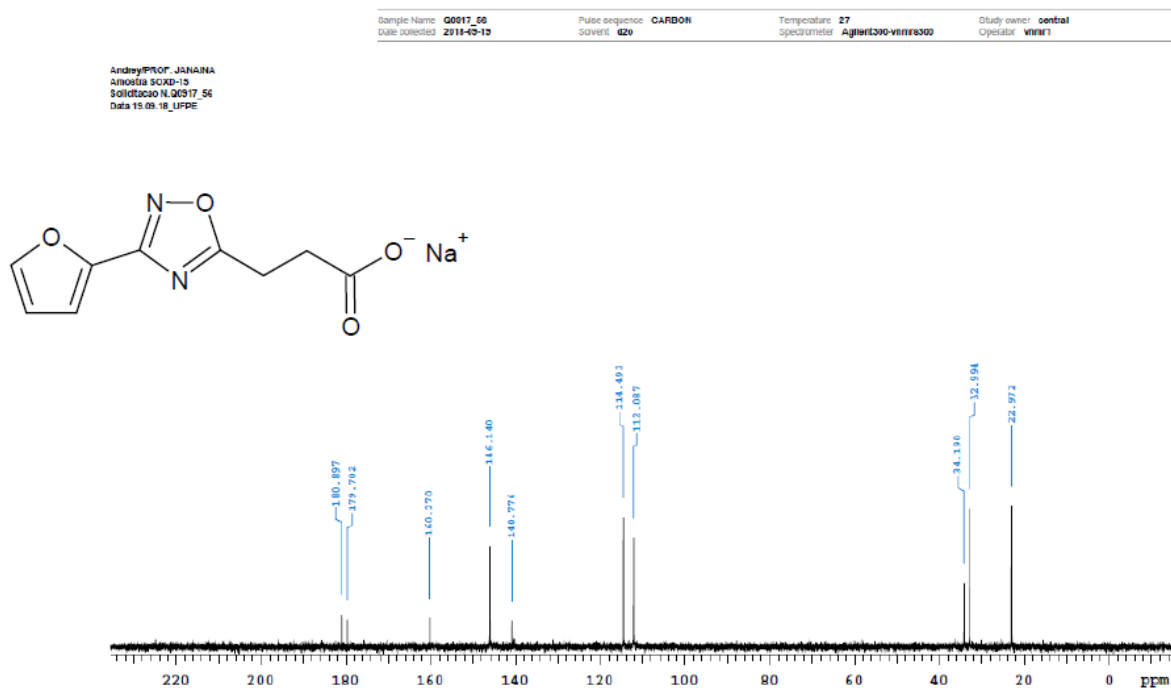
## APÊNDICE U

Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(2-Furil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2n.



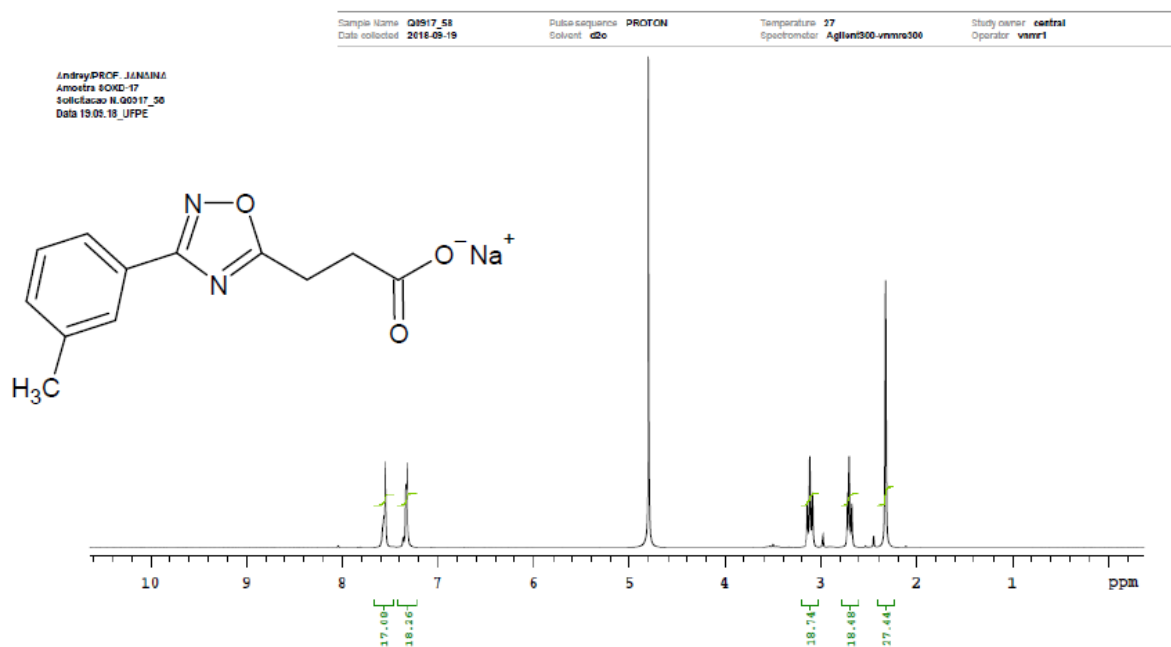
## APÊNDICE V

Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(2-Tiofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2n.



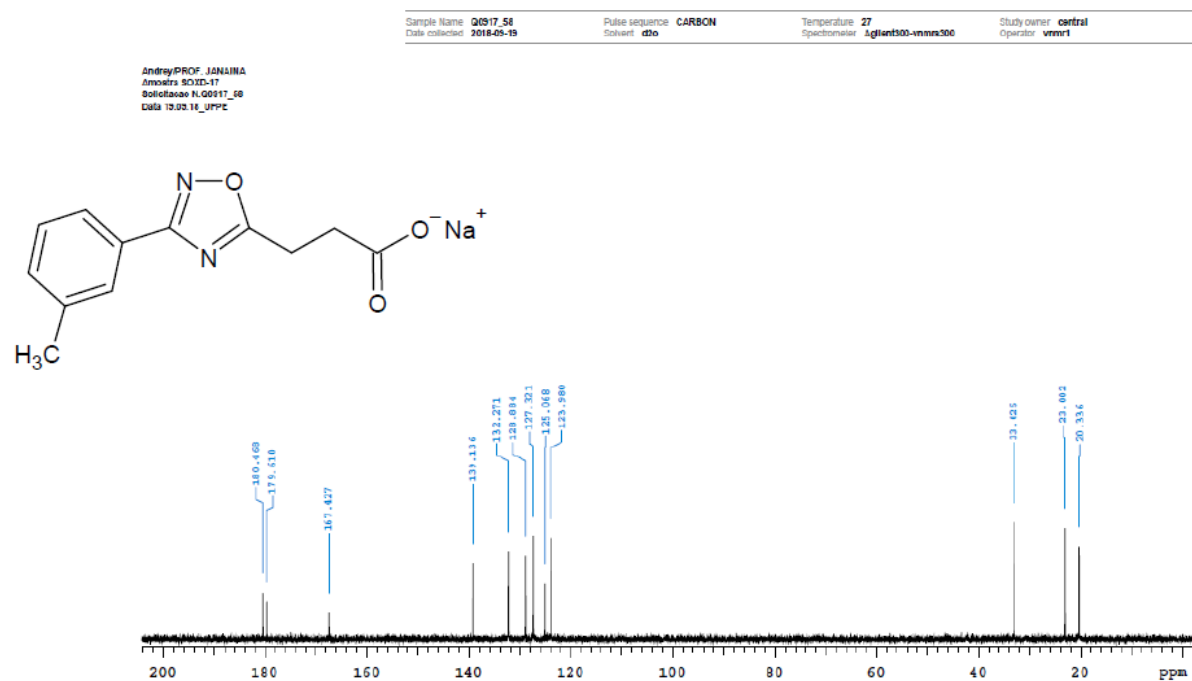
## APÊNDICE W

Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(3-Metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2p.



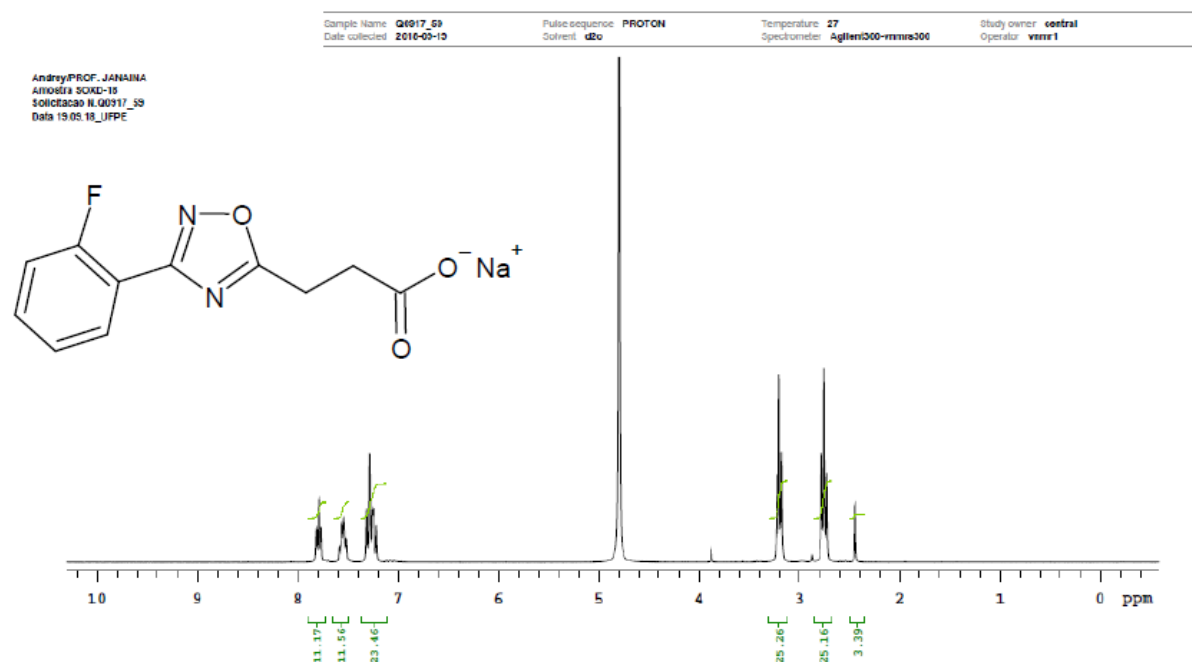
## APÊNDICE X

Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(3-Metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2p.



## APÊNDICE Y

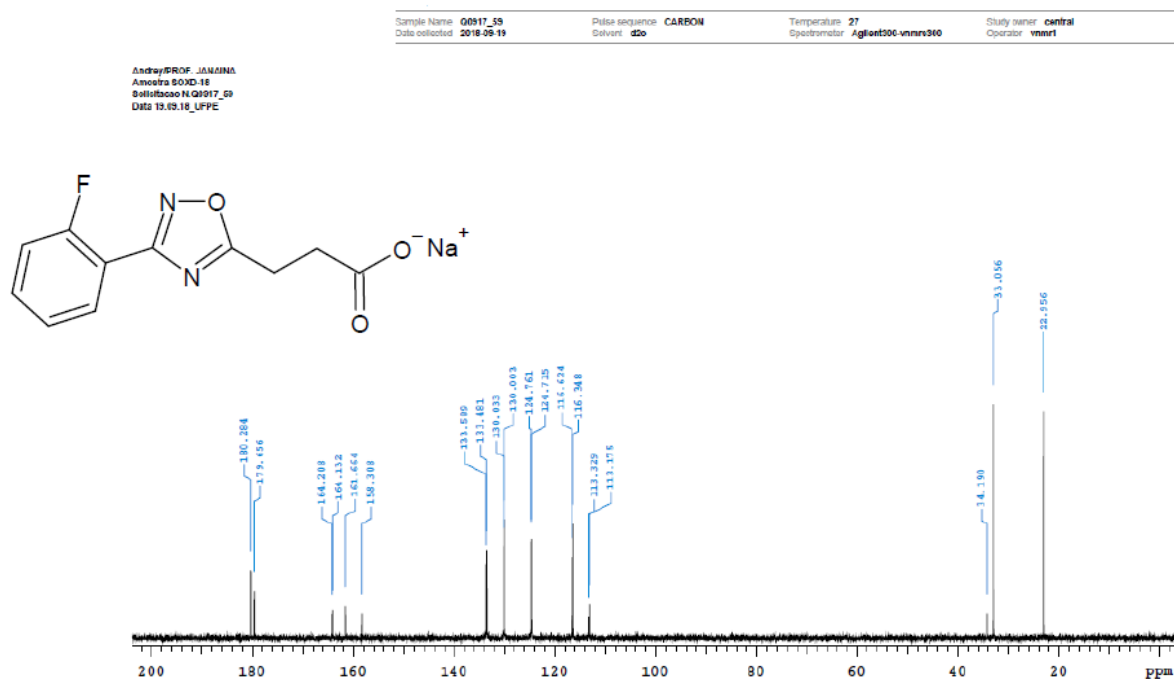
Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(2-Fluorfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2q.





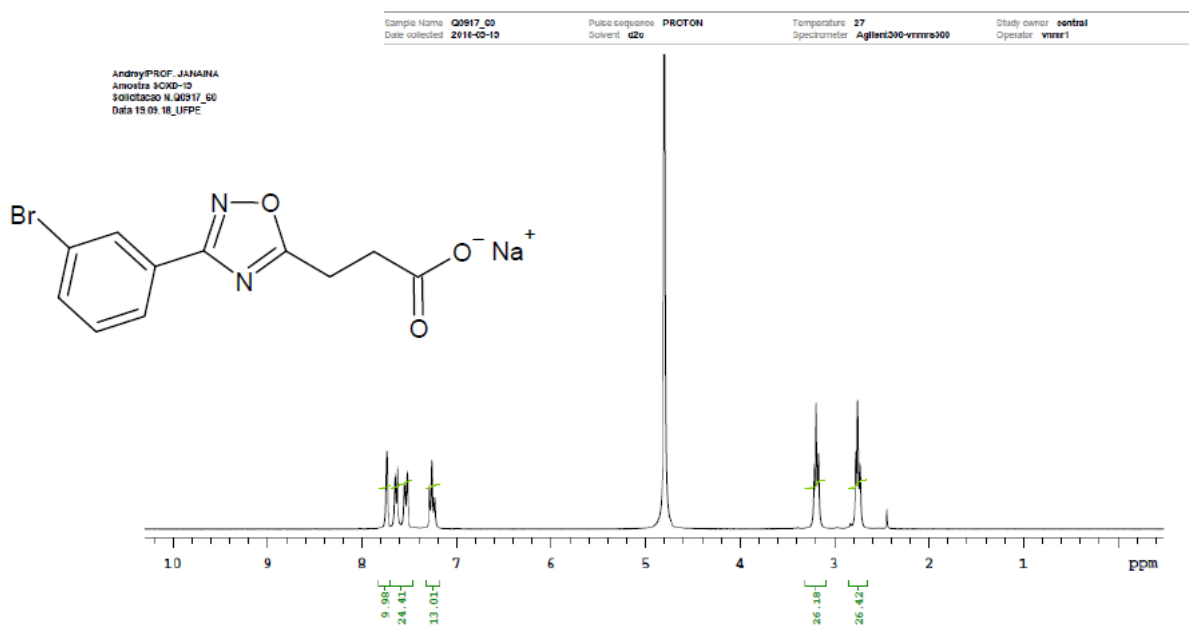
## APÊNDICE Z

Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(2-Fluorfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2q.



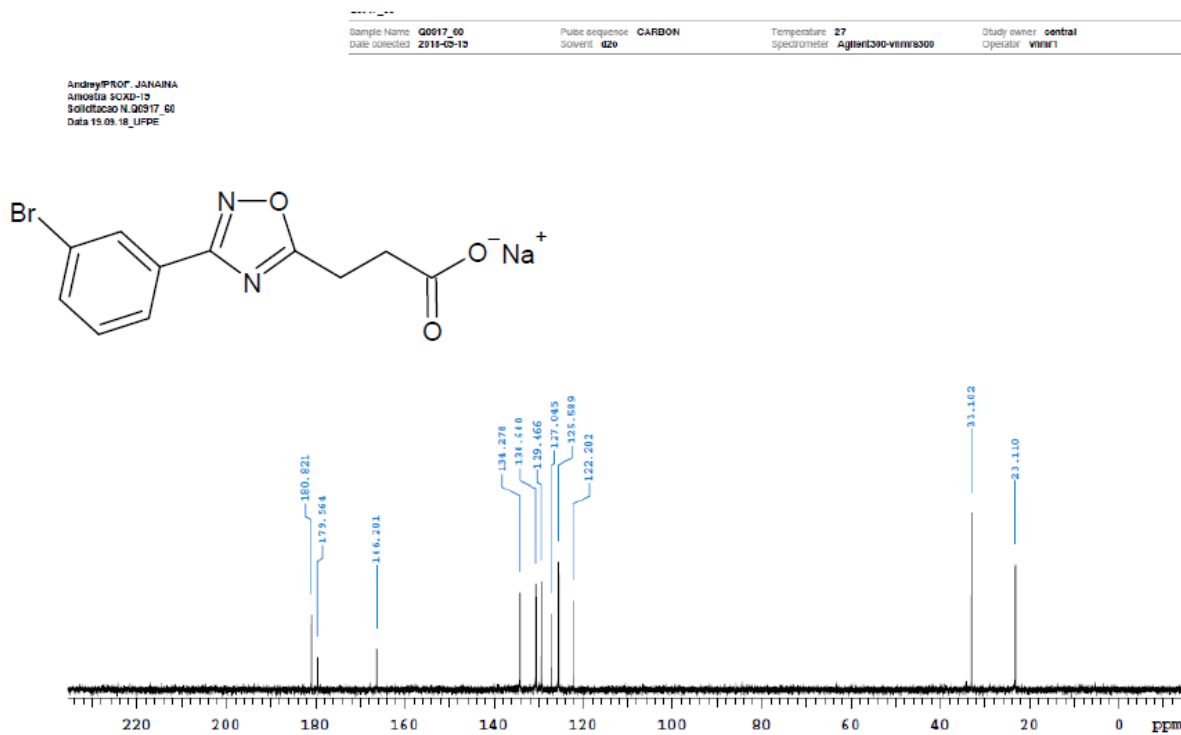
## APÊNDICE AA

Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-(3-(2-Bromofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2r.



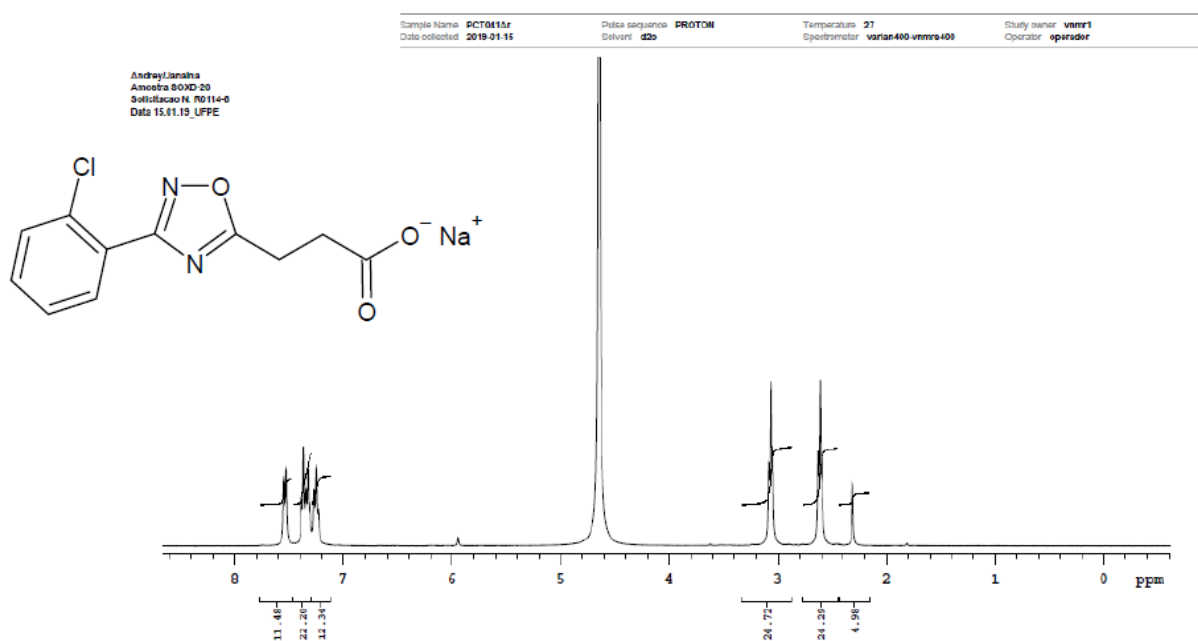
## APÊNDICE BB

Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(2-Bromofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2r.



## APÊNDICE CC

Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-[3-(2-Clorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-propanoato de sódio 2s.



## APÊNDICE DD

Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do 4-(3-(2-Clorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de sódio 2s.

