



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

LARISSA FERNANDA LIMA FERREIRA

**SÍNTESE DE NOVOS DERIVADOS DE OXADIAZOLIDIN- 5-ONAS COMO
CANDIDATOS A INIBIDORES SELETIVOS DA ENZIMA CONVERSORA DA
ANGIOTENSINA (ECA)**

Recife

2023

LARISSA FERNANDA LIMA FERREIRA

**SÍNTESE DE NOVOS DERIVADOS DE OXADIAZOLIDIN- 5-ONAS COMO
CANDIDATOS A INIBIDORES SELETIVOS DA ENZIMA CONVERSORA DA
ANGIOTENSINA (ECA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Janaína Versiani dos Anjos

Recife

2023

F383s	Ferreira, Larissa Fernanda Lima Síntese de novos derivados de oxadiazolidin-5-onas como candidatos a inibidores seletivos da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA) / Larissa Fernanda Lima Ferreira. – 2023. 102 f.: il., fig., tab. Orientador: Janaína Versiani dos Anjos. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, Química, Recife, 2023. Inclui referências e apêndices. 1. Química orgânica. 2. Oxadiazolidin-5-onas. 3. Docking molecular. 4. Inibidores seletivos. I. Anjos, Janaína Versiani dos (orientador). II. Título.	547	CDD (23. ed.)	UFPE- CCEN 2023 - 129
-------	---	-----	---------------	-----------------------

LARISSA FERNANDA LIMA FERREIRA

**"SÍNTESE DE NOVOS DERIVADOS DE OXADIAZOLIDIN-5-ONAS
COMO CANDIDATOS A INIBIDORES SELETIVOS DA ENZIMA
CONVERSORA DA ANGIOTENSINA (ECA)."**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação no
Departamento de Química
Fundamental da Universidade
Federal de Pernambuco, como
requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Química.

Aprovada em: 24/02/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Janaína Versiani dos Anjos (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Larissa Gonçalves Maciel
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Ronaldo Nascimento de Oliveira
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico este trabalho a Deus e sua amada mãe, Nossa Senhora, por sempre guiar meus passos. Aos meus pais e amigos por todo apoio, incentivo e paciência.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Janaína, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa, pelas orientações e ensinamentos, por se fazer presente em todas as etapas deste trabalho, tornando-o leve e gratificante, pela paciência, pelos momentos de descontração e principalmente pelo exemplo de professora e pesquisadora.

Aos colegas de laboratório: Sidney, Valeria, Rayane e Ediele, pelo auxílio nos experimentos, pela companhia e momentos de descontração.

À doutoranda Ilária Martina, por partilhar seus conhecimentos de *docking molecular*, pela paciência, solicitude, e pelo auxílio nos ensaios *in vitro* e *in silico*.

À professora Larissa, pelos ensinamentos e por sanar minhas dúvidas sempre que necessário.

Ao laboratório de cultura celular - Prometeu (UFPE) por nos acolher e ceder um espaço para realização de parte deste trabalho.

Aos meus amigos Eduarda Florencio, Marcela Sampaio e Josevandro Barros, por me acolher em Recife, por partilhar comigo suas vivências, pelo carinho e cuidado, pelos conselhos, pelos momentos de descontração e principalmente pela companhia e amizade, sem vocês essa jornada não seria tão felicitosa e prazerosa.

À professora Aline Valença, por disponibilizar o kit calorimétrico para os testes *in vitro*. Aos técnicos da central analítica, aos colegas de curso, aos membros da pós-graduação e a todos que contribuíram para realização deste trabalho de forma direta ou indireta.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

A hipertensão arterial é doença crônica, silenciosa e multifatorial que afeta milhares de pessoas em todo o mundo. A incidência de pacientes hipertensos consiste em um sério problema de saúde pública, pois essa patologia é tida como o principal fator de risco para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares. Os iECAs (inibidores da enzima conversora da angiotensina) constituem a classe de fármacos mais utilizadas para o tratamento medicamentoso da hipertensão arterial. Esses fármacos atuam no sistema renina-angiotensina-aldosterona inibindo a ECA. Todavia, a falta de seletividade que os fármacos comerciais apresentam por um dos domínios homólogos da enzima (nECA e cECA) vem sendo apontada como a principal causa dos efeitos adversos. Diante disso, buscou-se desenvolver novos derivados de oxadiazolidin-5-onas como candidatos a fármacos anti-hipertensivos como prováveis inibidores seletivos da cECA e avaliar *in vitro* e *in silico* a inibição frente a enzima. A partir disso, sintetizou-se 36 substâncias inéditas por meio de seis reações subsequentes. Os ensaios *in vitro* mostraram que as substâncias testadas **11a-l** não apresentaram percentual de inibição significativo nas concentrações testadas (100 µM, 30 µM, 20 µM, 15 µM, 5 µM, 2,5 µM e 1 µM). As simulações de *docking molecular* elucidaram que boa parte das substâncias testadas realizam interações de quelação com o zinco catalítico, sendo este um bom indicio para atividade inibitória. Contudo, as demais interações tidas como relevantes para ação inibitória dos protótipos não foram observadas. Por sua vez, o composto **11d** realizou ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos conservados para o domínio cECA no subsítio S₂ (Gln²⁸¹, Lys⁵¹¹, Tyr⁵²⁰ e Ala³⁵⁶). Essas interações são indícios que a substância **11d** pode apresentar seletividade para o domínio cECA em testes mais específicos. Estima-se que a falta de seletividade das substâncias testadas possa ser melhorada ao realizar a hidrólise dessas substâncias, deixando a porção de ácido carboxílico terminal ligado ao grupamento triptofano livre para interagir com subsítio S₂. Acredita-se ainda que modificações estruturais promovam o aumento das interações do tipo ligação de hidrogênio também sejam capazes de influenciar positivamente no potencial de inibição das substâncias, promovendo assim maiores interações com o sítio ativo da ECA.

Palavras-chave: oxadiazolidin-5-onas; docking molecular; inibidores seletivos.

ABSTRACT

Hypertension is a chronic, silent and multifactorial disease that affects thousands of people around the world. The incidence of hypertensive patients is a serious public health problem, as this pathology is considered the main risk factor for the development of cardiovascular diseases. ACE inhibitors (angiotensin-converting enzyme inhibitors) are the class of drugs most used for the drug treatment of arterial hypertension. These drugs act on the renin-angiotensin-aldosterone system, inhibiting ACE. However, the lack of selectivity that commercial drugs have for one of the homologous domains of the enzyme (nECA and cECA) has been identified as the main cause of adverse effects. Therefore, we planned to develop new derivatives of oxadiazolidin-5-ones as candidates for antihypertensive drugs as probable selective cECA inhibitors and to evaluate in vitro and in silico inhibition against the enzyme. From this, 36 new substances were synthesized through six subsequent reactions. The in vitro assays showed that the tested substances 11a-l did not present a significant percentage of inhibition in the tested concentrations (100 μ M, 30 μ M, 20 μ M, 15 μ M, 5 μ M, 2.5 μ M and 1 μ M). Molecular docking simulations elucidated that most of the substances tested carry out chelation interactions with catalytic zinc, which is a good indication of inhibitory activity. However, the other interactions considered relevant to the inhibitory action of the prototypes were not observed. In turn, compound 11d performed hydrogen bonds with conserved amino acid residues for the cECA domain in the S2 subsite (Gln281, Lys511, Tyr520 and Ala356). These interactions are indications that substance 11d may be selective for the cECA domain in more specific tests. It is estimated that the lack of selectivity of the tested substances can be improved by carrying out the hydrolysis of these substances, leaving the terminal carboxylic acid moiety attached to the tryptophan group free to interact with the S2 subsite. It is also believed that structural modifications that promote an increase in hydrogen bonding interactions are also capable of positively influencing the inhibition potential of the substances, thus promoting greater interactions with the active site of ACE.

Keywords: oxadiazolidin-5-ones; molecular docking; selective inhibitors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Exemplos de fármacos bloqueadores do canal de cálcio (BCC).....	19
Figura 2 -	Exemplos de fármacos bloqueadores dos receptores AT1 da angiotensina II (BRA).....	19
Figura 3 -	Exemplos de fármacos betabloqueadores (BB).....	20
Figura 4 -	Sistema renina-angiotensina-aldosterona.....	21
Figura 5 -	Representação esquemática dos resíduos que constituem os domínios nECA/cECA.....	22
Figura 6 -	Estrutura do protótipo de inibidor RXP407.....	23
Figura 7 -	Estrutura do inibidor seletivo RXPA380.....	23
Figura 8 -	Estruturas dos principais inibidores comerciais da ECA.....	25
Figura 9 -	Principais interações que o lisinopril, um iECA, realiza no sítio ativo da ECA.26	26
Figura 10 -	Estrutura da 1,2,4-oxadiazolidin-5-ona.....	28
Figura 11 -	Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃ , 400 MHz) de 11a	43
Figura 12 -	Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃ , 100 MHz) de 11a	44
Figura 13 -	Estrutura das substâncias 11a-l	44
Figura 14 -	<i>Redocking</i> do ligante cristalográfico lisinopril na estrutura da ECA para validação do método. (Código PDB: 1O86). Em rosa, tem-se a conformação do ligante cristalográfico LPR. No verde, observa-se o ligante cocrystalizado LPR após o RD. E em cinza é ilustrado o átomo de zinco (Zn ²⁺).....	48
Figura 15 -	Representação das interações intermoleculares da substâncias 11c com o zinco.....	51
Figura 16 -	Interações de hidrogênio da substância 11c com os resíduos da ECA.....	52
Figura 17 -	Interações de hidrogênio da substância 11d com os resíduos conservados no subsítio S ₂ para domínio cECA.....	53
Figura 18 -	Controle interno do Kit de inibição da enzima ECA. BC (Branco); IC (controle de inibição); EC (controle enzimático) e SC (controle do solvente - DMSO).....	54
Figura 19 -	Triagem em duplicata na concentração fixa de 100 µM para substâncias	

	da série 11a-l	54
Figura 20 -	Triagem em duplicata em diferentes concentrações para as substâncias 11a e 11e	56
Figura 21 -	Triagem em duplicata em diferentes concentrações para substâncias 11g e 11k	57
Figura 22 -	Triagem em duplicata em diferentes concentrações para substâncias 11l	58
Figura 23 -	Representação esquemática da metodologia utilizada no teste <i>in vitro</i>	71
Figura 24 -	Espectro de ^1H (CDCL ₃ , 400 MHz) 11a	79
Figura 25 -	Espectro de ^{13}C (CDCL ₃ , 100 MHz) 11a	79
Figura 26 -	Espectro de ^1H (CDCL ₃ , 400 MHz) 11b	80
Figura 27 -	Espectro de ^{13}C (CDCL ₃ , 100 MHz) 11b	80
Figura 28 -	Espectro de ^1H (CDCL ₃ , 400 MHz) 11c	81
Figura 29 -	Espectro de ^{13}C (CDCL ₃ , 100 MHz) 11c	81
Figura 30 -	Espectro de ^1H (CDCL ₃ , 400 MHz) 11d	82
Figura 31 -	Espectro de ^{13}C (CDCL ₃ , 100 MHz) 11d	82
Figura 32 -	Espectro de ^1H (CDCL ₃ , 400 MHz) 11e	83
Figura 33 -	Espectro de ^{13}C (CDCL ₃ , 100 MHz) 11e	83
Figura 34 -	Espectro de ^1H (CDCL ₃ , 400 MHz) 11f	84
Figura 35 -	Espectro de ^{13}C (CDCL ₃ , 100 MHz) 11f	84
Figura 36 -	Espectro de ^1H (CDCL ₃ , 400 MHz) 11g	85
Figura 37 -	Espectro de ^{13}C (CDCL ₃ , 100 MHz) 11g	85
Figura 38 -	Espectro de ^1H (CDCL ₃ , 400 MHz) 11h	86
Figura 39 -	Espectro de ^{13}C (CDCL ₃ , 100 MHz) 11h	86
Figura 40 -	Espectro de ^1H (CDCL ₃ , 400 MHz) 11i	87
Figura 41 -	Espectro de ^{13}C (CDCL ₃ , 100 MHz) 11i	87
Figura 42 -	Espectro de ^1H (CDCL ₃ , 400 MHz) 11j	88
Figura 43 -	Espectro de ^{13}C (CDCL ₃ , 100 MHz) 11j	88
Figura 44 -	Espectro de ^1H (CDCL ₃ , 400 MHz) 11k	89
Figura 45 -	Espectro de ^{13}C (CDCL ₃ , 100 MHz) 11k	89
Figura 46 -	Espectro de ^1H (CDCL ₃ , 400 MHz) 11l	90
Figura 47 -	Espectro de ^{13}C (CDCL ₃ , 100 MHz) 11l	90
Figura 48 -	Complexo referente a substância 11a	91
Figura 49 -	Complexo referente a substância 11b	92

Figura 50 -	Complexo referente a substância 11c	93
Figura 51 -	Complexo referente a substância 11d	94
Figura 52 -	Complexo referente a substância 11e	95
Figura 53 -	Complexo referente a substância 11f	96
Figura 54 -	Complexo referente a substância 11g	97
Figura 55 -	Complexo referente a substância 11h	98
Figura 56 -	Complexo referente a substância 11i	99
Figura 57 -	Complexo referente a substância 11j	100
Figura 58 -	Complexo referente a substância 11k	101
Figura 59 -	Complexo referente a substância 11l	102

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Mecanismo reacional da reação do tipo “click” alcino-azida	30
Esquema 2 - Síntese das amidoximas aromáticas	32
Esquema 3 - Síntese das 1,2,4-oxadiazolin-5-onas	34
Esquema 4 - Mecanismo proposto para formação das 1,2,4-oxadiazolin-5-onas.....	35
Esquema 5 - Equilíbrio tautomérico nas 1,2,4-oxadiazolin-5-onas	35
Esquema 6 - Síntese das 3-aryl-4-(propinil)-1,2,4-oxadiazolin-5-onas	38
Esquema 7 - Reação do tipo “click” alcino-azida	39
Esquema 8 - Formação das amidas derivadas de Oxadiazolinonas	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados experimentais dos compostos (3a-l).....	33
Tabela 2 -	Dados experimentais dos compostos (5a-l).....	36
Tabela 3 -	Condições sintéticas testadas para funcionalização das 1,2,4-oxadiazolidin-5-onas.....	37
Tabela 4 -	Dados experimentais dos compostos (7a-l).....	38
Tabela 5 -	Dados experimentais dos compostos (9a-l).....	40
Tabela 6 -	Dados experimentais dos compostos (11a-l).....	41
Tabela 7 -	Valores de rotação específica para série 11a-l	45
Tabela 8 -	Dados experimentais obtidos no docking molecular para os compostos (11a-l).....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1O86	Código de identificação do Banco de Dados de Proteínas (PDB) da enzima conversora da angiotensina
BB	Betabloqueadores
BBC	Bloqueadores do canal de cálcio
BRA	Bloqueadores dos receptores AT1 da angiotensina II
C ₄ H ₉ KO	Terc-butóxido de potássio
CaH ₂	Hidreto de cálcio
CCD	Cromatografia em camada delgada
COVID-19	Coronavirus disease
CDCl ₃ -d ₆	Clorofórmio deuterado
d	Dupleto
dd	Duplo duplete
DIU	Diuréticos
DMF	Dimetilformamida
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
ECA	Enzima conversora da angiotensina
EtOH	Etanol
HA	Hipertensão arterial
H _{Ar}	Hidrogênio aromático
Hz	Hertz
iECAs	Inibidores da enzima conversora da angiotensina
<i>J</i>	Constante de acoplamento
K ₂ CO ₃	Carbonato de potássio
LASOM	Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal
m	Multipleto
NaH	Hidreto de sódio
P.F	Ponto de fusão

P.F.lit	Ponto de fusão da literatura
PDB	Protein data bank (banco de dados de proteínas)
ppm	Partes por milhão
RD	Redocking molecular
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMSD	Root mean <i>sauare</i> deviation (désvio médio quadrático)
SARS-CoV-2	Coronavirus 2 da síndrome respiratória aguda grave
s	Simpleto
sECA	Enzima conversora da angiotensina somática
s1	Simpleto alargado
t	Tripleto
t.a	Temperatura ambiente
TBTU	Tetrafluoroborato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio
TEA	Trietilamina

SÚMARIO

1	INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
1.1	Hipertensão.....	17
1.2	Vias de tratamento.....	18
1.3	Enzima Conversora da Angiotensina.....	20
1.4	Inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA).....	21
1.5	Efeitos adversos.....	27
1.6	1,2,4-Oxadiazolidin-5-onas.....	28
1.7	Reação tipo “click” alcino-azida.....	28
2	OBJETIVOS.....	31
2.1	Geral.....	31
2.2	Específico.....	31
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
3.1	Síntese dos candidatos a inibidores da ECA.....	32
3.1.1	Síntese das aril-amidoximas.....	32
3.1.2	Síntese das 1,2,4-oxadiazolidin-5-onas.....	33
3.1.3	Síntese das 3-aril-4-(propinil)-1,2,4-oxadiazolin-5-onas.....	36
3.1.4	Reação tipo “click” alcino-azida entre as 3-aril-4-(propinil)-1,2,4-oxadiazolin-5-onas e o ácido 4-azidobenzóico.....	39
3.1.5	Reação de Amidificação entre o éster metílico do L-triptofano e os derivados ácidos triazólicos das 1,2,4-oxadiazolin-5-onas.....	40
3.2	Polarimetria.....	44
3.3	Docking molecular.....	46
3.4	Testes in vitro.....	53
4	METODOLOGIA.....	59
4.1	Síntese dos candidatos a inibidores da ECA.....	59
4.1.1	Procedimentos gerais.....	59
4.1.2	Equipamentos utilizados.....	59
4.1.3	Síntese das aril-amidoximas:.....	59
4.1.4	Síntese das 1,2,4-oxadiazolidin-5-onas:.....	60
4.1.5	Síntese das 3-aril-4-(propinil)-1,2,4-oxadiazolin-5-onas:.....	61
4.1.6	Reação tipo “click” alcino-azida entre as 3-aril-4-(propinil)-1,2,4-oxadiazolin-5-	

	onas e o ácido 4-azidobenzóico:.....	61
4.1.7	Reação de esterificação do triptofano.....	61
4.1.8	Reação de Amidificação entre o éster do Trp e os derivados triazólicos das 1,2,4-oxadiazolin-5-onas:.....	62
4.2	Docking Molecular.....	67
4.3	Teste in vitro.....	68
5	PERSPECTIVAS.....	72
6	CONCLUSÃO.....	73
	REFERENCIAS.....	74
	APÊNDICE A – ESPECTROS DE RMN.....	79
	APÊNDICE B – COMPLEXOS DA SÉRIE (11a-l).....	91

1 INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Hipertensão

A hipertensão arterial é uma doença crônica que afeta mais de 30% da população adulta, correspondendo a mais de um bilhão de pessoas no mundo (Organização Pan-Americana da Saúde, 2020). A hipertensão é uma patologia assintomática que costuma causar alterações estruturais e funcionais de forma gradativa em órgãos-alvo como coração, rins, vasos e cérebro (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2020). A hipertensão é uma condição multifatorial, ou seja, que depende de fatores genéticos, epigenéticos, ambientais e sociais (BARROSO *et al.*, 2021).

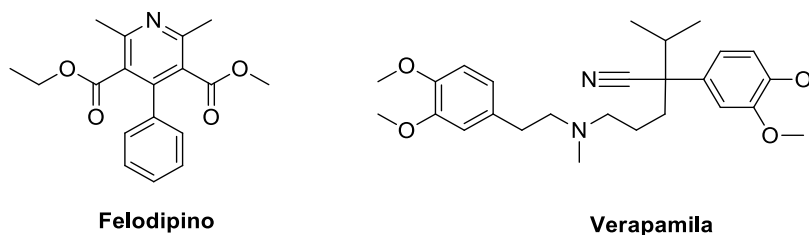
Do ponto de vista clínico, a hipertensão arterial não controlada é tida como o principal fator de risco para várias doenças cardiovasculares como, por exemplo, aterosclerose, doença coronariana, acidente vascular cerebral, doença arterial periférica e insuficiência cardíaca (BARROSO *et al.*, 2021). Atualmente, as doenças cardiovasculares são consideradas a principal causa de morte no mundo, atingindo um público diverso. Estima-se que 31% das mortes em escala global foram decorrentes das doenças cardiovasculares e que cerca de 17,9 milhões de pessoas morreram devido essa patologia no ano de 2016 (Organização Pan-Americana da Saúde, 2022).

Durante o período pandêmico (2019-2021) a hipertensão foi considerada um dos principais agravantes para o surgimento de complicações graves decorrente da COVID-19, devido a ação do SARS-CoV-2 no sistema renina-angiotensina-aldosterona, pois alguns pesquisadores relataram que a ECA viabilizava a entrada do vírus nas células (GHORANI *et al.*, 2022). Dessa forma, surgiu a hipótese de que o uso de medicamentos que aumentam a expressão da ECA, tais como os inibidores da enzima conversora da angiotensina (iECAs) e os bloqueadores dos receptores de angiotensina (BRAs) aumentariam o risco de infecções e virulência, sugerindo assim a troca de terapia (BROUWERS *et al.*, 2021). Todavia, os estudos observacionais mostraram que não existe nenhuma relação sólida para essa hipótese e que o uso desses fármacos em longo prazo é benéfico (GHORANI *et al.*, 2022).

1.2 Vias de tratamento

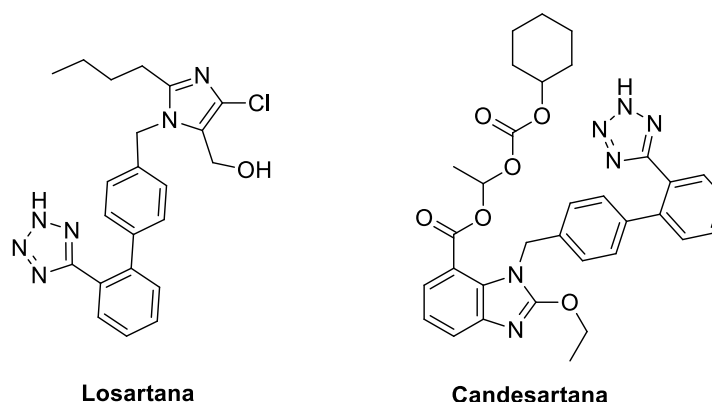
Existem duas vias de tratamento para hipertensão arterial, as quais são subdivididas em terapia não medicamentosa e medicamentosa. A terapia não medicamentosa inclui a mudança de hábitos alimentares (ingestão de alimentos saudáveis e dieta hipossódica), redução da massa corpórea, restrição ao consumo de álcool, cessação do tabagismo e a prática de exercícios físicos. Essas ações são indicadas tanto para o controle da síndrome na fase inicial, quanto para prevenção (BARROSO *et al.*, 2021). Por sua vez, a adesão ao tratamento medicamentoso é feita quando as demais terapias não repercutem o efeito esperado. Atualmente, dispõe-se de cinco classes de fármacos anti-hipertensivos, que são catalogados como: diuréticos (DIU), bloqueadores dos canais de cálcio (BCC), inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECAs), bloqueadores dos receptores da angiotensina II (BRA) e betabloqueadores (BB) (WHELTON *et al.*, 2018). Os diuréticos (DIU) consistem na classe de anti-hipertensivos mais antigos do mercado. Esses fármacos normalmente são administrados via monoterapia ou em conjunto com outros medicamentos. O mecanismo de ação dos diuréticos é direcionado ao seu efeito natriurético, que provoca a diminuição do volume circulante e do volume extracelular. De acordo com as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2021) é recomendado o uso de tiazídicos, como por exemplo, a hidroclorotiazida em doses baixas, uma vez que, os efeitos são mais amenos e o tempo de duração é longo.

Os bloqueadores do canal de cálcio (BCC) são classificados como: di-hidropiridínicos (felodipino) e não-di-hidropiridínicos (verapamila) (**Figura 1**). Esses fármacos atuam inibindo o fluxo de cálcio extracelular para o interior das células por meio do canal lento (tipo L) na membrana das células musculares lisas arteríolas. Tal processo acaba resultando na diminuição da disponibilidade de cálcio no interior das células, dificultando a contração muscular, ocasionando assim redução na resistência vascular periférica por vasodilatação (MALACHIAS *et al.*, 2016).

Figura 1 - Exemplos de fármacos bloqueadores do canal de cálcio (BCC)

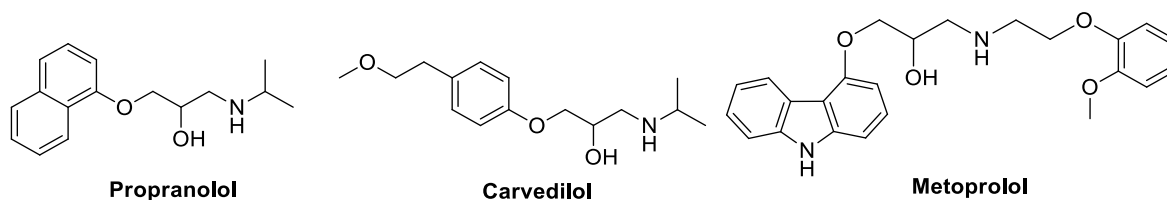
Fonte: A autora (2023)

Os bloqueadores dos receptores AT1 da angiotensina II (BRA), assim como os iECAs atuam no sistema renina-angiotensina-aldosterona. No entanto, os BRAs agem bloqueando os receptores AT1, que são responsáveis pela ação direta da angiotensina II. A losartana e a candesartana são exemplos de BRAs comerciais disponíveis no mercado (JULIUS *et al.*, 2004) (**Figura 2**).

Figura 2 - Exemplos de fármacos bloqueadores dos receptores AT1 da angiotensina II

Fonte: A autora (2023)

Os betabloqueadores (BB) ou antagonistas dos receptores beta-adrenérgicos são divididos entre não-seletivos, cardiosseletivos e com ação vasodilatadora. Essa classificação é dada de acordo com a seletividade para ligação aos receptores adrenérgicos. Esses medicamentos apresentam mecanismos de ação complexos. De modo geral, os betabloqueadores atuam inicialmente diminuindo o débito cardíaco e na secreção de renina, por meio da diminuição das catecolaminas nas sinapses nervosas e com readaptação dos barorreceptores. O propranolol, o metoprolol e o carvedilol respectivamente, constituem exemplos de fármacos betabloqueadores (LÓPEZ-SENDÓN *et al.*, 2004) (**Figura 3**).

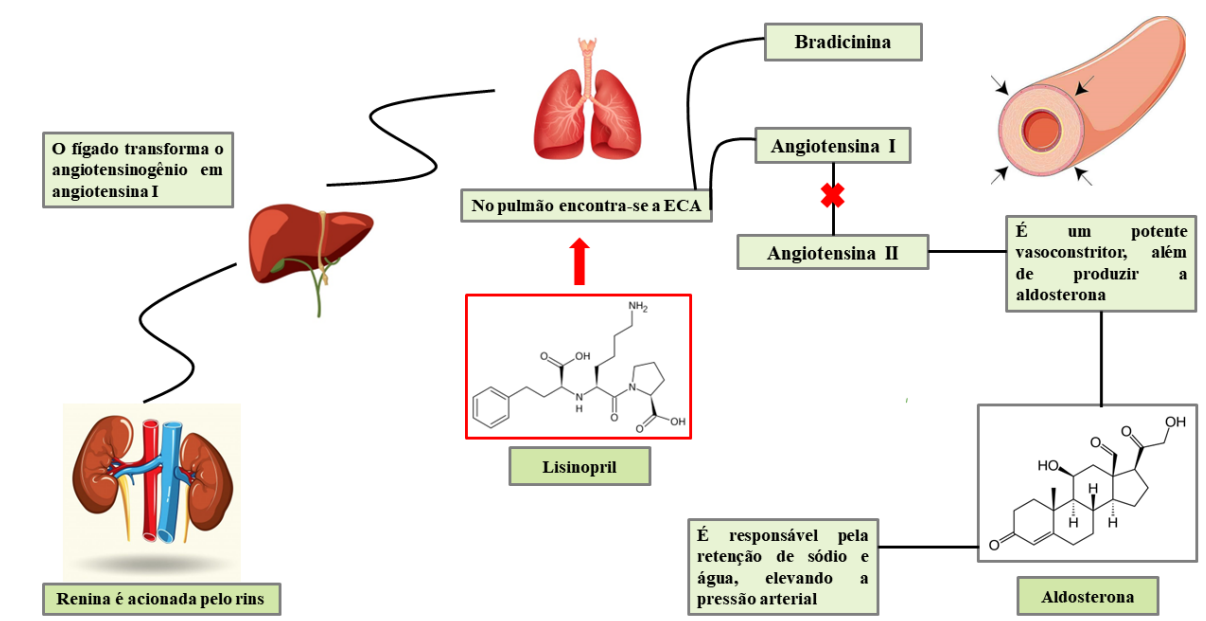
Figura 3 - Exemplos de fármacos betabloqueadores (BB)

Fonte: A autora (2023)

1.3 Enzima Conversora da Angiotensina

A enzima conversora da angiotensina (EC 3.4.15.1; ECA) é um dipeptidil carboxipeptidase constituída por dois domínios catalíticos (nECA e cECA) que partilham de 65 % de homologia de similaridade entre si (FUCHS, *et al.*, 2008). Além disso, a ECA é tida como a enzima-chave que atua no sistema renina-angiotensina-aldosterona (**Figura 4**). Esta via tem como principal função o controle da excreção de sódio, a regulação do volume de fluidos corporais e o controle da pressão arterial. As reações que fazem parte do sistema renina-angiotensina-aldosterona tem início com a produção de um hormônio enzimático chamado renina, o qual é produzido no rim decorrente da queda da pressão arterial. Ao entrar em contato com a corrente sanguínea a renina cliva o angiotensinogênio (Proteína produzida no fígado) em angiotensina I. Por sua vez, a ECA que é produzida no pulmão hidrolisa a angiotensina I em angiotensina II (Potente vasoconstritor), fazendo com que as paredes musculares das arteríolas se contraiam promovendo o aumento da pressão arterial. Além disso, ao entrar em contato com as glândulas suprarrenais, a angiotensina II provoca a liberação da aldosterona, a qual é responsável pela retenção de sódio e água no corpo humano, resultando na elevação da pressão arterial (**Figura 4**) (IMAI *et al.*, 2005).

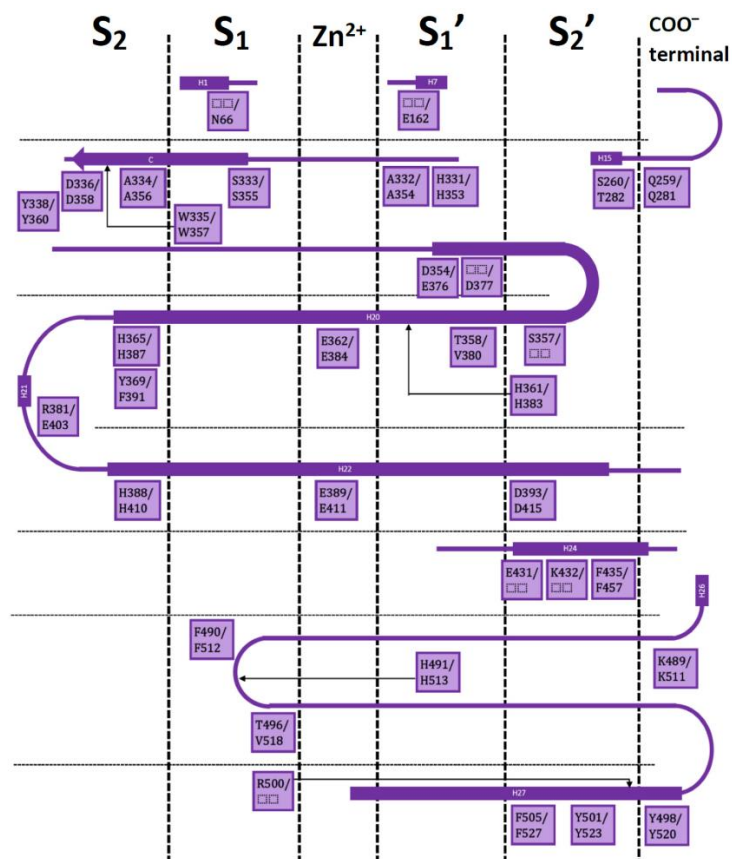
Figura 4 - Sistema renina-angiotensina-aldosterona



Fonte: A autora (2023)

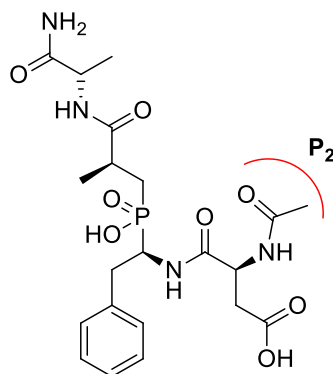
Estruturalmente, os domínios (nECA e cECA) assumem a forma de elipsóide cruzada por uma fenda longa e profunda do sítio ativo, com predominância de α -hélices, de modo que a cavidade de ligação é coberta por uma tampa, contendo o zinco catalítico (Zn^{2+}) no meio de quatro subsítios (S_2 , S_1 , S_1' e S_2'). O perfil farmacológico e a especificidade dos ligantes são distintos dependendo do domínio (CABALLERO, 2020). Outra diferença significativa entre os domínios refere-se à ativação do cloreto, isto é, o domínio cECA é ativado na presença de íons cloreto, sendo altamente dependente da concentração desses íons. Já o domínio nECA é ativado em concentração mais baixas. Além disto, esse domínio consegue reter a atividade catalítica residual mesmo na ausência de íons cloreto (FUCHS *et al.*, 2004).

Figura 5 - Representação esquemática dos resíduos que constituem os domínios nECA/cECA.



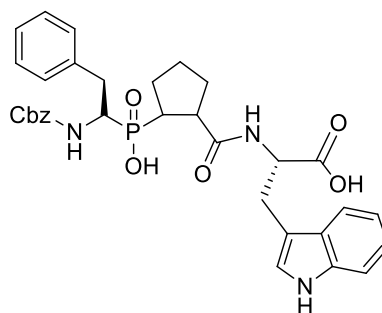
Fonte: (CABALLERO, 2020)

Estudos *in vivo* feitos com RXP407 (inibidor seletivo para nECA) (**Figura 5**) mostraram que a clivagem da angiotensina I ocorre de forma mais eficiente no domínio cECA (COTTON *et al.*, 2002). Desse modo, tem-se que o domínio cECA está envolvido essencialmente na regulação da pressão arterial. Já o domínio nECA é mais específico para o AcSDKP (tetrapeptídeo hemoregulador), responsável por controlar a diferenciação e proliferação de células-tronco hematopoiéticas. (NATESH *et al.*, 2004).

Figura 6 - Estrutura do inibidor seletivo RXP407

Fonte: A autora (2023)

De acordo com Georgiadis *et al.*, (2004) a seletividade dos inibidores pelo domínio cECA deve-se principalmente às interações específicas no subsítio S₂. A análise feita com o primeiro inibidor seletivo para o cECA (RXPA380) (**Figura 7**) mostrou que cinco dos doze resíduos que estão próximos à região do triptofano são diferentes no domínio nECA. Tais resíduos correspondem a Thr⁸⁵⁸, Glu⁹⁵², Val⁹⁵⁵, Val⁹⁵⁶ e Asp¹⁰²⁹. A principal distinção entre eles decorre da substituição da Val⁹⁵⁵, Val⁹⁵⁶, que são resíduos volumosos e hidrofóbicos no domínio cECA, por dois resíduos menores e polares, Ser³⁵⁷ e Thr³⁵⁸ no nECA.

Figura 7 - Estrutura do inibidor seletivo RXPA380.

Fonte: A autora (2023)

Por sua vez, a seletividade do RXP407 pelo domínio nECA decorre principalmente de interações com grupos funcionais na posição P₂ do inibidor (**Figura 6**). Deste modo, a presença de um grupamento amida C-terminal, um grupo C-terminal e uma cadeia lateral de ácido aspártico são essenciais para seletividade da substância pelo domínio nECA. Outra diferença estrutural relevante refere-se ao tamanho molecular, ou seja, os inibidores comerciais realizam interação apenas com os subsítios S₁' e S₂', enquanto o protótipo de

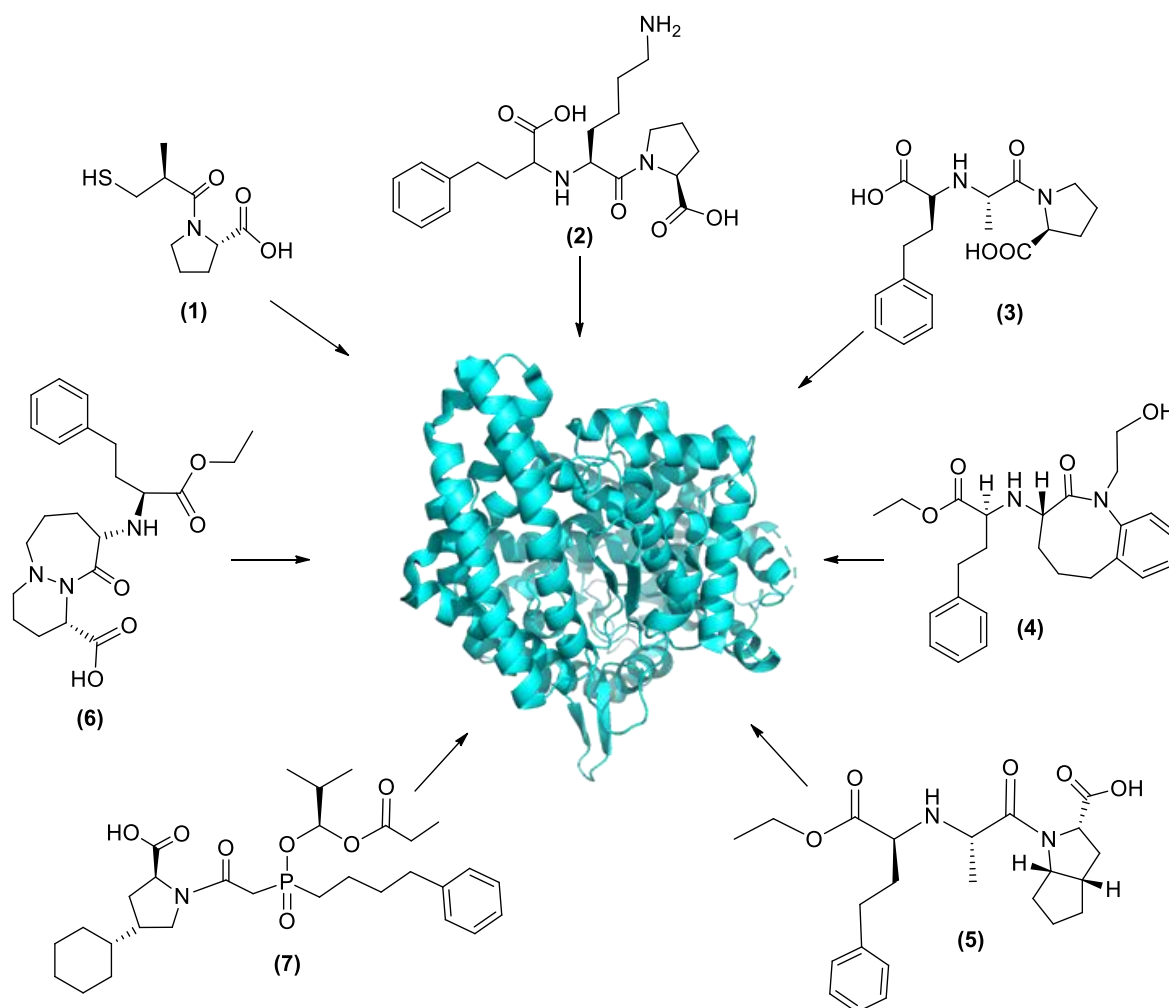
inibidor realiza mais interações com os subsítios S_1' , S_2' , S_1 e S_2 (DIVE *et al.*, 1999).

Ademais, verificou-se que tanto a presença do grupamento pseudo-prolina, quanto o triptofano nas posições P_1' e P_2' da estrutura do RXPA330 (Figura 7) contribuem de forma significativa para seletividade do domínio cECA, pois no domínio nECA estes grupamentos não são acomodados de forma efetiva, devido a interações não favoráveis entre a cadeia lateral do triptofano com os resíduos do domínio nECA (GEORGIADIS *et al.*, 2004).

1.4 Inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA)

Sabe-se que os primeiros inibidores competitivos da ECA de ocorrência natural foram derivados de peptídeos do veneno de cobra. O captopril (1), por exemplo, foi o primeiro inibidor sintético da ECA ativo por via oral, aprovado e comercializado para tratamento da hipertensão arterial desenvolvido através de uma pequena proteína localizada no veneno de uma serpente (*Bothrops jararaca*) (CUSHMAN *et al.*, 1973). Este fármaco inibe a atividade da ECA por meio de uma interação direta entre o grupo sulfidril da droga e o íon Zn^{2+} presente no sítio ativo da ECA (CABALLERO, 2020).

Após o captopril, outros inibidores foram projetados e sintetizados: lisinopril (2), enalapril (3), benazepril (4), ramipril (5) cilazapril (6) e fosinopril (7) (**Figura 8**) (NATESH *et al.*, 2004).

Figura 8 - Estruturas dos principais inibidores comerciais da ECA.

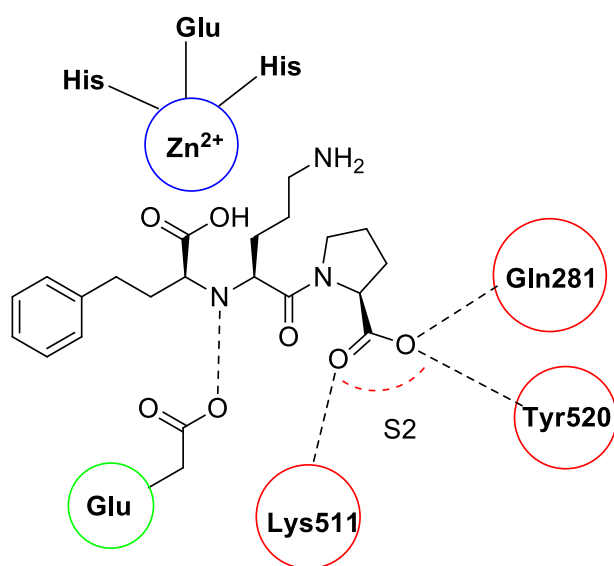
Fonte: A autora (2023)

Esses fármacos atuam inibindo a enzima conversora da angiotensina, impedindo a conversão da angiotensina I em angiotensina II. Na ausência de angiotensina II, as paredes musculares das pequenas artérias não sofrem contração, e os hormônios aldosterona (cujas função é reter sódio no túbulo renal distal) e vasopressina (antidiurético) não são liberados pelas glândulas adrenais. Desse modo, os rins passam a reter o potássio e excretar o sódio, resultando na diminuição da concentração de água, no volume do sangue e na redução da pressão arterial (TAVARES *et al.*, 2015)

De acordo com Fienberg *et al.*, (2017), a maioria dos iECAs liga-se na região catalítica dos sítios ativos em ambos os domínios através de uma interação de quelação com o zinco metálico e por intermédio de uma ligação de hidrogênio entre o ácido glutâmico

catalítico da enzima e o nitrogênio da amida do inibidor. Além disso, verifica-se também interações eletrostáticas e ligação de hidrogênio entre o ácido carboxílico terminal do inibidor e os três resíduos conservados no subsítio S2, sendo Gln²⁵⁹, Lys⁴⁸⁹ e Tyr⁴⁹⁸ para o domínio nECA e Gln²⁸¹, Lys⁵¹¹ e Tyr⁵²⁰ no domínio cECA (**Figura 8**). Ademais, constatou-se que as interações lipofílicas entre grupos apolares e os subsítios apolares aumentam a potência do inibidor. Tais interações são favorecidas no domínio cECA, uma vez que ele é mais lipofílico.

Figura 9 - Principais interações realizadas pelo lisinopril, um iECA, no sítio ativo da ECA.



Fonte: A autora (2023)

Estruturalmente, o captopril, o enalapril, o fosinopril e o lisinopril partilham do grupamento L-prolina. Esse aminoácido possui um grupo carboxila que, na forma de carboxilato, interage com os sítios catiônicos da ECA. Verifica-se também que a presença de alguns grupos na cadeia N-substituída da prolina são tidos como essenciais para manutenção da atividade dos fármacos, pois são sítios de ligação com o Zn^{2+} , como por exemplo, o grupo tiol (SH), a metila que se assemelha àquela contida na alanina e o grupamento amida secundário (NH). Ademais, o anel prolina contribui para as interações hidrofóbicas (SANTOS et al., 2021).

Segundo Natesh *et al.*, (2004) o lisinopril e o enalapril possuem maior afinidade pelo domínio cECA, enquanto que o captopril possui mais similaridade com o domínio nECA. Todavia não são fármacos seletivos. No ramipril e no enalapril (pró-fármacos do captopril), a função carboxílica inserida no lugar do grupamento sulfidril, resultou na minetização do

estado de transição do substrato da enzima ao sofrer o ataque nucleofílico. Além disso, as modificações estruturais feitas aumentaram as interações efetivas, que implicaram na redução do EC₅₀, minimizando, conseqüentemente, os efeitos adversos associados ao captopril (TAVARES *et al.*, 2015).

Todos os inibidores diferem quanto ao sítio de ligação no átomo de zinco catalítico. Benazepril, o ramipril, o cilazapril, o enalapril e o lisinopril interagem por meio do grupamento carboxila; enquanto que o captopril e o fosinopril interagem através da sulfidril e da fosforila, respectivamente (SOUZA, 2015).

1.5 Efeitos adversos dos inibidores da enzima conversora da angiotensina

Os iECAs (inibidores da enzima conversora da angiotensina I) estão no mercado há mais de quarenta anos, sendo bastante eficazes no tratamento da hipertensão arterial (ZAMAN; OPARIL; CALHOUN, 2002). O captopril, o enalapril e o lisinopril são tidos como os medicamentos de primeira linha para o tratamento de hipertensão e do infarto do miocárdio (THOMOPOULOS; PARATI; ZANCHETTI, 2014). Contudo, verificou-se que o uso prolongado desses fármacos pode acarretar em uma série de efeitos colaterais, tais como: dor de cabeça, fadiga, tosse seca e persistente, níveis elevados de potássio no sangue, pressão arterial mais baixa que o normal, erupção cutânea, dor de cabeça, tontura, febre e insuficiência renal (BAKRIS, 2009). Acredita-se que os efeitos adversos que os inibidores comerciais da ECA apresentam estão diretamente associados à falta especificidade deles, o que acaba resultando no acúmulo gradual da bradicinina, substância vasodilatadora produzida pelo corpo humano (CABALLERO, 2020).

A falta de seletividade dos iECAs resulta na inativação completa da ECA. Dessa forma, a enzima não realiza a hidrólise da bradicinina. Esse substrato é tido como um mediador de processos inflamatórios, possuindo ações pro-inflamatórias, vasodilatadoras, aumentando a permeabilidade vascular, causando alterações celulares e promovendo a síntese das prostaglandinas. Neste caso, o mecanismo de ação da bradicinina ocorre via ativação dos receptores B1 e B2, que são acopladas a proteína G presentes nas células endoteliais (JÚNIOR; PORTELLA JUNIOR; COHEN, 2016). Dessa forma, acúmulo de bradicinina no organismo acaba se tornando um problema. Além disso, a presença da bradicinina contribui de forma direta no mecanismo da tosse por meio da sensibilização das vias nervosas.

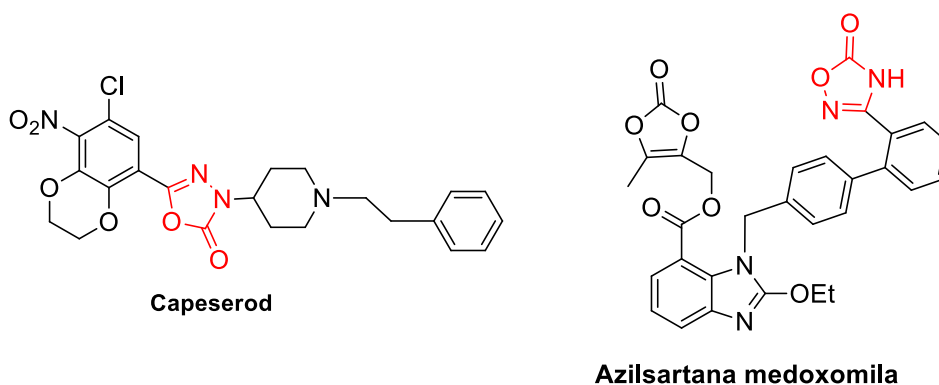
Em vista disso, a busca por inibidores da ECA capazes de bloquear apenas um domínio desta enzima, permitindo que o outro realize a degradação da bradicinina, mantendo assim os níveis deste substrato normalizados no organismo, resultaria em uma terapia mais amena com

a redução dos efeitos colaterais, contribuindo para tratamentos mais eficazes e com maior adesão dos pacientes.

1.6 1,2,4-Oxadiazolidin-5-onas

Os compostos heterocíclicos contendo nitrogênio são bastante utilizados na química orgânica e medicinal devido à variedade de propriedades bioativas associadas a eles. As oxadiazolonas, por exemplo, consistem em uma classe de compostos heterocíclicos ácidos, que são relatadas como bioisósteros de ácidos carboxílicos. Esses compostos possuem uma ampla aplicação no âmbito medicinal, pois atuam como: inibidores de COX-2, moduladores de GluR, antimicrobianos, antagonistas AT1, inibidores de fosfolipase A2 e inibidores de PLA2 (REDDY *et al.*, 2017). Além disto, os fármacos derivados da 1,3,4-oxadiazol-2-ona (Capeserod) e da 1,2,4-oxadiazol-5-ona (Azilsartana medoxomila) são utilizados para o tratamento da diabetes tipo 2, demência e hipertonia. (**Figura 9**) (SOLDATOVA *et al.*, 2021).

Figura 10 - Estrutura da 1,2,4-oxadiazolidin-5-ona



Fonte: A autora (2023)

1.7 Reação tipo “click” alcino-azida

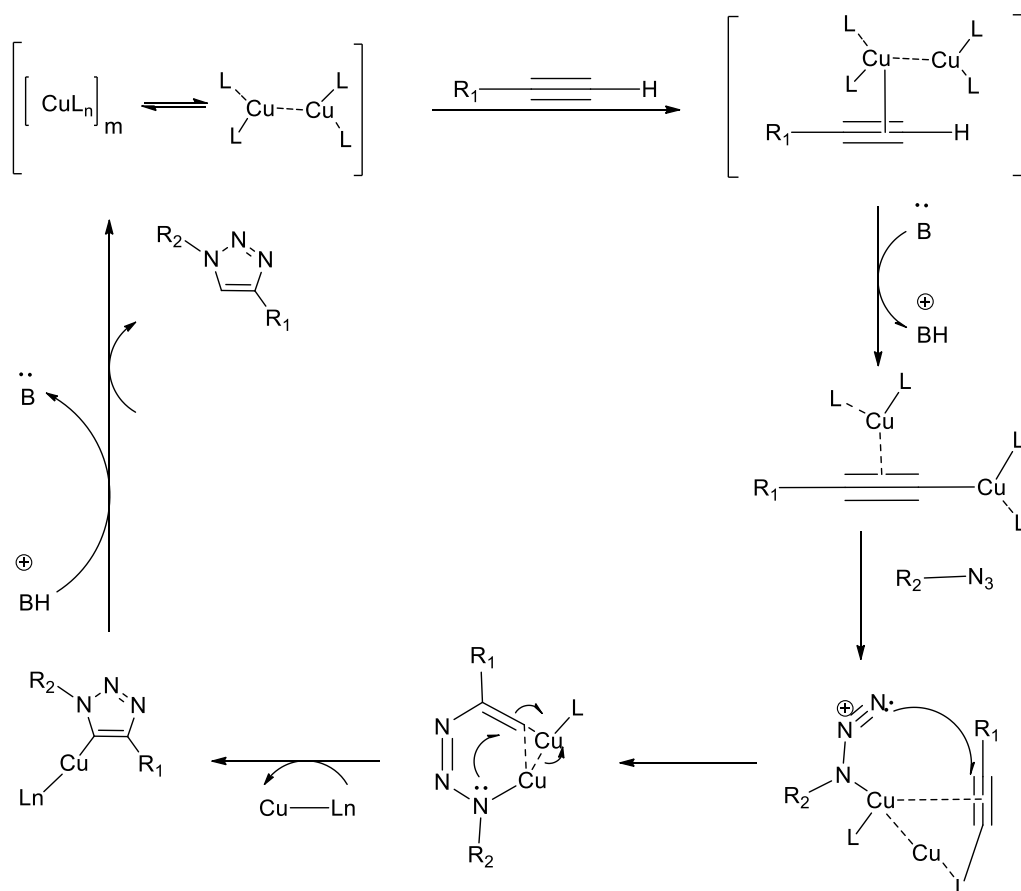
Recentemente, as reações do tipo “click” do tipo alcino-azida receberam destaque mundial, pois o trabalho desenvolvido por Bertozzi, Sharpless e Meldal pautado no “Desenvolvimento da química do click e da química biortogonal” foi laureado com o prêmio Nobel da química em 2022. O principal conceito por trás das reações do tipo “click” consiste na junção pequenas moléculas de forma rápida, barata, eficiente e verde.

Essas reações devem atender a uma série de critérios para receberem tal classificação, tais como: apresentarem altos rendimentos, serem reações modulares, serem estereoespecíficas e fornecer subprodutos inofensivos que possam ser removidos através de métodos de cromatográficos (cristalização ou destilação). No que tange aos

procedimentos reacionais também é importante atentar-se a algumas características, como por exemplo, utilizar condições reacionais simples, isto é, os reagentes não devem ser reativos ao oxigênio e a água, usar solventes não tóxicos ou não utilizar solventes (reações a seco). Além disso, o produto dever ser estável em condições fisiológicas (KOLB *et al.*, 2001).

Dentre as reações que são classificadas como “click” a reação de cicloadição 1,3-dipolar para formação do 1,2,3-triazóis é bastante descrita na literatura, devido à grande aplicabilidade deste heterociclo na química medicinal e na síntese orgânica (FREITAS *et al.*, 2011). Neste tipo de reação, o Cu(I) desempenha um papel muito importante, uma vez que, estudos mostraram que ao utilizar o cobre como catalisador a reação era acelerada de forma significativa, isto é, com um aumento na taxa de velocidade na ordem de 7 vezes. Além do mais, nestas condições, o regioisômero 1,4-dissubstituído é formado de forma exclusiva (HUISGEN; SZEIMIES; MÖBIUS, 1967).

No que se refere ao mecanismo reacional, Hein e Fokin (2010) (**Esquema 1**) observaram que na presença de Cu(I) ocorre primariamente à formação do acetileto do metal que se complexa também ao nitrogênio nucleofílico da azida, favorecendo assim o ataque do carbono do tipo β -vinilidênico do acetileto de Cu(I) ao nitrogênio eletrofílico terminal da azida, resultando na formação da primeira ligação do tipo C-N e obtenção do metalaciclo instável. Posteriormente, a contração do anel leva formação da triazolila de cobre, que logo em seguida sofre protonólise gerando o 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído.

Esquema 1 - Mecanismo reacional da reação do tipo “click” alcino-azida

Fonte: Adaptado de Hein e Fokin (2010).

Diante do exposto, fica evidente a necessidade de desenvolvimento de novos inibidores seletivos do domínio cECA. Foi isto que este trabalho se propôs a fazer a partir da síntese, caracterização e estudos *in silico* e *in vitro* de novas oxadiazolinonas ligadas a um resíduo de triptofano via “click” chemistry.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver novos derivados de 1,2,4-oxadiazolin-5-onas como candidatos a fármacos anti-hipertensivos como prováveis inibidores da ECA (enzima conversora da angiotensina) e avaliar *in vitro* e *in sílico* seus potenciais de inibição.

2.2 Específico

- Sintetizar novos derivados das 1,2,4-oxadiazolidin-5-onas
- Funcionalizar as 1,2,4-oxadiazolin-5-onas sintetizadas através da reação de cicloadição 1,3-dipolar entre alcinos terminais e azidas.
- Amidificar os compostos resultantes da funcionalização via cicloadição com o éster metílico do triptofano.
- Avaliar *in sílico* as interações alvo-ligante através de simulações de *docking* molecular.
- Realizar testes *in vitro* para verificar o potencial de inibição dos compostos sintetizados na ECA

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

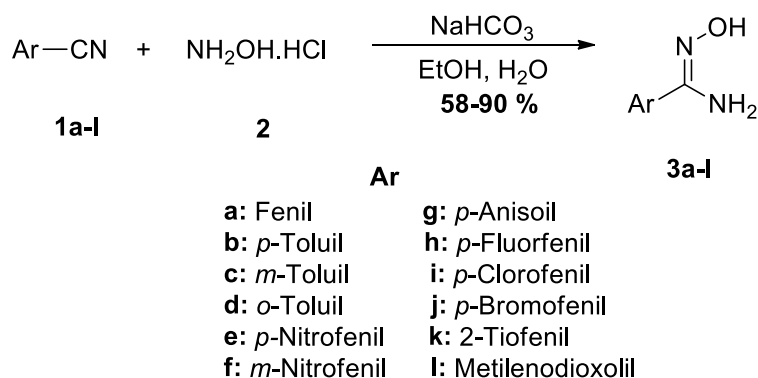
3.1 Síntese dos candidatos a inibidores da ECA

Foram sintetizados 12 substâncias finais inéditas (**11a-l**), que foram submetidas à análises *in vitro* (ensaio colorimétrico) e *in silico* (simulações de *docking* molecular) com intuito de investigar o possível potencial de inibição dos compostos diante da ECA. Esses resultados serão mostrados e discutidos a seguir.

3.1.1 Síntese das aril-amidoximas

O preparo da série (**11a-l**) teve início com a síntese de 12 arilamidoximas. Para isso, utilizou-se a metodologia de Mayer *et al.*, 2021, a qual é derivada das metodologias empregadas no trabalho de Srivastava *et al.*, 2009 e Srivastava *et al.* 1997, as quais descrevem a síntese como uma reação clássica entre nitrilas aromáticas e o cloridrato de hidroxilamina em meio básico (Esquema 2).

Esquema 2 - Síntese das amidoximas aromáticas



Fonte: A autora (2023)

Essa reação ocorre por meio do ataque nucleofílico do par de elétrons não-ligante do átomo de nitrogênio da hidroxilamina ao carbono do grupamento nitrila. Em meio prótico há a redução da densidade eletrônica sobre o átomo de carbono da nitrila, facilitando assim o ataque nucleofílico (VÖRÖS *et al.*, 2014).

Os produtos (**3a-l**) obtidos a partir desta reação apresentaram rendimentos entre 58-90% e os pontos de fusão foram obtidos e comparados com a literatura, como é possível observar na **tabela 1**.

Tabela 1 - Dados experimentais dos compostos (3a-l)

Substância	Rendimento (%)	P.F.(°C)	P.F.lit.(°C)	Solvente de recristalização
3a	81	65-68	67-68 ^d	Clorofórmio/Hexano
3b	74	137-140	140 ^a	Clorofórmio/Hexano
3c	90	82-85	87-90 ^a	Clorofórmio/Hexano
3d	72	122-125	135-137 ^a	Clorofórmio/Hexano
3e	58	170-173	174-176	Clorofórmio/Hexano
3f	88	162-165	173-175 ^b	Clorofórmio/Hexano
3g	79	175-178	123-124 ^c	Clorofórmio/Hexano
3h	67	92-95	98-99 ^d	Clorofórmio/Hexano
3i	68	128-131	133 ^e	Clorofórmio/Hexano
3j	80	136-139	140-141 ^a	Clorofórmio/Hexano
3k	70	88-91	88-90 ^e	Clorofórmio/Hexano
3l	71	165-168	163-165 ^f	Clorofórmio/Hexano

a = (VICENTE; FREITAS FILHO; FREITAS, 2016); b = (WANG *et al.*, 2015); c = (JI *et al.*, 2018); d = (LA MOTTA *et al.*, 2008); e = (CAI *et al.*, 2015); f = (KORYAKOVA *et al.*, 2008).

Fonte: A autora (2023)

Todos os compostos sintetizados passaram pelo processo de recristalização utilizando clorofórmio/hexano, uma vez que é comum ocorrer neste tipo de reação a formação da amida aromática como produto secundário (VÖRÖS *et al.*, 2014).

3.1.2 Síntese das 1,2,4-oxadiazolidin-5-onas

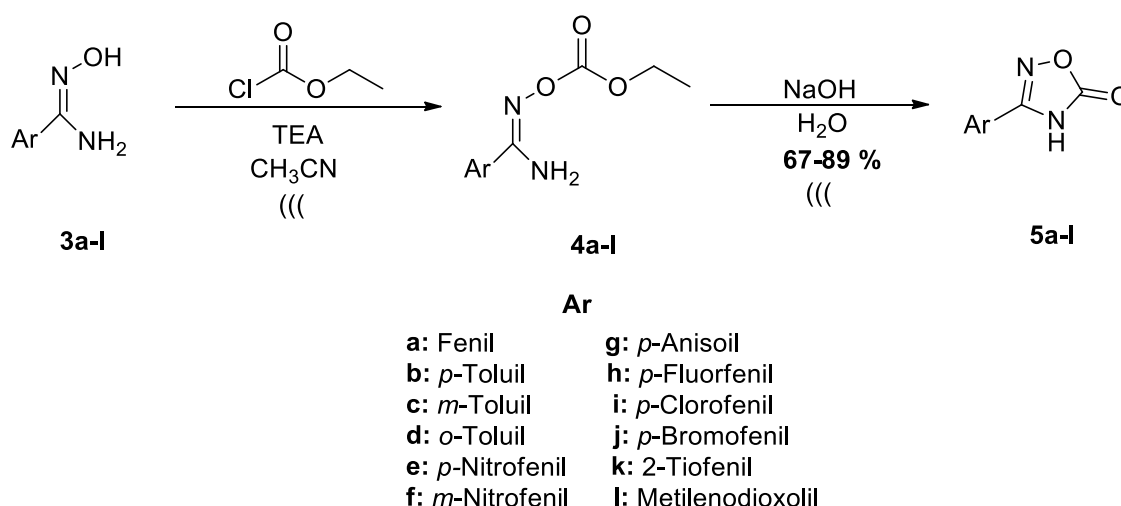
Normalmente as 1,2,4-oxadiazolidin-5-onas são sintetizadas via ciclização carbonilativa das aril-amidoximas utilizando para isso reagentes como: os carbonatos de alquila, cloroformatos, disfogênio e cloreto de pentafluorbenzoíla (INDRASENA *et al.*, 2017). Além disso, é descrito na literatura que os métodos de purificação para esses compostos são complicados e o tempo reacional varia entre 4 a 96 horas, dependendo da abordagem empregada (SETHI *et al.*, 2015).

De modo geral, os procedimentos metodológicos usados para o preparo das 1,2,4-oxadiazolidin-5-ona são bastante diversificados. Reichert *et al.* (2001) e Hussein (1987) partilham de metodologias similares, as quais descrevem a síntese em duas etapas desses compostos, utilizando como reagente de partida a aril-amidoxima em clorofórmio,

cloroformato de etila e trietilamina. Neste caso, a primeira etapa da reação é deixada sob agitação magnética em temperatura ambiente durante 1-2 dias. A ciclização das 1,2,4-oxadiazolin-5-ona (segunda etapa) é feita sob refluxo (6-8h) com uma solução de éster de carbonato em xileno. No estudo de SOLDATOVA *et al.*, 2021, observou-se condições reacionais semelhantes, diferenciando apenas os solventes usados na primeira etapa (diclorometano) e segunda etapa (Dimetilsulfóxido). Já no trabalho de Ono *et al.* (2011), é empregado acetona seca para solubilizar a aril-amidoximas, clorocarbonato de etila e uma solução de 5% de hidróxido sódio na primeira etapa. Essa mistura é deixada sob banho de gelo por uma hora, seguindo na agitação magnética até a formação do intermediário sintético. Na segunda etapa, tem-se a adição de hidróxido de sódio.

Embora partilhe de condições reacionais semelhantes, tais como: o uso do cloroformato de etila como reagente de carbonilação e da trietilamina como base. As 1,2,4-oxadiazolin-5-ona apresentadas neste trabalho foram preparadas de acordo com a metodologia desenvolvida pelo atual grupo de pesquisa do LASOM (Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal), a qual consiste em um método bastante promissor e inédito. Dessa forma, a sínteses dos compostos **5a-l** ocorreu em duas etapas sob banho ultrassônico a 50 °C, com duração total de duas horas (**Esquema 3**).

Esquema 3 - Síntese das 1,2,4-oxadiazolidin-5-onas

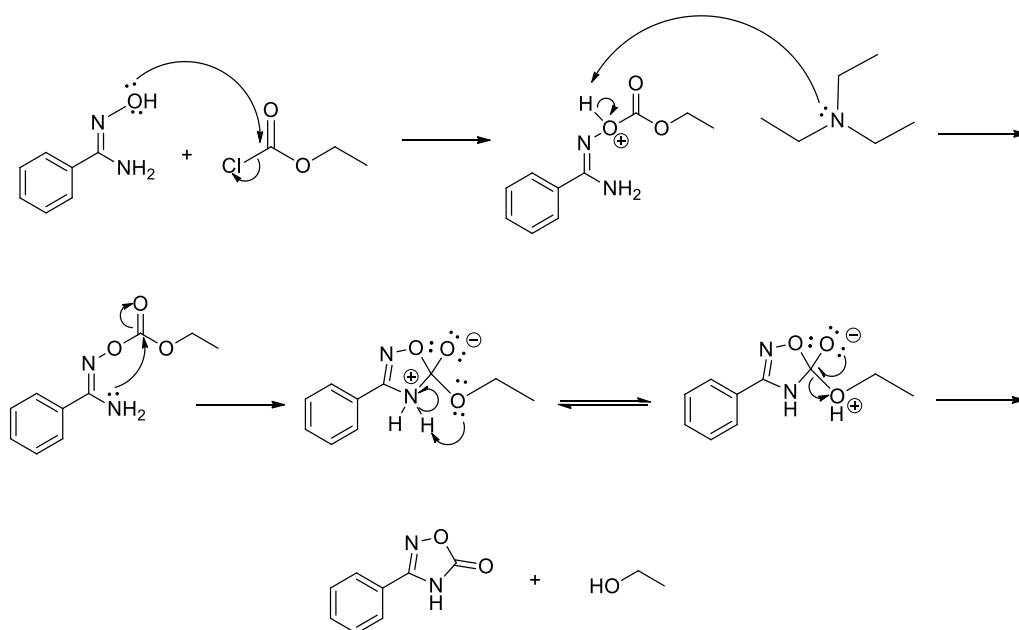


Fonte: A autora (2023)

Na primeira etapa, o par de elétrons não-ligante da hidroxila na amidoxima ataca a carbonila do cloroformato de etila resultando na formação do intermediário reacional (**4a-l**)

que não foi isolado (**Esquema 4**). Posteriormente, o meio reacional foi levado ao rota-evaporador para retirar toda a acetonitrila, para dar início à segunda etapa. Nesta segunda etapa, ocorre uma reação intermolecular de ciclização, isto é, o par de elétrons não-ligante do grupamento amina ataca a carbonila liberando uma molécula de etanol e formando o produto desejado (**5a-l**).

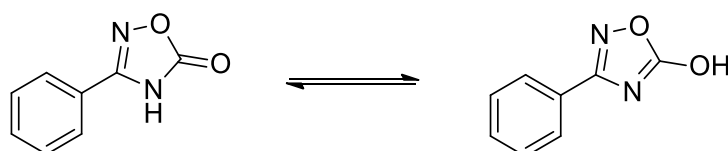
Esquema 4 - Mecanismo proposto para formação das 1,2,4-oxadiazolidin-5-onas.



Fonte: A autora (2023)

A 1,2,4-oxadiazolidin-5-ona apresenta um equilíbrio tautomérico com a forma 5-hidróxi-1,2,4-oxadiazol: isso ocorre devido à acidez do próton ligado originalmente ao nitrogênio *N*-3 do anel do heterociclo, que migra para o oxigênio do grupo carbonila, formando o derivado 5-hidróxi-substituído (**Esquema 5**).

Esquema 5 - Equilíbrio tautomérico nas 1,2,4-oxadiazolidin-5-onas



Fonte: A autora (2023)

De acordo com Shabanian *et al.* 2012 a estabilidade dos tautômeros está relacionado

tanto à natureza dos substituintes quanto ao solvente utilizado. Substituintes doadores de elétrons e solvente polares favorecem a formação da 1,2,4-oxadiazolidin-5-ona. No estado sólido e em clorofórmio, verifica-se também a predominância da 1,2,4-oxadiazolidin-5-ona. Além disso, ao utilizar solvente com alta constante dielétrica a forma cetona é favorecida (CLAPP, 1976).

As 1,2,4-oxadiazolidin-5-onas sintetizadas apresentaram uma faixa de rendimento entre 67-89 % e seus pontos de fusão foram obtidos e comparados com a literatura, como é possível observar na **tabela 2**.

Tabela 2 - Dados experimentais dos compostos (**5a-l**)

Substância	Rendimento (%)	P.F.(°C)	P.F.lit.(°C)	Solvente de recristalização
5a	67	202-205	202 ^c	Clorofórmio/Hexano
5b	85	185-188	206-208 ^b	Clorofórmio/Hexano
5c	83	139-142	147 ^b	Clorofórmio/Hexano
5d	79	150-153	156 ^d	Clorofórmio/Hexano
5e	83	178-181	273 ^d	Clorofórmio/Hexano
5f	89	180-183	140-141 ^a	Clorofórmio/Hexano
5g	79	200-203	209-211 ^a	Clorofórmio/Hexano
5h	81	218-221	228-229 ^a	Clorofórmio/Hexano
5i	80	273-275	280-282 ^a	Clorofórmio/Hexano
5j	78	290-293	291-293 ^a	Clorofórmio/Hexano
5k	85	187-190	Não relatado	Clorofórmio/Hexano
5l	88	125-128	Não relatado	Clorofórmio/Hexano

a = (STRELNKOVA *et al.*, 2018); b = (TABELI *et al.*, 1982); c = (SHEVTSOVA *et al.*, 2007); d = (HUSSEIN *et al.*, 1987).

Fonte: A autora (2023)

3.1.3 Síntese das 3-aryl-4-(propinil)-1,2,4-oxadiazolidin-5-onas

A série (**7a-l**) foi preparada por meio da reação de alquilação das 1,2,4-oxadiazolin-5-onas com brometo de propargila em meio básico (**Esquema 6**). Todavia, para realizar a funcionalização desses compostos, alguns testes foram feitos para determinar a estratégia sintética mais adequada. Dessa forma, fez-se uma série de ensaios utilizando diferentes solventes, bases e agentes alquilantes (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Condições sintéticas testadas para funcionalização das 1,2,4-oxadiazolidin-5-onas

Entrada	Reagente	Base	Solvente	Condições	Rendimento
1	Bromo acetato de etila	TEA	Acetona	t.a.	-----
2	Bromo acetato de etila	K ₂ CO ₃	DMF	t.a.	-----
3	Bromo acetato de etila	C ₄ H ₉ KO	DMF	t.a.	-----
4	Bromo acetato de etila	CaH ₂	DMF	t.a.	-----
5	Bromo acetato de etila	NaH	DMF	t.a.	-----
6	Brometo de propargila	K ₂ CO ₃	DMF	t.a.	88%

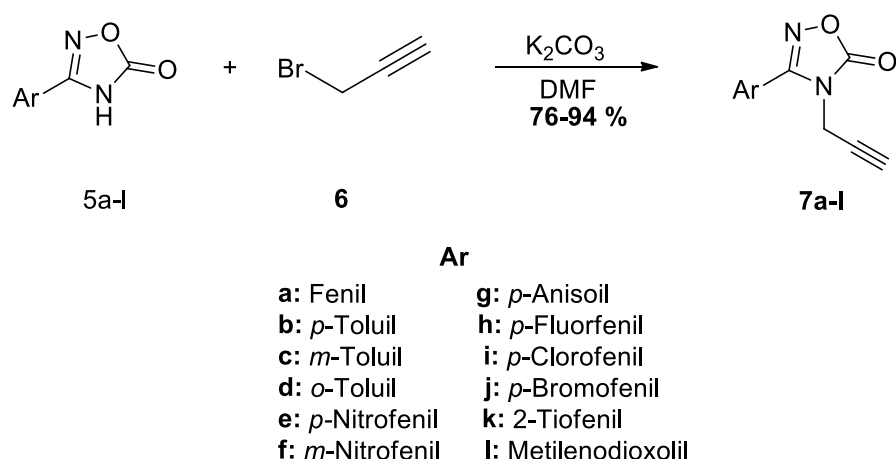
Fonte: A autora (2023)

Algumas condições reacionais foram testadas para realização de N-alkilação como é possível observar na **tabela 3**. Contudo, dentre as condições testadas, a única estratégia que obteve resultados, isto é, a que levou à formação do produto desejado (**7a-l**) após 24 horas foi a aquela na qual foi utilizado o brometo de propargila como agente alquilante, carbonato de potássio como base e dimetilformamida como solvente (**Esquema 6**). Nas demais estratégias ou o produto não era formado ou eram gerados muitos subprodutos, tornando difícil a separação. Ao consultar a literatura, constatou-se que tanto a condição que obteve o melhor desempenho quanto as demais testadas (**tabela 3**) ainda não foram descritas na literatura. O que acaba dificultando a compreensão dos resultados observados, pois não é possível fazer uma analogia comparativa entre tais condições.

Dentre as poucas reações de alquilação envolvendo as 1,2,4-oxadiazolidin-5-onas descritas na literatura, destaca-se os trabalhos Ono *et al.* (2011) e Xu *et al.* (1998) que partilham das mesmas condições reacionais. Neste caso, a síntese é feita em duas etapas, o que acaba diferenciando um pouco do procedimento reacional empregado neste trabalho. Dessa forma, utilizou-se uma solução de hidróxido de potássio (KOH) na primeira etapa. Já na segunda foi usado dimetilformamida (DMF) como solvente, hidróxido de sódio como

base e 1,2-dibromoetano como agente alquilante. Nestas condições, a reação teve duração de três dias e os redimentos foram quantificados na faixa de 49.1-50%. Por sua vez, Okamoto, Ohe e Shimbayashi (2014) realizaram reação de arilação com as 1,2,4-oxadiazolin-5-onas, utilizando brometo de fenacilo como agente alquilante, acetona e K_2CO_3 como base. A reação foi posta sob agitação e teve duração de 12 horas. Os compostos sintetizados apresentaram rendimento na faixa de 50-99 %.

Esquema 6 - Síntese das 3-aryl-4-(propinil)-1,2,4-oxadiazolidin-5-onas



Fonte: A autora (2023)

A reação de alquilação com brometo de propargila resultou em 12 produtos (**7a-l**) inéditos, cujos rendimentos e pontos de fusão estão mostrados na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Dados experimentais dos compostos (**7a-l**)

Substância	Rendimento (%)	P.F.(°C)	Solvente de recristalização
7a	88	60-63	Clorofórmio/Hexano
7b	85	68-71	Clorofórmio/Hexano
7c	89	78-81	Clorofórmio/Hexano
7d	86	62-65	Clorofórmio/Hexano
7e	90	133-136	Clorofórmio/Hexano
7f	87	95-98	Clorofórmio/Hexano
7g	93	69-72	Clorofórmio/Hexano
7h	94	65-66	Clorofórmio/Hexano
7i	85	70-73	Clorofórmio/Hexano

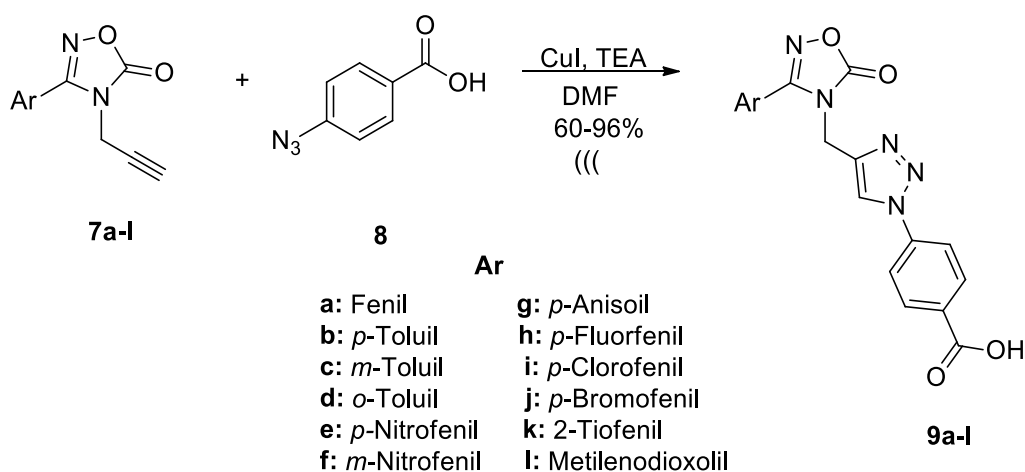
7j	88	92-94	Clorofórmio/Hexano
7k	76	70-73	Clorofórmio/Hexano
7l	81	102-105	Clorofórmio/Hexano

Fonte: A autora (2023)

3.1.4 Reação tipo “click” alcino-azida entre as 3-aryl-4-(propinil)-1,2,4-oxadiazolidin-5-onas e o ácido 4-azidobenzóico

A reação do tipo “click” também conhecida como CuAAC, consiste na cicloadição 1,3-dipolar entre um alcino terminal e uma azida orgânica catalisada por cobre, com formação regioespecífica de 1,2,3-triazóis-1,4-disubstituídos. Por meio dessa reação é possível conectar covalentemente duas moléculas contendo vários grupos funcionais de forma simples e com altos rendimentos (FREITAS *et al.*, 2011). Seguindo esta metodologia, foram sintetizados 12 compostos (**9a-l**) utilizando a metodologia de Silva *et al.* (2012). Contudo, algumas modificações foram adotadas, uma vez que a reação entre ácido 4-azidobenzóico e o alcino ocorreu em banho ultrassônico usando CuI em meio básico, usando dimetilformamida como solvente (**Esquema 7**).

Esquema 7 - Reação do tipo “click” alcino-azida



Fonte: A autora (2023)

Os 12 produtos obtidos por meio desta reação apresentaram rendimentos entre 56-96% e seus respectivos pontos de fusão encontram-se na **Tabela 5**. É importante frisar que esses compostos são inéditos, logo, não foi possível comparar esses valores com dados

experimentais presentes na literatura.

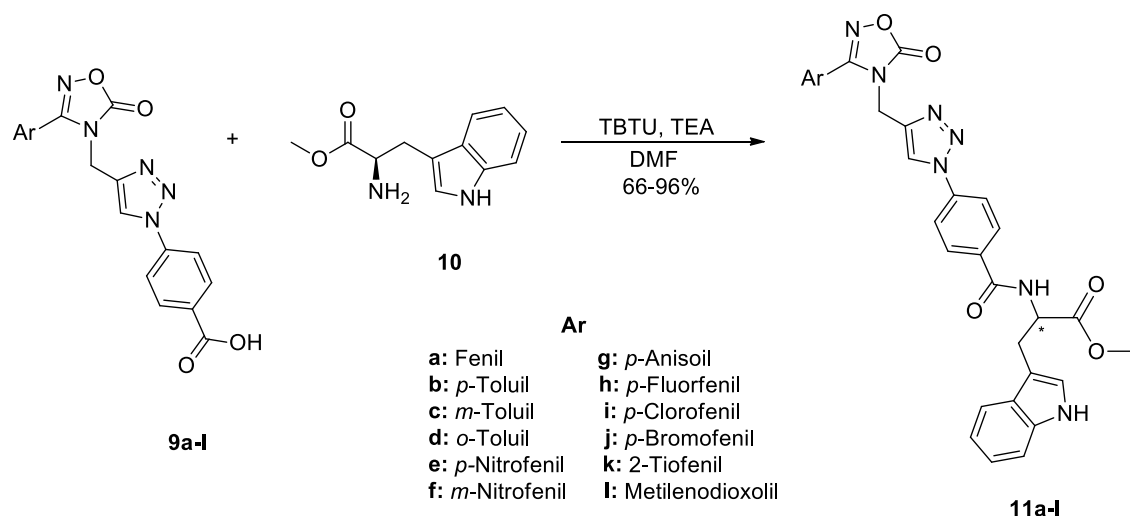
Tabela 5 - Dados experimentais dos compostos (**9a-l**)

Composto	Rendimento (%)	P.F. (°C)	Solvente de recristalização
9a	92	225-227	Diclorometano
9b	56	230-233	Diclorometano
9c	81	220-223	Diclorometano
9d	89	225-228	Diclorometano
9e	60	207-210	Diclorometano
9f	73	211-214	Diclorometano
9g	90	210-213	Diclorometano
9h	91	335-338	Diclorometano
9i	96	333-335	Diclorometano
9j	90	228-231	Diclorometano
9k	75	312-315	Diclorometano
9l	82	318-321	Diclorometano

Fonte: A autora (2023)

3.1.5 Reação de Amidificação entre o éster metílico do L-triptofano e os derivados ácidos triazólicos das 1,2,4-oxadiazolidin-5-onas

A reação de amidificação entre o éster do triptofano (**10**) e os derivados triazólicos (**9a-l**) foi realizada em temperatura ambiente, utilizando para isso trietilamina como base, dimetilformamida (seca e destilada) como solvente e tetrafluoroborato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (TBTU) como agente ativador de carbonila, resultando na formação de 12 compostos inéditos (**Esquema 8**). Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna de sílica gel e foram isolados em rendimentos que variaram entre 66 e 96% (**Tabela 6**).

Esquema 8 - Formação das amidas derivadas de Oxadiazolinonas

Fonte: A autora (2023)

Tabela 6 - Dados experimentais dos compostos (**11a-l**)

Substância	Rendimento (%)	P.F. (°C)
11a	90	93-95
11b	96	165-168
11c	77	107-110
11d	96	100-103
11e	90	115-117
11f	66	123-125
11g	87	120-123
11h	70	175-178
11i	88	165-168
11j	74	135-138
11k	91	89-92
11l	80	130-133

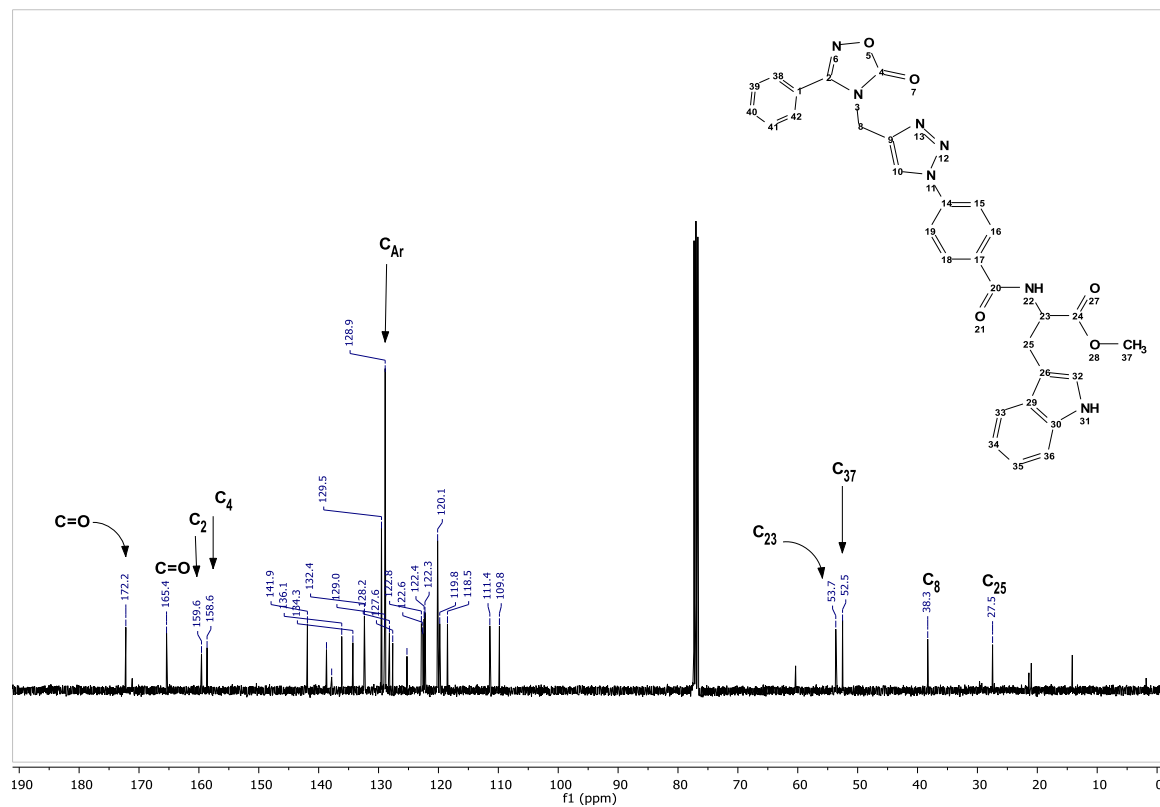
Fonte: A autora (2023)

Para todos os compostos sintetizados nesta série, fez-se a caracterização via RMN de ^1H e de ^{13}C . No entanto, será discutido aqui no texto apenas o espectro pertinente ao canônico (sem grupos substituintes no anel), pois a analogia aplicada a esse espectro pode ser extrapolada para os demais compostos, cujos espectros estão disponíveis no apêndice A.

Ao analisar o espectro do composto **11a** (**figura 11**), verifica-se a presença de dois duplo dupletos em 3,34 ppm e 3,40 ppm, referentes aos dois hidrogênios ligados ao carbono

metilênico de cadeia alifática próximo ao anel do triptofano. O primeiro possui duas constantes de acoplamento, 12,8 Hz e 7,2 Hz. Já para o segundo sinal esses valores foram de 12,8 Hz e 5,2 Hz. Esse sinal é diastereotópico, uma vez que está próximo ao centro assimétrico originário do (S)-triptofano. Por este motivo, os dois hidrogênios, por mais que estejam ligados ao mesmo carbono, possuem deslocamentos químicos distintos. A constante de acoplamento igual a 12,8 Hz é geminal, ou seja, é referente ao acoplamento 2J entre os dois hidrogênios do carbono metilênico. Já as outras duas constantes, 7,2 e 5,2 Hz, são referentes ao acoplamento de cada um destes hidrogênios com o hidrogênio do centro assimétrico vizinho, ou seja, são dois dupletos. Entre 3,66 e 4,88 ppm, observa-se dois simpletos, sendo o primeiro referente aos hidrogênios da metila do grupamento éster, com integração para três hidrogênios; e o segundo correspondente aos hidrogênios do grupo metileno próximo ao anel do triazol. Em 5,06 ppm temos um duplo-duplo-dupletto (ddd) com integração para um hidrogênio e constantes de acoplamento de 7,2 Hz, 5,2 Hz e 2,8 Hz, referente ao hidrogênio do carbono alifático (CH) adjacente ao grupamento amida, ou seja, o hidrogênio do centro quiral. Os acoplamentos 7,2 e 5,2 Hz são referentes à interação com os hidrogênios vizinhos diastereotópicos. Já o acoplamento 2,8 Hz vem da interação com o hidrogênio ligado ao nitrogênio da amida que, provavelmente está em um ângulo diedro próximo a 90° , devido ao baixo valor da constante. Dois duplos dupletos (dd) foram identificados entre 6,98 ppm e 7,08 ppm, com constantes de acoplamento iguais, 8,0 Hz e 1,1 Hz, ou seja, um acoplamento em *orto* e outro em *meta*. Tal região corresponde a dois hidrogênios aromáticos da porção do triptofano (H_{39} e H_{40}). No intervalo de 7,56 -7,48 ppm tem-se um multipletto, com integração para três hidrogênios do anel aromático (H_1 , H_3 e H_2). Em 7,80 ppm, verificou-se um duplo dupletto (dd) com constante de acoplamento de 8,0 Hz e 2,1 Hz, correspondendo aos hidrogênios H_4 e H_6 do anel fenila. Na região de 7,26 ppm e 7,45 ppm, identificou-se dois dupletos (d) com constante de acoplamento de 8,1 Hz. Esses sinais foram associados aos H_{38} e H_{41} do anel aromático. Os demais sinais referentes aos hidrogênios aromáticos foram observados na região de 7,59-7,69 ppm na forma de dois dupletos (d). Neste caso, cada dupletto com integração para dois hidrogênios e a constante de acoplamento de ambos foi de 8,6 Hz. Tais sinais, foram associados aos hidrogênios na posição H_{20} - H_{24} e H_{21} - H_{23} . Ademais, observou-se na região de 8,15 ppm um simpleto, com integração para um hidrogênio correspondente ao único átomo de hidrogênio do anel triazol. Por fim, verifica-se a presença de um simpleto alargado na região de 8,44 ppm, que pode ser associado ao hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio do grupamento amida.

Figura 12 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de **11a**.

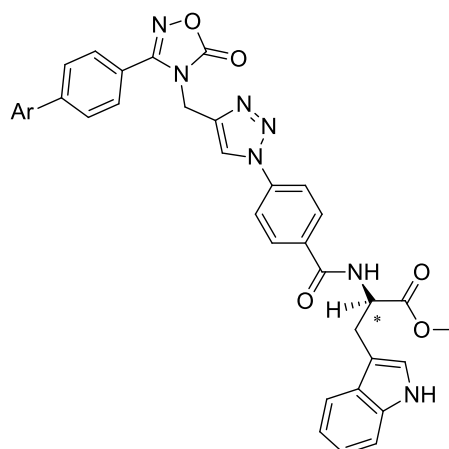


Fonte: A autora (2023)

3.2 Polarimetria

Estruturalmente as substâncias sintetizadas (**11a-l**) possuem um centro quiral, ou seja, um carbono assimétrico (**Figura 12**).

Figura 13 - Estrutura das substâncias **11a-l**



Fonte: A autora (2023)

Diante disso, fez-se necessário realizar o ensaio de polarimetria, que é quando um feixe de luz plano-polarizada é aplicado sob uma solução contendo uma substância opticamente ativa, sendo observado um ângulo de rotação. Por sua vez, cada enantiômero gira o plano polarizado em uma mesma proporção, mas em sentidos opostos. Quando a rotação ocorre no sentido horário (+), a substância é denominada de dextrorrotatória e no sentido anti-horário (-) chama-se de levorrotatória.

Desse modo, a atividade óptica das substâncias (**11a-l**) foi determinada em um polarímetro JASCO - *Modelo*: P-2000, utilizando uma solução 10% (m/v) de cada amostra e uma célula de um decímetro. Feitas as leituras, aplicou-se a seguinte equação para estimar a rotação específica:

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{a}{c \times l}$$

Onde, **a** refere-se à rotação observada, **c** para concentração (m/v) e **l** a espessura da célula. Os valores referentes a rotação específica para cada substância foram descritos na **tabela 7**.

Tabela 7 - Valores de rotação específica para série **11a-l**

Substância	Dextrógira	Levógira
11a		-33,3
11b		-33,3
11c		-34,0
11d		- 34,7
11e		- 32,6
11f		-33,3
11g		-36, 3
11h		- 35,0
11i		- 35,8
11j		- 34,1
11k		- 34,7
11l	+ 37,5	

Fonte: A autora (2023)

Verificou-se que praticamente todas as substâncias desviaram a luz plano-polarizada

no sentido horário (+), sendo classificadas como dextrógiras. Enquanto apenas a substância **111** apresentou desvio no sentido anti-horário (-), podendo ser denominada como levógiras. É importante frisar que os valores em graus, no qual o plano de polarização é desviado depende da quantidade de moléculas quirais presentes na solução. Logo, a concentração da substância usada e o comprimento da célula vão interferir de forma direta no desvio observado.

Visto que as substâncias testadas são ineditas, desse modo não foi possível comparar os valores de rotação específica obtidos com os dados da literatura. Contudo, o centro assimétrico do éster metílico do triptofano não foi alterado no processo sintético, uma vez que, na última etapa, os derivados de oxadiazolinona reagiram com o éster metílico do L-triptofano. Este éster, em um trabalho publicado por Airiau *et al.* (2008) utilizando as mesmas condições experimentais no ensaio de polarimetria (solvente, tamanho de célula e concentração) apresentou um valor de leitura de aproximadamente $[\alpha]_D^{25} = +16,9$. Em vista disso, fez-se dois ensaios com as mesmas condições experimentais descritas por Airiau *et al.* (2008) para avaliar a integridade química do éster metílico do triptofano e do L-triptofano utilizados nas reações. Os valores obtidos para os ensaios de polarimetria ficaram dentro do padrão desejado, ou seja, para o éster metílico do triptofano verificou-se uma leitura de $[\alpha]_D^{25} = +16,9$. Já para o L-triptofano foi de $[\alpha]_D^{25} = -31,3$.

3.3 Docking molecular

O estudo *in silico* foi realizado com intuito de investigar os modos de ligação dos compostos sintetizados perante a ECA, possibilitando obter informações que pudessem nortear o desenvolvimento de novos fármacos. Além disso, podem ser avaliados quais grupos funcionais são relevantes para a manutenção da atividade inibitória.

A enzima conversora da angiotensina possui duas isoformas em seres vivos, as quais são denominadas como: ECA somática (sECA) e ECA testicular (tECA). Além disso, os domínios homólogos que constituem essa enzima (nECA e cECA) possuem estruturas tridimensionais semelhantes. Contudo, o perfil farmacológico e a especificidade dos ligantes são distintos. Uma consequência disso é a falta de seletividade dos inibidores da ECA, principal causa dos efeitos adversos. O uso de fármacos não seletivos provoca um acúmulo gradual da bradicinina no organismo dos pacientes. Como já elucidado, a bradicinina é um nonapeptídeo envolvido no sistema da cininas plasmáticas, sendo conhecida como mediadora de processos inflamatórios. Dentre suas funções fisiológicas, destaca-se: a ação pro-inflamatória, vasodilatação, o aumento da permeabilidade, as alterações celulares e a síntese de

prostaglandinas, as quais são tidas como responsáveis pelo aumento da inflamação em tecidos e o desenvolvimento dos sinais cardinais da inflamação (JUNIOR; PORTELLA JUNIOR; COHEN, 2016). Dessa forma, optou-se por utilizar neste ensaio uma estrutura específica para o domínio cECA, uma vez que estudos apontam que a hidrólise da angiotensina I depende exclusivamente desse domínio (FUCHS, *et al.*, 2008).

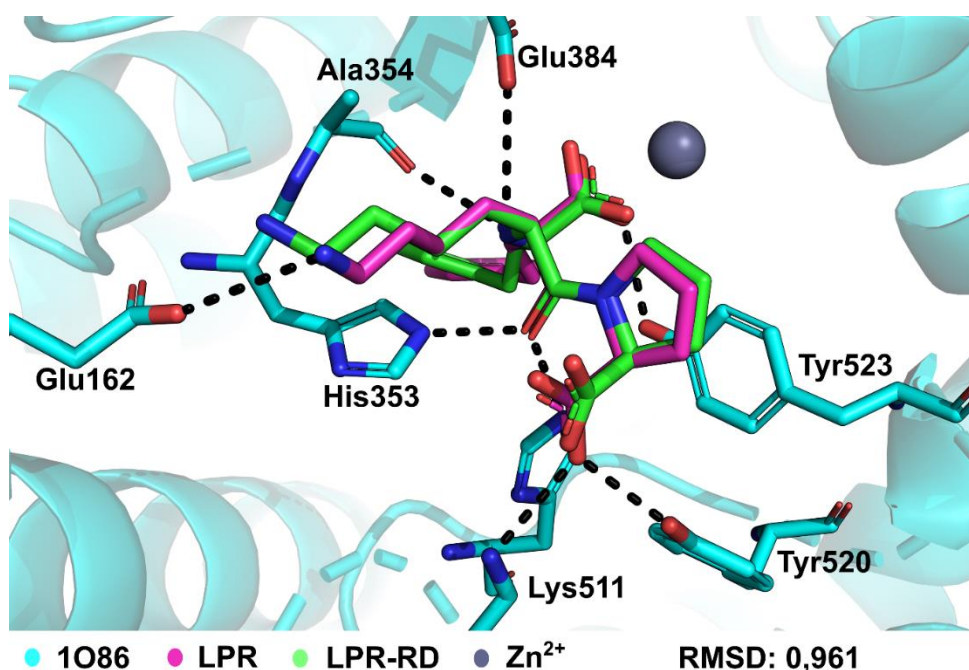
Com base nestas considerações, a simulação teve início com a escolha da estrutura cristalográfica no banco de dados PDB, cujo código de identificação é o 1O86 (seletiva para o domínio cECA). Essa estrutura é constituída pela enzima conversora da angiotensina humana em complexo com o inibidor co-cristalizado lisonopril. Feita seleção da estrutura, deu-se início à simulação do *redocking*, com intuito de validar o método escolhido para triagem dos novos candidatos a inibidores. Contudo, a simulação de *docking* molecular para ECA é bastante complexa devido à grande dimensão dos sítios de ligação (nECA e cECA) e à forma da enzima. Logo, para reproduzir experimentos de encaixe com soluções de ancoragem coerentes é necessário aplicar algumas restrições que considerem as principais ligações de hidrogênio. Essas restrições garantem que todas as ligações de hidrogênio que são tidas como essenciais para atividade sejam encontradas durante o processo de encaixe (CABALLERO, 2020). Neste caso, foram aplicadas duas restrições direcionadas aos átomos de nitrogênio (3826 e 2552) dos resíduos His³⁵³ e His⁵¹³. Assim, o software (GOLD Suite) pôde reconhecer que a interação de um grupo polar com o íon de zinco era importante para realizar poses de encaixe bem sucedidas. Normalmente, os programas de ancoragem como o GOLD Suite não recriam eficientemente a pose nativa de inibidores da ECA no sítio de ligação sem o uso das restrições de ancoragem, pois esses softwares utilizam uma aproximação generalizada para representar a interação de quelatação (metal/ligante), que é baseada em um modelo de interação pré-calculado entre o metal e sua espécie quelante. Essa aproximação não considera o ambiente eletrostático característico de cada metal dentro de cada proteína, resultando uma representação simplista e sujeita a incoerências, principalmente quando o ligante possui mais de uma região que possibilite a formação de uma ligação metálica (FIENBERG *et al.*, 2017).

Desse modo, o uso de restrições de ancoragem passou a ser uma estratégia comumente utilizada por pesquisadores para o desenho de novos fármacos. Um exemplo disso é o trabalho de Fienberg *et al.* (2017), que modelaram uma série usando três condições de restrição diferentes para encontrar poses de encaixe plausíveis. Tais condições incluíam limitações posicionais: quando o ligante encaixado deveria colocar um átomo de carbono ou nitrogênio em uma esfera de raio de 1 Å; a quelatação do metal (entre o átomo de zinco e um ácido carboxílico); e restrições de ligação de hidrogênio (entre os Lys489/511 e Gln259/281

do domínio nECA/cECA e um acceptor de ligação H do grupo biciclos no ligante).

Finalizada a simulação de *redocking* com as condições já mencionadas, constatou-se que o valor obtido para o desvio médio quadrático (Root Mean Square Deviation, RMSD) foi de 0,961 Å (**Figura 14**), estando dentro dos parâmetros desejados para validação do método, uma vez que, valores superiores a 2 Å assinalam que houve algum tipo de falha de encaixe durante a simulação.

Figura 14 - *Redocking* do ligante cristalográfico lisinopril na estrutura da ECA para validação do método. (Código PDB: 1O86). Em rosa, tem-se a conformação do ligante cristalográfico LPR. No verde, observa-se o ligante cocrystalizado LPR após o RD. E em cinza é ilustrado o átomo de zinco (Zn^{2+}).



Fonte: A autora (2023)

Como a ECA possui dois domínios (cECA e nECA) possui dois domínios homólogos bastante semelhantes (SOUBRIER *et al.*, 1988). Um estudo detalhado das estruturas cristalográficas desses domínios possibilitou identificar quais interações eram diferenciais e específicas para seletividade dos inibidores (CABALLERO, 2020).

De acordo com Fienberg *et al.*, (2017), a maioria dos iECAs ligam-se à região catalítica dos sítios ativos em ambos os domínios através de uma interação de quelação com o zinco metálico e por intermédio de uma ligação de hidrogênio entre o ácido glutâmico catalítico e o nitrogênio da amida do inibidor. Além disso, verifica-se também interações

eletrostáticas e de hidrogênio entre o ácido carboxílico terminal e os três resíduos conservados no subsítio S₂, sendo Gln²⁵⁹, Lys⁴⁸⁹ e Tyr⁴⁹⁸ para o domínio nECA e Gln²⁸¹, Lys⁵¹¹ e Tyr⁵²⁰ no domínio cECA. Ademais, constatou-se que as interações lipofílicas entre grupos apolares e os subsítios apolares aumentam a potência do inibidor. Tais interações são favorecidas no domínio cECA uma vez que ele é mais lipofílico.

O estudo feito por Georgiadis *et al.*, (2004) mostrou que a seletividade dos inibidores pelo domínio cECA deve-se, principalmente, às interações específicas no subsítio S₂. Neste trabalho foi relatada a síntese do primeiro inibidor seletivo (RXPA380) em que observou-se que cinco dos doze resíduos que estão próximos à região do triptofano são diferentes no domínio nECA. Tais resíduos correspondem a Thr⁸⁵⁸, Glu⁹⁵², Val⁹⁵⁵, Val⁹⁵⁶ e Asp¹⁰²⁹. A principal distinção entre eles decorre da substituição da Val⁹⁵⁵, Val⁹⁵⁶ que são resíduos volumosos e hidrofóbicos no domínio cECA, por dois resíduos menores e polares, Ser³⁵⁷ e Thr³⁵⁸, no nECA. Além disto, verificou-se que tanto a presença do grupamento prolina quanto do triptofano na estrutura do RXPA330 contribuem de forma significativa para seletividade do domínio cECA, pois no domínio nECA estes grupamentos não são acomodados de forma efetiva, devido a interações não favoráveis entre a cadeia lateral do triptofano com os resíduos do domínio nECA.

Feita validação do método com a simulação de RD, pode-se prosseguir com estudo realizado o DM para os candidatos a inibidores (**11a-l**). Finalizado o ensaio, atentou-se inicialmente a dois parâmetros de análise, os quais foram pertinentes ao valor score e o número de ligações de hidrogênio. O *score* obtido no *redocking* para o ligante co-cristalizado lisinopril foi de 117,52 (**Tabela 7**). Já para os candidatos a inibidores (**11a-l**) observou-se valores um pouco inferiores ficando na faixa de 94,25 a 102,70 (**Tabela 7**). Em relação ao número de ligações de hidrogênio notou-se uma divergência um pouco mais significativa, pois o lisinopril realiza cerca de oito interações de hidrogênio, enquanto as substâncias sintetizadas fizeram respectivamente cinco interações (**11d**), duas interações (**11b**), três interações (**11g, 11h, 11i, 11j**), quatro interações (**11c, 11e, 11f, 11k e 11l**). Apenas o composto canônico (**11a**) apresentou uma única interação de hidrogênio (**Tabela 8**) (Apêndice B).

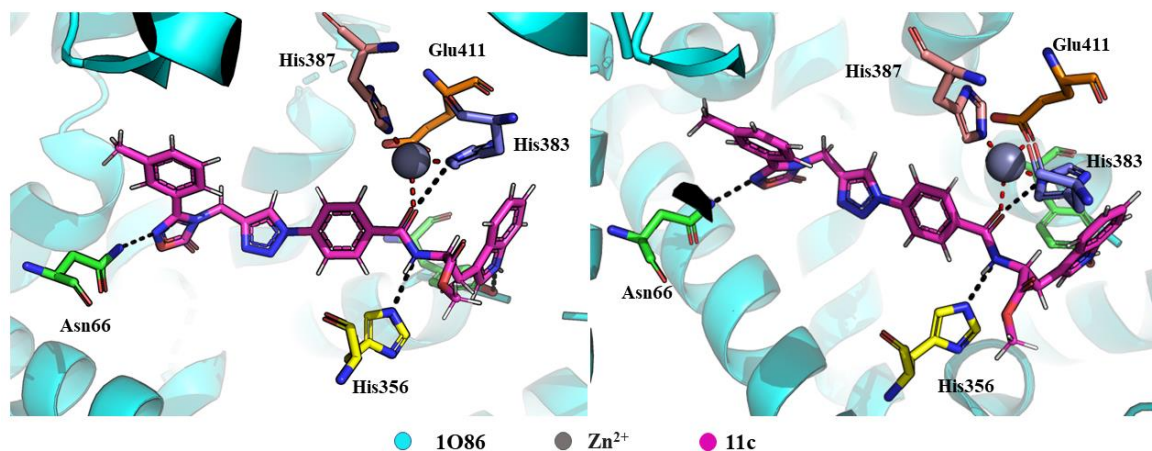
Tabela 8 - Dados experimentais obtidos no *docking* molecular para os compostos (**11a-l**)

1086		
Compostos	Score	Ligações de H
LPR	117,52	8,36
11a	94,67	1,44
11b	97,25	2,48
11c	96,79	4,00
11d	94,06	5,00
11e	100,32	4,73
11f	102,70	4,00
11g	97,52	3,00
11h	97,00	3,00
11i	96,95	3,00
11j	96,72	3,00
11k	95,58	4,00
11l	97,92	4,00

Fonte: A autora (2023)

Todos inibidores diferem quanto ao sítio de ligação no átomo de zinco catalítico, ou seja, o benazepril, o ramipril, o cilazapril, o enalapril e o lisinopril interagem por meio do grupamento carboxila, enquanto o captopril e o fosinopril através da sulfidril e da fosforila respectivamente (SOUZA, 2015). Os dados obtidos nesta simulação mostraram que boa parte dos compostos sintetizados (**11a**, **11c**, **11e**, **11f**, **11g**, **11h**, **11i**, **11k**, e **11l**) realizam interações com o zinco catalítico (Zn^{2+}) por meio do grupamento carboxila. Essa interação é tida como importante, pois a maioria dos iECAs liga-se à região catalítica dos sítios ativos por meio de uma interação de quelação com o zinco metálico. Ademais, verificou-se que o átomo de zinco interage com três resíduos de aminoácidos (His^{383} , Glu^{411} e His^{387}) (**Figura 15**). A interação desses resíduos de aminoácidos com o zinco também é observada no estudo *in silico* (*docking* molecular) feito com o lisinopril.

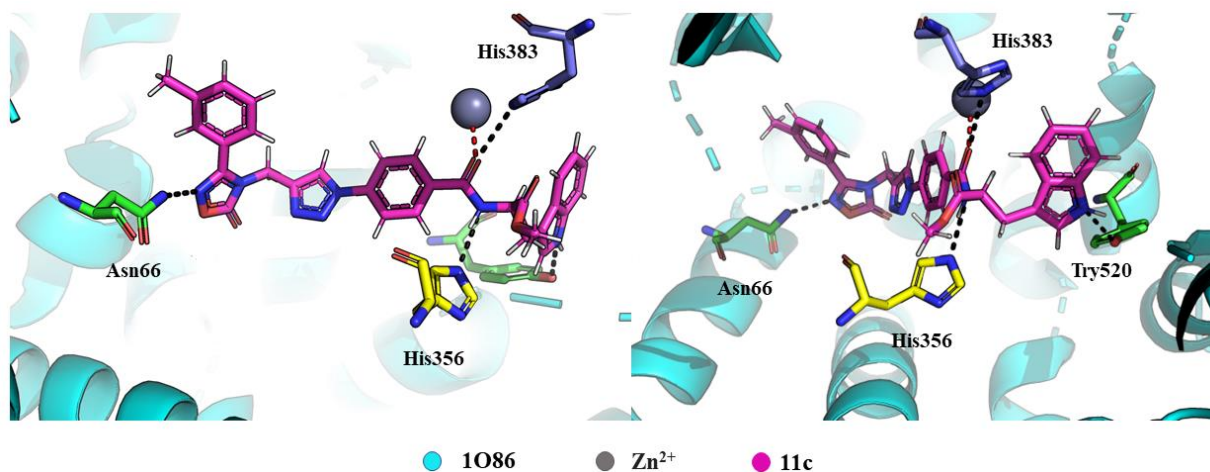
Figura 15 - Representação das interações intermoleculares da substâncias **11c** com o zinco.



Fonte: A autora (2023)

Em relação às ligações de hidrogênio, esperava-se uma interação entre o ácido glutâmico catalítico da enzima com o nitrogênio da amida do candidato a inibidor (**11c**). Contudo, não foi observado esse tipo de interação nos compostos sintetizados. Neste caso, a ligação de hidrogênio relatada ocorreu entre His³⁵³ e o nitrogênio do grupamento amida. Verificou-se também uma similaridade entre as ligações de hidrogênio, pois todos os compostos testados realizaram ao menos uma ligação de hidrogênio com quatro resíduos em específico (His³⁵³, His³⁸³, Asn⁶⁶ e Try⁵²⁰). Dessa forma, optou-se por utilizar o composto **11c** (**Figura 16**) para representar de modo geral as interações de hidrogênio para os demais compostos da série (**11a-l**).

Figura 16 - Interações de hidrogênio da substância **11c** com os resíduos da ECA

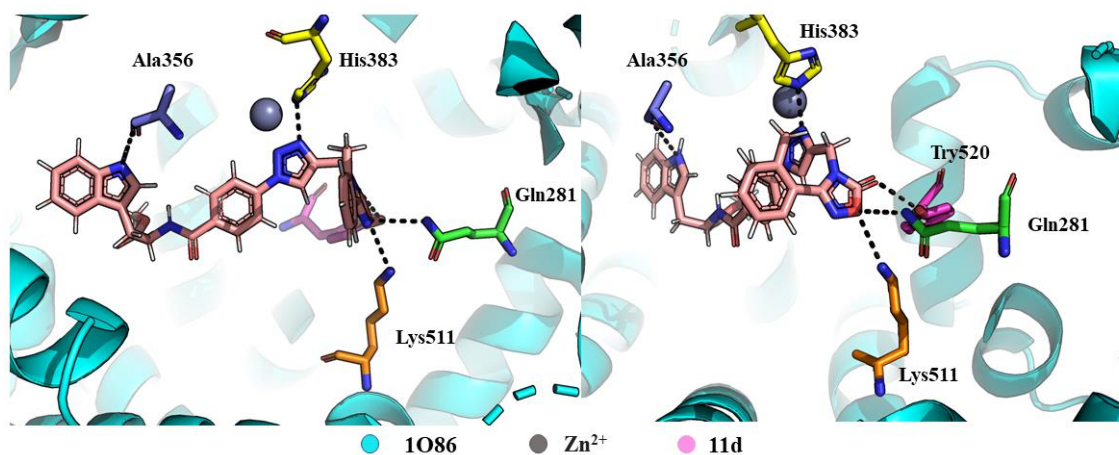


Fonte: A autora (2023)

Outro tipo de ligação de hidrogênio prevista seria entre a porção terminal do ácido carboxílico com três resíduos conservados no subsítio S₂ (Gln²⁸¹, Lys⁵¹¹ e Tyr⁵²⁰) pertencentes ao domínio cECA. Todavia, os compostos sintetizados não possuem a porção de ácido carboxílico terminal, tendo nesta região um grupamento éster. Logo, nenhuma interação com os resíduos mencionados foi identificada. No entanto, observou-se nesta região uma série de interações eletrostáticas e uma ligação de hidrogênio entre o resíduo Gly²⁰⁰⁰ e o oxigênio da carboxila da função éster nos compostos **11f** e **11i**.

Embora o composto **11d** não tenha apresentado nenhum tipo de interação com o zinco catalítico, observou-se a formação de três ligações de hidrogênio com os resíduos conservados no subsítio S₂ para domínio cECA, isto é, Gln²⁸¹, Lys⁵¹¹ e Tyr⁵²⁰ (**Figura 17**). Essas interações ocorrem, respectivamente, entre o oxigênio do anel da 1,2,4-oxadiazolin-5-ona com os resíduos Gln²⁸¹ e Lys⁵¹¹, e com o oxigênio da carbonila também ligada ao anel do heterociclo. Além disso, as ligações de hidrogênio entre o nitrogênio do triptofano e o resíduo Ala³⁵⁶ é um indício positivo no que se refere à seletividade, pois esse resíduo faz parte do subsítio S₂. Ademais, a análise das estruturas do PDB feita por Caballero (2020) sugere que a interação com esta alanina é essencial para a seletividade dos inibidores da ECA. O composto **11j** também realiza essa interação com Ala³⁵⁶.

Figura 17 - Interações de hidrogênio da substância 11d com os resíduos conservados no subsítio S₂ para domínio cECA



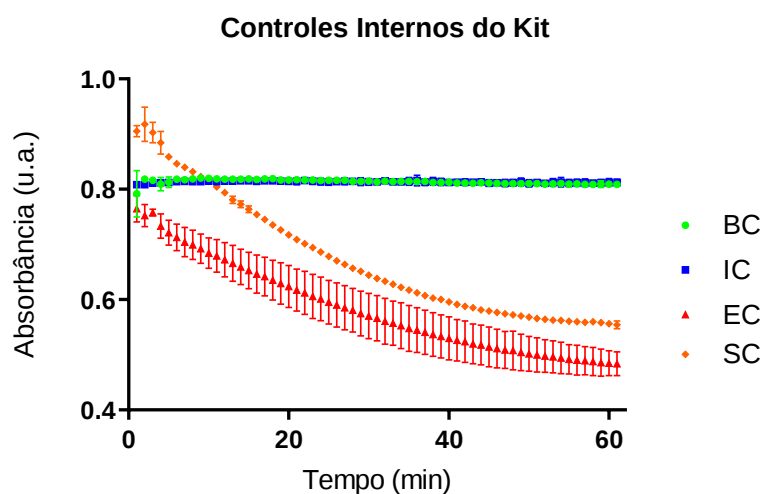
Fonte: A autora (2023)

No que diz respeito às interações lipofílicas, notou-se que as regiões apolares, como por exemplo, as porções aromáticas dos compostos sintetizados (**11a-l**) interagiram por meio de interações de Van der Waals com vários resíduos de aminoácidos. Essas interações são bastante similares para todos os compostos. No entanto, é importante frisar que as interações não polares com subsítios apolares aumentam a potência do inibidor (FIENBERG *et al.*, 2017).

3.4 Testes *in vitro*

Todas substâncias da série **11a-l** foram submetidas aos testes *in vitro* para avaliar o potencial de inibição frente à ECA. Dessa forma, fez-se inicialmente uma testagem em duplicata do controle interno do kit. Este experimento, que serve para avaliar a confiabilidade do controle interno, as curvas correspondentes a cada substância são indicadas por diferentes cores no gráfico abaixo (**Figura 18**). As curvas em azul e verde referem-se ao BC (tampão) e o IC (controle de inibição ou controle positivo), respectivamente. Verificou-se que as curvas em azul e verde não apresentaram decaimento, indicando que a enzima (ECA) foi inibida e que a hidrólise do substrato não ocorreu. Por sua vez, as curvas pertencentes ao EC (controle enzimático) e SC (controle do solvente – DMSO) apresentaram um decaimento em função do tempo, assinalando assim que a enzima não foi inibida e o substrato foi hidrolisado, como é possível observar na **figura 18**.

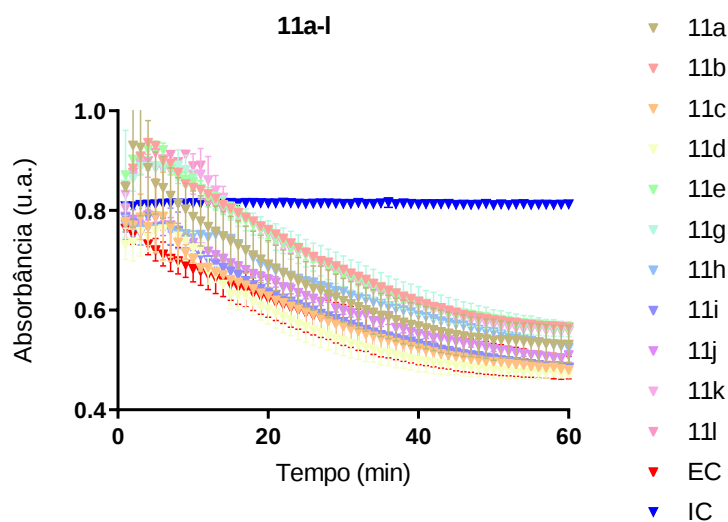
Figura 18 - Controle interno do Kit de inibição da enzima ECA. BC (Branco); IC (controle de inibição); EC (controle enzimático) e SC (controle do solvente – DMSO)



Fonte: A autora (2023)

Verificada a confiabilidade do kit, fez-se em seguida uma triagem em duplicata com concentração fixa em 100 μM para todas as substâncias da série **11a-l**. Através deste ensaio, é possível estimar os percentuais de inibição de cada substância em relação à enzima. Contudo, os resultados obtidos não foram tão satisfatórios, pois na concentração selecionada as substâncias sintetizadas (**11a-l**) não inibiram a ECA como era o esperado (**Figura 19**).

Figura 19 - Triagem em duplicata na concentração fixa de 100 μM para substâncias da série **11a-l**

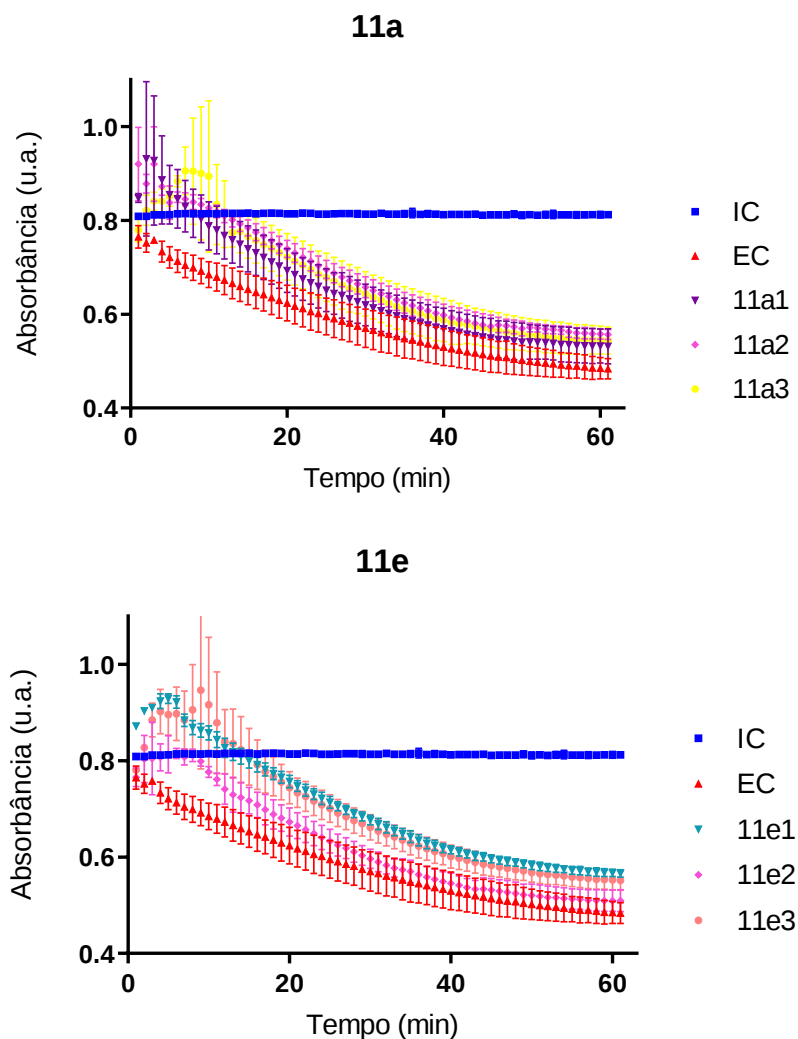


Fonte: A autora (2023)

De modo geral, observou-se que todas as substâncias na concentração de 100 μM possuem tendências similares, ou seja, apresentam um decaimento em função do tempo, do mesmo modo que o controle negativo EC (enzima sem inibidor), sendo este um indício que as substâncias sintetizadas não inibem a ECA de forma eficaz. Dessa forma, não foi possível estimar o percentual de inibição pois, na maioria dos casos, o decaimento da curva (*slope*) das substâncias (**11a-l**) era maior do que o da enzima livre, resultando em um valor negativo de inibição. Logo, pode-se considerar que não ocorreu inibição nesta concentração. Visto que na concentração de 100 μM os resultados não foram tão satisfatórios, foram selecionadas cinco substâncias (**11a**, **11e**, **11g**, **11k** e **11l**), cujos resultados de inibição apresentaram valores diferentes de zero na primeira triagem para tentar estimar o IC_{50} . Neste caso, três concentrações diferentes foram escolhidas para cada substância, distribuídas respectivamente da seguinte forma: **11a** (2,5 μM , 5 μM e 15 μM), **11e** (5 μM , 20 μM e 30 μM), **11g** (5 μM , 20 μM e 30 μM), **11k** (1 μM , 2,5 μM e 5 μM), **11l** (1 μM e 2,5 μM).

Na triagem em duplicata para as substâncias **11a** e **11e** (**Figura 20**) notou-se que, mesmo variando a concentração das substâncias, as curvas apresentavam o mesmo comportamento, ou seja, o decaimento do substrato (hidrólise do substrato) em função do tempo não foi alterado com a mudança da concentração, dificultando até mesmo a distinção entre as curvas devido à sobreposição das mesmas. Isto impossibilitou a construção da curva dose-resposta e a determinação dos valores de IC_{50} , pois não foi possível estimar em qual concentração ocorre a inibição.

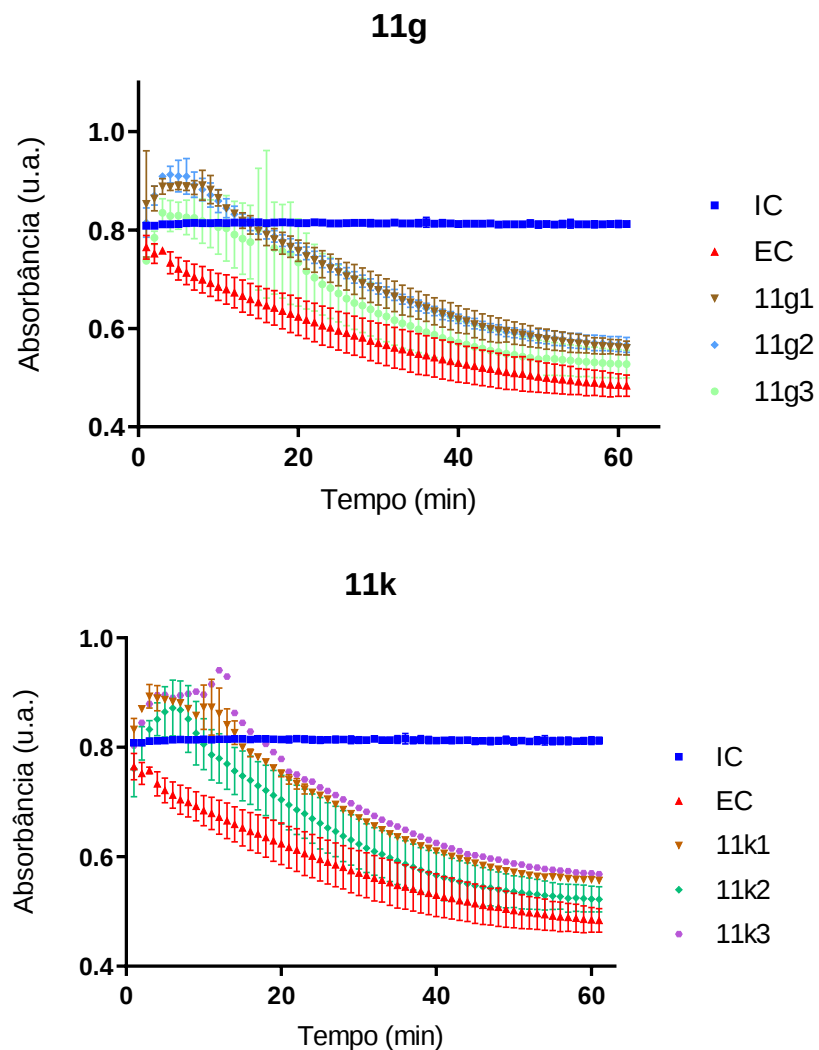
Figura 20 - Triagem em duplicata em diferentes concentrações para as substâncias **11a** e **11e**



Fonte: A autora (2023)

As substâncias **11g** e **11k** apresentaram comportamento similar ao das substâncias **11a** e **11e**, uma vez que, mesmo variando a concentração destas substâncias, não se observou mudanças significativas no padrão das curvas, como é possível observar na **figura 21**.

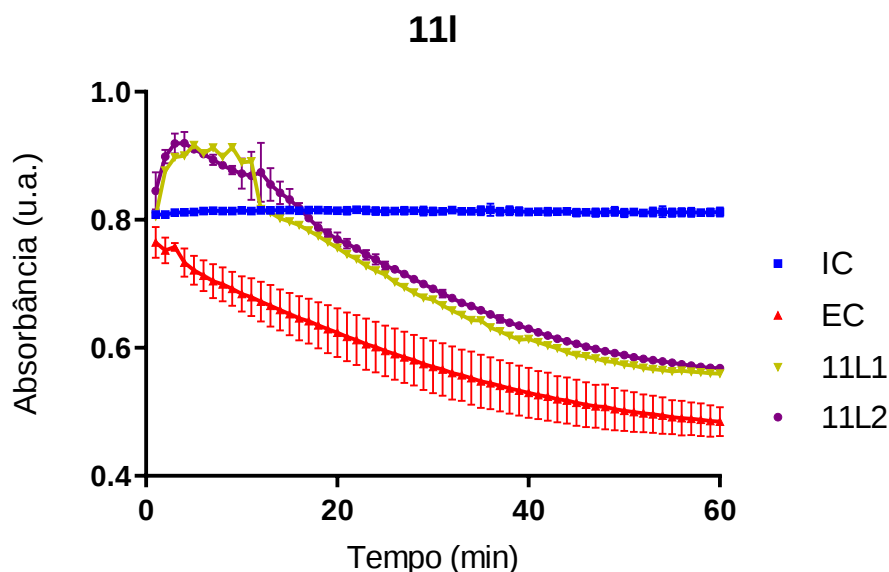
Figura 21 - Triagem em duplicata em diferentes concentrações para substâncias **11g** e **11k**



Fonte: A autora (2023)

Para substância **11l** testou-se apenas duas concentrações (1 μM e 2,5 μM). Neste caso, também não foi observado nenhum percentual de inibição mesmo com a variação da concentração da substância, como é possível observar na **figura 22**, inviabilizando assim, a determinação do IC_{50} e a construção da curva dose-resposta.

Figura 22 - Triagem em duplicata em diferentes concentrações para substâncias **11I**



Fonte: A autora (2023)

Considerando que a substância **9I** é o ácido intermediário do produto final **11I**, testou-se também em duplicata em concentração fixa de 100 μM a substância **9I**. Contudo, nenhum resultado de inibição significativo foi observado.

Fazendo uma analogia com os resultados obtidos no *docking* molecular, estima-se que a falta de inibição das substâncias pode estar relacionada à ausência de uma porção ácido carboxílico terminal ligada ao grupamento triptofano, uma vez que o estudo feito por Fienberg *et al.*, (2017) assinalou que essa porção é tida como essencial para atividade dos IECAs, pois realiza interações de hidrogênio com três resíduos conservados no subsítio S_2 (Gln²⁸¹, Lys⁵¹¹ e Tyr⁵²⁰). Outra interação tida como relevante para atividade inibitória, que não foi observada no estudo de *docking*, consiste em uma interação de hidrogênio entre o ácido glutâmico catalítico com o nitrogênio da amida. Além disso, destaca-se a quantidade de interações de hidrogênio reduzidas nas substâncias, pois o lisinopril (fármaco comercial, inibidor cristalográfico) realiza cerca de oito interações de hidrogênio, enquanto as substâncias sintetizadas (**11a-I**) fizeram, em média, cinco interações. No mais, não foi possível inferir sobre a influência dos substituintes no anel aromático, pois nenhum efeito significativo foi observado nos ensaios *in vitro* e *in silico*.

4 METODOLOGIA

4.1 Síntese dos candidatos a inibidores da ECA

4.1.1 Procedimentos gerais

Todos os solventes e reagentes utilizados nesta pesquisa foram adquiridos pelos fornecedores Aldrich®, Vetec®, Dinâmica®, Merck®. Por sua vez, essas substâncias não necessitaram de processos complementares de purificação, realizando apenas a destilação da trietilamina, acetonitrila e dimetilformamida, seguindo o método Armarego e Chai (2003). Na técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se as placas de sílica da marca Fluka, contendo o indicador fluorescente F₂₅₄, o qual é sensível à luz ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm. Já a purificação dos compostos finais foi feita via cromatografia de coluna de sílica gel da marca Merck® e Moderna® com granulometria entre 60-230 *mesh*.

4.1.2 Equipamentos utilizados

O ponto de fusão dos compostos foi determinado utilizando o Eletro-thermal modelo Mel-Temp do tipo analógico e não foram corrigidos. Já as análises de RMN de ¹H e ¹³C foram realizadas na Central Analítica (UFPE) usando espectrômetro Varian URMNS de 400 MHz, destinando-se para isso 30 mg de cada composto. Os solventes empregados nesta análise variaram de acordo com a solubilidade das amostras, sendo utilizado diclorometano (CDCl₃-d₆) e dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆). O ensaio de polarimetria também foi feito na central analítica, utilizando para isso o polarímetro da marca JASCO-Modelo (P2000). Em relação aos processamentos dos espectros foi usado o programa MestReNova, versão 12, pertencente à companhia Mestrelab Research S.L. O banho ultrassônico onde foi realizado a síntese de alguns compostos descritos neste trabalho é da marca Branson, modelo BRANSONIC 2510E-DTH com potência de 100 W e a frequência de operação de 40 kHz.

4.1.3 Síntese das aril-amidoximas:

O preparo das amidoximas seguiu o procedimento metodológico descrito por Mayer *et al.*, (2021), Srivastava *et al.*, 2009 e Srivastava *et al.* (1997). Neste procedimento, adicionou-se 1 mmol da nitrila aromática correspondente em um balão de fundo redondo com

capacidade de 100 mL, seguido da adição de 20 mL de etanol. Simultaneamente, fez-se a solubilização de 0,04 mol de cloridrato de hidroxilamina e 0,04 mol de bicarbonato de sódio em béqueres separados com respectivamente 8 mL e 12 mL de água destilada. Após a solubilização total desses sais, a solução de bicarbonato de sódio foi adicionada à solução de cloridrato de hidroxilamina. Posteriormente, verteu-se a solução resultante dessa mistura ao balão contendo a nitrila já solubilizada. A reação foi deixada sob agitação em temperatura ambiente por um período de até 48 horas, e o progresso da mesma foi acompanhado por CCD (sistema de eluição hexano:acetato de etila, 7:3 v/v) tendo como parâmetro avaliativo o consumo total da nitrila do meio reacional. Verificado o término da reação, a mistura foi direcionada ao rota-evaporador para remoção do solvente. Logo após realizou-se uma extração utilizando um funil de separação e acetato de etila (2 x 20 mL). Em seguida, foi adicionado sulfato de sódio anidro para secar a fase orgânica, e a mesma foi levada ao rota-evaporador para eliminar o solvente restante. O produto obtido foi recristalizado em uma mistura de clorofórmio/hexano.

4.1.4 Síntese das 1,2,4-oxadiazolidin-5-onas:

O preparo das 1,2,4-oxadiazolidin-5-onas ocorreu em duas etapas. Na primeira etapa adicionou-se 5 mmol da amidoxima correspondente em balão de fundo redondo com capacidade de 100 mL, seguido pela adição de 10 mL de acetonitrila seca e destilada, 7 mmol de cloroformiato de etila e 3 mmol de trietilamina seca e destilada. Feita a adição de todos os reagentes, o balão foi levado até o banho ultrassônico a 50°C por um período de até 2 horas. Verificado o término da primeira etapa da reação por meio do consumo total do reagente (amidoxima) utilizando CCD, o meio reacional foi levado ao rota-evaporador, onde foi retirada toda a acetonitrila, dando início a segunda etapa. Nesta etapa, adicionou-se ao balão 0,01 mol de hidróxido de sódio e 12 mL de água destilada. A mistura foi direcionada mais uma vez ao banho ultrassônico a 50°C por um período de aproximadamente 3 horas. O final dessa etapa também foi acompanhado por CCD (hexano:acetato de etila, 7:3 v/v), tendo como parâmetro avaliativo neste caso o consumo da amidoxima *O*-acilada.

Após o término da reação, a mistura foi vertida em um béquer de 50 mL com gelo, sendo acidificada com ácido clorídrico concentrado, resultando na formação de um precipitado. Esse precipitado foi filtrado a vácuo e posteriormente recristalizado em uma mistura de clorofórmio/hexano.

4.1.5 Síntese das 3-aril-4-(propinil)-1,2,4-oxadiazolidin-5-onas:

Em um balão de fundo redondo com capacidade de 50 mL, adicionou-se 4 mmol da 1,2,4-oxadiazolin-5-ona correspondente, 5 mmol de carbonato de potássio e 5 mL de dimetilformamida. Após a solubilização dos sólidos foi acrescido 0,77 mL de brometo de propargila (solução 80 % em tolueno, p/v). A reação foi deixada sob agitação em temperatura ambiente por 24 horas, sendo o progresso da mesma monitorado por CDD (hexano:acetato de etila, 1:1 v/v), visando o consumo da 1,2,4-oxadiazolin-5-ona do meio.

Finalizada a reação, a mistura obtida foi transferida para um béquer de 50 mL contendo gelo e água destilada. Em seguida o meio reacional foi acidificado com ácido clorídrico concentrado, resultando na precipitação do produto. O precipitado, por sua vez, foi filtrado a vácuo e posteriormente recristalizado em uma mistura de clorofórmio/hexano.

4.1.6 Reação tipo “click” alcino-azida entre as 3-aril-4-(propinil)-1,2,4-oxadiazolidin-5-onas e o ácido 4-azidobenzóico:

A reação “click” alcino-azida seguiu os procedimentos metodológicos descritos no trabalho de Wu *et al.*, (2009). Inicialmente, foi acrescido em balão de fundo redondo 0,7 mmol do alcino derivado da 1,2,4-oxadiazolidin-5-ona correspondente, 0,6 mmol de ácido 4-azidobenzóico, 0,02 mmol de iodeto de cobre, 1,3 mmol de trietilamina e 5 mL de dimetilformamida como solvente. Feita a adição de todos os reagentes, o balão foi direcionado ao banho ultrassônico durante 90 minutos. O progresso da reação foi acompanhado por CCD (diclorometano:acetato de etila, 8:2 v/v), a partir do consumo total do ácido 4-azidobenzóico. Ao final da reação, a mistura foi vertida em gelo e acidificada com HCl concentrado, com formação do precipitado. Em seguida, filtrou-se o meio reacional e o produto resultante foi lavado com diclorometano.

4.1.7 Reação de esterificação do triptofano

A reação de esterificação do triptofano iniciou-se com a mistura de 0,4 mol do L-triptofano e 20 mL de metanol, em 0 °C, a um balão de fundo redondo com capacidade de 100 mL. Em seguida, fez-se cuidadosamente a adição de 0,3 mol de cloreto de tionila. A mistura reacional foi colocada em refluxo a 80 °C por 24 h. Após este período, o cloreto de tionila e o metanol foram destilados. Ao término da reação, o sólido de coloração cinza claro foi recristalizado em uma mistura de hexano/metanol e filtrado a vácuo, sendo armazenado no freezer.

4.1.8 Reação de Amidificação entre o éster do Trp e os derivados triazólicos das 1,2,4-oxadiazolidin-5-onas:

Em um frasco do tipo Schlenk com capacidade para 60 mL, adicionou-se 0,4 mmol do ácido derivado da 1,2,4-oxadiazolidin-5-ona, seguida pela adição de 0,5 mmol do éster metílico do triptofano e 0,6 de tetrafluoroborato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (TBTU). Essa mistura foi submetida a três ciclos de degasagem com argônio, a fim de eliminar toda a umidade. A adição de 0,022 mL de trietilamina e 5 mL de dimetilformamida seca e destilada ocorreu meio com o meio saturado de argônio. A reação foi deixada sob agitação em temperatura ambiente por um período de até 24 horas. O progresso da mesma foi acompanhado por CCD (diclorometano:acetato de etila, 8:2 v/v) tendo como parâmetro avaliativo o consumo total do ácido de partida. Após o término da reação, a mistura foi vertida em um béquer de 50 mL contendo gelo e 10 mL de água destilada, sendo acidificada com ácido clorídrico concentrado, resultando na formação de um precipitado. Esse precipitado foi filtrado a vácuo e posteriormente foi purificado através de coluna de sílica gel, utilizando como fase móvel uma mistura de diclorometano:acetato de etila (8:2; v/v).

Propanoato de 3-(1*H*-indol-3-il)-2-(4-{4-[(5-oxo-3-fenil-1,2,4-oxadiazol-4(5*H*)-il)metil]-1*H*-1,2,3-triazol-1-il}benzamido) metila (11a): sólido vermelho; rendimento: 90%; P.F.: 93-95°C; Rf: 0,33; (8:2; diclorometano/acetato de etila, v/v). RMN de ¹H (CDCl₃-d₆, 400 MHz) δ (ppm): 3,34 (dd, 1H, J = 12,8 Hz, 7,2 Hz, CH₂); 3,40 (dd, 1H, J = 12,8 Hz, 5,2 Hz, CH₂); 3,66 (s, 3H, OMe); 4,88 (s, 2H, CH₂); 5,06 (ddd, 1H, J = 7,2 Hz, 5,2 Hz, 2,8 Hz, CH); 6,73 (d, 1H, J = 7,7 Hz, CNH) 6,94 (d, 1H, J = 8,0 Hz, H_{Ar}); 6,98 (dd, 1H, J = 8,1 Hz, 1,1 Hz, H_{Ar});

7,08 (dd, 1H, J = 8,1 Hz, 1,1 Hz, H_{Ar}); 7,26 (d, 1H, J = 8,1 Hz, H_{Ar}); 7,45 (d, 1H, J = 8,0 Hz, H_{Ar}); 7,56 – 7,48 (m, 3H, H_{Ar}); 7, 59 (d, 2H, J = 8,6 Hz, H_{Ar}); 7, 69 (d, 2H, J = 8,6 Hz, H_{Ar}); 7,80 (dd, 2H, J = 8,0 Hz, 2,1 Hz, H_{Ar}); 8, 15 (s, 1H, CH); 8,44 (sl, 1H, NH). RMN de ¹³C (CDCl₃-d₆, 101 MHz) δ (ppm): 27,4; 38,3; 52,5; 53,6, 110,0; 111,4, 118,5; 119,8; 120,1; 122,2; 122,4; 122,6; 122,9; 125,2; 127,6; 128,2; 128,9; 129,0; 129,5; 132,3; 134,3; 136,1; 137,8; 138,7; 141,9; 158,6; 159,6; 165,4; 172,2. RMN de ¹³C (CDCl₃-d₆, 101 MHz) δ (ppm): 27,4; 38,3; 52,5; 53,6, 110,0; 111,4, 118,5; 119,8; 120,1; 122,2; 122,4; 122,6; 122,9; 125,2; 127,6; 128,2; 128,9; 129,0; 129,5; 132,3; 134,3; 136,1; 137,8; 138,7; 141,9; 158,6; 159,6; 165,4; 172,2.

Propanoato de 3-(1H-indol-3-il)-2-(4-{4-[(5-oxo-3-p-tolil-1,2,4-oxadiazol-4(5H)-il)metil]-1H-1,2,3-triazol-1-il}benzamido) metila (11b): sólido branco; rendimento: 96%; P.F.: 165-168°C; Rf: 0,36; (8:2; diclorometano/acetato de etila, v/v). RMN de ¹H (CDCl₃-d₆, 400 MHz) δ (ppm): RMN de ¹³C (CDCl₃-d₆, 101 MHz) δ (ppm): 2,45 (s, 3H, CH₃); 3,44 (dd, 1H, J = 12,8 Hz, 5,2 Hz, CH₂); 3,49 (dd, 1H, J = 12,8 Hz, 4,8 Hz, CH₂); 3,75 (s, 3H, Ome); 4, 97 (s, 2H, CH₂); 5,19 (ddd, 1H, J = 7,6 Hz, 5,2 Hz, 2,2 Hz, CH); 6,76 (d, 1H, J = 7,6 Hz, NH) 7,02 (d, 1H, J = 8,0 Hz, H_{Ar}); 7,07 (dd, 1H, J = 8,0 Hz, 1,2 Hz, H_{Ar}); 7,18 (dd, 1H, J = 8,0 Hz, 1,2 Hz, H_{Ar}); 7,36 (d, 1H, J = 8,0 Hz, H_{Ar}); 7,39 (d, 2H, J = 8,0 Hz, H_{Ar}); 7,54 (d, 1H, J = 8,0 Hz, H_{Ar}); 7,71 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H_{Ar}); 7,76 (d, 2H, J = 8,0 Hz, H_{Ar}); 7,79 (d, 2H, J = 8,6 Hz, H_{Ar}); 8,25 (s1, 1H, CH); 8,36 (s1, 1H, NH). RMN de ¹³C (CDCl₃-d₆, 101 MHz) δ (ppm): 27,4; 38,3; 52,5; 53,6; 109,8; 111,4; 118,5; 119,6; 119,7; 120,1; 122,2; 122,4; 122,8; 127,6; 128,7; 128,8; 130,2; 134,2; 136,1; 138,7; 142,0; 143,0; 158,7; 159,6; 165,4; 172,2.

Propanoato de 3-(1H-indol-3-il)-2-(4-{4-[(5-oxo-3-m-tolil-1,2,4-oxadiazol-4(5H)-il)metil]-1H-1,2,3-triazol-1-il}benzamido) de metila (11c): sólido branco; rendimento: 77%; P.F.: 107-110°C; Rf:0,36; (8:2; diclorometano/acetato de etila, v/v). RMN de ¹H (CDCl₃-d₆, 400 MHz) δ (ppm): RMN de ¹³C (CDCl₃-d₆, 101 MHz) δ (ppm): 2,44 (s, 3H, CH₃); 3,43 (dd, 1H, J = 12 Hz, 5,6 Hz, CH₂); 3,48(dd, 1H, J = 12 Hz, 5,6 Hz, CH₂); 3, 74 (s, 3H, CH₃); 4,96 (s, 2H, CH₂); 5,14 (ddd, 1H, J = 7,6 Hz, 5,2 Hz, 2,4 Hz, CH₂); 6,81 (d, 1H, J = 7,7 Hz, NH); 7,01 (d, 1H, J = 8,0 Hz, H_{Ar}); 7,06 (dd, 1H, J = 8,0 Hz, 1,2 Hz, H_{Ar}); 7,16 (dd, 1H, J = 8,0 Hz, 1,2 Hz, H_{Ar}); 7,34 (d, 1H, J = 8,0 Hz, H_{Ar}); 7,43 (d, 1H J = 8,0 Hz, H_{Ar}); 7,47 (t, 1H, J = 8,0 Hz, H_{Ar}); 7,53 (d, 1H, J = 8,0 Hz, H_{Ar}); 7,65 (s, 1H, H_{Ar}); 7,68 (d, 3H, J = 8,4 Hz, H_{Ar}); 7,77 (d, 2H, J = 8,4 Hz, , H_{Ar}); 8,23 (s, 1H, CH); 8,51 (s1, 1H, NH). RMN de ¹³C (CDCl₃-d₆, 101 MHz) δ (ppm): 21,3; 27,4; 38,2; 52,5; 53,6; 109,7; 111,4; 118,4; 119,7; 120,0;

122,2; 122,3; 122,4; 122,9; 125,8; 127,5; 128,8; 129,3; 133,1; 134,1; 136,1; 138,6; 139,6; 141,9; 158,7; 159,6; 165,4; 172,2.

Propanoato de 3-(1H-indol-3-il)-2-(4-{4-[5-oxo-3-o-tolil-1,2,4-oxadiazol-4(5H)-il]metil}-1H-1,2,3-triazol-1-il}benzamido) metila (11d): sólido amarelo; rendimento: 96%; P.F.: 100-103°C; Rf:0,30; (8:2; diclorometano/acetato de etila, v/v). RMN de ^1H ($\text{CDCl}_3\text{-d}_6$, 400 MHz) δ (ppm): RMN de ^{13}C ($\text{CDCl}_3\text{-d}_6$, 101 MHz) δ (ppm):); 3,35 (dd, 1H, $J = 12,8$ Hz, 7,6 Hz, CH); 3,41 (dd, 1H, $J = 12,8$ Hz, 5,2 Hz, CH_2); 3,66 (s, 3H, OMe); 3,79 (s, 3H, CH_3); 4,88 (s, 2H, CH_2); 5,06 (ddd, 2H, $J = 7,6$ Hz, 5,2 Hz, 2,4 Hz, H_{Ar}); 6,72 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, NH) 6,94 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H_{Ar}); 7,00 (dd, 1H, $J = 8,0$ Hz, 1,1 Hz, H_{Ar}); 7,09 (dd, 1H, $J = 8,0$ Hz, 1,1 Hz, H_{Ar}); 7,27 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H_{Ar}); 7,46 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H_{Ar}); 7,61 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H_{Ar}); 7,69 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H_{Ar}); 7,75 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, H_{Ar}); 8,17 (s, 1H, CH); 8,42 (s1, 1H, NH). RMN de ^{13}C ($\text{CDCl}_3\text{-d}_6$, 101 MHz) δ (ppm): 21,0; 27,4; 38,2; 52,5; 53,6; 109,7; 111,4; 114,5; 114,6; 118,4; 119,7; 120,0; 122,2; 122,3; 122,9; 127,6; 128,8; 130,5; 134,2; 136,1; 138,6; 142,0; 158,4; 159,6; 165,4; 172,2.

Propanoato de 3-(1H-indol-3-il)-2-(4-{4-[(3-4-nitrofenil-5-oxo-1,2,4-oxadiazol-4(5H)il)metil]-1H-1,2,3-triazol-1-il}benzamido) metila (11e): sólido amarelo; rendimento: 90%; P.F.: 115-117°C; Rf:0,25; (8:2; diclorometano/acetato de etila, v/v). RMN de ^1H ($\text{CDCl}_3\text{-d}_6$, 400 MHz) δ (ppm): 3,35 (dd, 1H, $J = 12,4$ Hz, 7,2 Hz, CH_2); 3,41 (dd, 1H, $J = 12,4$ Hz, 5,2 Hz, CH_2); 3,67 (s, 3H, CH_3); 5,03 (s, 2H, CH_2); 5,06 (ddd, 1H, $J = 7,2$ Hz, 5,2 Hz, 2,8 Hz, CH); 6,71 (d, $J = 7,7$ Hz, NH); 6,94 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H_{Ar}); 6,99 (dd, 1H, $J = 8,0$ Hz, 1,0 Hz, H_{Ar}); 7,09 (dd, 1H, $J = 8,0$ Hz, 1,0 Hz, H_{Ar}); 7,19 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz, H_{Ar}); 7,27 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, , H_{Ar}); 7,46 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H_{Ar}); 7,56 (dd, 1H, $J = 5,2$ Hz, 1,2 Hz, H_{Ar}); 7,61 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H_{Ar}); 7,70 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H_{Ar}); 8,04 (dd, 1H, $J = 4,0$ Hz, 1,2 Hz, H_{Ar}); 8,16 (s, 1H, CH); 8,40 (s1, 1H, NH).RMN de ^{13}C ($\text{CDCl}_3\text{-d}_6$, 101 MHz) δ (ppm):27,4; 38,3; 52,5; 53,6; 109,7; 111,4; 118,4; 119,7; 120,1; 121,9; 122,2; 122,3; 122,9; 127,6; 128,7; 130,9; 131,8; 134,3; 136,1; 138,6; 142,0 153,7; 159,3; 165,4; 172,2.

Propanoato de 3-(1H-indol-3-il)-2-(4-{4-[(3-3-nitrofenil-5-oxo-1,2,4-oxadiazol-4(5H)-il)metil]-1H-1,2,3-triazol-1-il}benzamido)propanoato (11f): sólido amarelo; rendimento: 66%; P.F.: 123-125°C; Rf: 0,21; (8:2; diclorometano/acetato de etila, v/v). RMN de ^1H ($\text{CDCl}_3\text{-d}_6$, 400 MHz) δ (ppm): 3,42 (dd, 1H, $J = 13,6$ Hz, 7,6 Hz, CH_2); 3,47 (dd, 1H, $J =$

13,6 Hz, 5,6 Hz, CH₂); 3,74 (s, 3H, CH₃); 4,96 (s, 2H, CH₂); 5,12 (ddd, 1H, J = 7,6 Hz, 5,6 Hz, 2,8 Hz, CH); 6,82 (d, 1H, J = 7,7 Hz, NH); 7,02 (s, 1H, H_{Ar}); 7,05 (dd, 1H, J = 8,0 Hz, 1,2 Hz, H_{Ar}); 7,15 (dd, 1H, J = 8,0 Hz, 1,2 Hz, H_{Ar}); 7,33 (d, 1H, J = 8,0 Hz, H_{Ar}); 7,53 (d, 1H, J = 8,0 Hz, H_{Ar}); 7,65 (d, 2H, J = 8,6 Hz, H_{Ar}); 7,75 (d, 2H, J = 8,6 Hz, H_{Ar}); 7,81 (t, 1H, J = 8,0 Hz, H_{Ar}); 8,24 (s, 1H, H_{Ar}); 8,36 (ddd, 1H, J = 8,0 Hz, 5,2 Hz, 2,8 Hz, H_{Ar}); 8,45 (ddd, 1H, J = 8,0 Hz, 5,2 Hz, 2,8 Hz, H_{Ar}); 8,51 (s, 1H, NH); 8,77 (s, 1H, CH). RMN de ¹³C (CDCl₃-d₆, 101 MHz) δ (ppm): 27,4; 38,2; 52,5; 53,6; 109,7; 111,4; 118,4; 119,7; 120,0; 122,1; 122,3; 124,1; 124,4; 126,8; 127,5; 128,8; 130,8; 134,3; 134,7; 136,1; 138,5; 141,3; 148,5; 156,9; 159,9; 159,0; 165,4; 172,2.

Propanoato de 3-(1H-indol-3-il)-2-(4-{4-[(3-4-metoxifenil-5-oxo-1,2,4-oxadiazol-4(5H)-il)metil]-1H-1,2,3-triazol-1-il}benzamido) metila (11g): sólido vermelho; rendimento: 87%; P.F.: 120-123°C; Rf: 0,28; (8:2; diclorometano/acetato de etila, v/v). RMN de ¹H (CDCl₃-d₆, 400 MHz) δ (ppm): 3,35 (dd, 1H, J = 12,8 Hz, 7,6 Hz, CH₂); 3,40 (dd, 1H, J = 12,8, 5,2 Hz, CH₂); 3,66 (s, 3H, CH₃); 3,78 (s, 3H, CH₃); 4,88 (s, 2H, CH₂); 5,06 (ddd, 1H, J = 7,6 Hz, 5,2 Hz, 2,8 Hz, CH); 6,74 (d, 1H, J = 7,7 Hz, NH); 6,94 (d, 1H, J = 8,0 Hz, H_{Ar}); 7,01 – 6,96 (m, 3H, H_{Ar}); 7,08 (dd, 1H, J = 8,0 Hz, 1,1 Hz, H_{Ar}); 7,26 (d, 1H, J = 8,0 Hz, H_{Ar}); 7,45 (d, 1H, J = 8,0 Hz, H_{Ar}); 7,59 (d, 2H, J = 8,8 Hz, H_{Ar}); 7,69 (d, 2H, J = 8,8 Hz, H_{Ar}); 7,75 (d, 2H, J = 8,8 Hz, H_{Ar}); 8,17 (s, 1H, CH); 8,45 (s, 1H, NH). RMN de ¹³C (CDCl₃-d₆, 101 MHz) δ (ppm): 27,4; 38,2; 52,5; 53,6; 109,7; 111,4; 114,5; 114,9; 118,4; 119,7; 120,0; 122,2; 122,9; 127,5; 128,8; 130,8; 134,1; 136,1; 138,6; 142,0; 158,4; 159,6; 162,6; 165,5; 172,2.

Propanoato de 2-(4-{4-[(3-4-fluorofenil-5-oxo-1,2,4-oxadiazol-4(5H)-il)metil]-1H-1,2,3-triazol-1-il}benzamido)-3-1H-indol-3-il) metila (11h): sólido rosa; rendimento: 70%; P.F.: 175-178°C; Rf: 0,33; (8:2; diclorometano/acetato de etila, v/v). RMN de ¹H (CDCl₃-d₆, 400 MHz) δ (ppm): 3,45 (dd, 1H, J = 13,2 Hz, 8,0 Hz, CH₂); 3,50 (dd, 1H, J = 13,2 Hz, 5,2 Hz, CH₂); 3,76 (s, 3H, CH₃); 4,96 (s, 2H, CH₂); 5,16 (ddd, 1H, J = 8,0 Hz, 5,2 Hz, 2,8 Hz, CH); 6,72 (d, 1H, J = 7,7 Hz, NH); 7,02 (d, 1H, J = 2,2 Hz, H_{Ar}); 7,08 (dd, 1H, J = 8,0 Hz, 1,2 Hz, H_{Ar}); 7,20 (dd, 1H, J = 8,0 Hz, 1,2 Hz, H_{Ar}); 7,31 (t, 2H, J = 8,4 Hz, H_{Ar}); 7,37 (d, 1H, J = 8,0 Hz, H_{Ar}); 7,55 (d, 1H, J = 8,0 Hz, H_{Ar}); 7,74 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H_{Ar}); 7,97 (ddd, 2H, J = 8,4 Hz, 5,2 Hz, 2,8 Hz, H_{Ar}); 8,25 (s, 1H, NH); 8,29 (s, 1H, CH). RMN de ¹³C (CDCl₃-d₆, 101 MHz) δ (ppm): 27,5; 38,2; 52,5; 53,7; 109,9; 111,4; 116,8; 117,1; 118,5; 119,8; 120,2; 122,4; 122,8; 127,7; 129,0; 131,3; 131,4; 134,4; 136,1; 138,7; 141,7; 157,8; 159,4; 163,5; 163,8; 165,3; 172,2.

Propanoato de 2-(4-{4-[(3-4-clorofenil-5-oxo-1,2,4-oxadiazol-4(5H)-il)metil]-1H-1,2,3-triazol-1-il}benzamido)-3-(1H-indol-3-il) metila (11i): sólido branco; rendimento: 88 %; P.F.: 165-168°C; Rf: 0,33; (8:2; diclorometano/acetato de etila, v/v). RMN de ^1H ($\text{CDCl}_3\text{-d}_6$, 400 MHz) δ (ppm): 3,45 (dd, 1H, $J = 13,2$ Hz, 8,0 Hz, CH_2); 3,51 (dd, 1H, $J = 13,2$ Hz, 5,2 Hz, CH_2); 3,77 (s, 3H, CH_3); 4,97 (s, 2H, CH_2); 5,16 (ddd, 1H, $J = 8,0$ Hz, 5,2 Hz, 2,4 Hz, CH); 6,72 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, NH); 7,03 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H_{Ar}); 6,73 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, NH); 7,09 (dd, 1H, $J = 8,0$ Hz, 1,2 Hz, H_{Ar}); 7,20 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz, 1,2 Hz, H_{Ar}); 7,38 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H_{Ar}); 7,55 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H_{Ar}); 7,60 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H_{Ar}); 7,76 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H_{Ar}); 7,82 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H_{Ar}); 7,91 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H_{Ar}); 8,22 (s1, 1H, NH); 8,29 (s, 1H, CH). RMN de ^{13}C ($\text{CDCl}_3\text{-d}_6$, 101 MHz) δ (ppm): 27,0; 52,4; 54,3; 55,0; 110,2; 111,9; 118,3; 118,9; 120,0; 121,4; 122,0; 122,5; 124,0; 127,3; 128,5; 129,2; 129,8; 130,7; 133,9; 136,4; 137,5; 138,6; 142,4; 158,5; 159,0; 165,9; 172,8.

Propanoato de 2-(4-{4-[(3-4-bromofenil-5-oxo-1,2,4-oxadiazol-4(5H)-il)metil]-1H-1,2,3-triazol-1-il}benzamido)-3-(1H-indol-3-il) metila (11j): sólido vermelho; rendimento: 74 %; P.F.: 135-138°C; Rf: 0,34 (8:2; diclorometano/acetato de etila, v/v). RMN de ^1H ($\text{CDCl}_3\text{-d}_6$, 400 MHz) δ (ppm): 3,35 (dd, 1H, $J = 13,6$ Hz, 7,6 Hz, CH_2); 3,40 (dd, 1H, $J = 13,6$ Hz, 5,2 Hz, CH_2); 3,66 (s, 3H, CH_3); 4,85 (s, 2H, CH_2); 5,06 (ddd, 1H, $J = 7,6$ Hz, 5,2 Hz, 2,8 Hz, CH); 6,94 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H_{Ar}); 6,99 (dd, 1H, $J = 8,0$ Hz, 1,2 Hz, H_{Ar}); 7,08 (dd, 1H, $J = 8,0$ Hz, 1,2 Hz, H_{Ar}); 7,26 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H_{Ar}); 7,46 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H_{Ar}); 7,59 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, H_{Ar}); 7,65 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H_{Ar}); 7,69 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H_{Ar}); 7,73 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H_{Ar}); 8,16 (s, 1H, CH); 8,40 (s1, 1H, NH). RMN de ^{13}C ($\text{CDCl}_3\text{-d}_6$, 101 MHz) δ (ppm): 27,4; 38,2; 52,5; 53,6; 109,7; 111,4; 118,4; 119,7; 120,0; 121,4; 122,2; 122,9; 127,3; 127,6; 128,8; 130,3; 132,8; 134,2; 136,2; 138,5; 141,6; 157,9; 159,3; 165,4; 172,2.

Propanoato de 3-(1H-indol-3-il)-2-(4-{4-[(5-oxo-3-tiofen-2-il-1,2,4-oxadiazol-4(5H)-il)metil]-1H-1,2,3-triazol-1-il}benzamido) metila (11k): sólido amarelo; rendimento: 91 %; P.F.: 89-92°C; Rf: 0,36; (8:2; diclorometano/acetato de etila, v/v). RMN de ^1H ($\text{CDCl}_3\text{-d}_6$, 400 MHz) δ (ppm): 3,35 (dd, 1H, $J = 13,6$ Hz, 7,6 Hz, CH_2); 3,41 (dd, 1H, $J = 13,6$ Hz, 5,2 Hz, CH_2); 3,67 (s, 3H, CH_3); 4,89 (s, 2H, CH_2); 5,06 (ddd, 1H, $J = 7,6$ Hz, 5,2 Hz, 2,8 Hz, CH); 6,73 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, NH); 6,95 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H_{Ar}); 6,99 (dd, 1H, $J = 8,0$ Hz, 1,1 Hz, H_{Ar}); 7,09 (dd, 1H, $J = 8,0$ Hz, 1,1 H_{Ar}); 7,27 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H_{Ar}); 7,46 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H_{Ar}); 7,61 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H_{Ar}); 7,70 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H_{Ar}); 8,13 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz,

H_{Ar}); 8,19 (s, 1H, CH); 8,35 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H_{Ar}); 8,39 (s1, 1H, NH). RMN de ¹³C (CDCl₃-d₆, 101 MHz) δ (ppm): 27,3; 38,3; 52,5; 53,6; 109,7; 111,4; 118,4; 119,7; 120,1; 122,3; 122,9; 124,5; 127,6; 128,5; 128,9; 130,3; 134,4; 136,1; 138,5; 141,2; 150,0; 157,0; 165,4; 172,2.

Propanoato de 2-(4-{4-[(3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-5-oxo-1,2,4-oxadiazol-4(5H)-il)metil]-1H-1,2,3-triazol-1-il}benzamido)-3-(1H-indol-3-il) metila (11l): sólido branco; rendimento: 80%; P.F.: 130-133°C; Rf: 0,36; (8:2; diclorometano/acetato de etila, v/v). RMN de ¹H (CDCl₃-d₆, 400 MHz) δ (ppm): 3,42 (dd, 1H, J = 12,8 Hz, 7,2 Hz, CH₂); 3,47 (dd, 1H, J = 12,8 Hz, 5,2 Hz, CH₂); 3,73 (s, 3H, CH₃); 4,95 (s, 2H, CH₂); 5,13 (ddd, 1H, J = 7,2 Hz, 5,2, 2,8 Hz, CH); 6,05 (s, 2H, CH₂); 6,97 (d, 1H, J = 8,0 Hz, H_{Ar}); 6,82 (d, 1H, J = 7,7 Hz, NH); 7,01 (d, 1H, J = 8,0 Hz, H_{Ar}); 7,05 (dd, 1H, J = 8,0 Hz, 1,2 Hz, H_{Ar}); 7,15 (dd, 1H, J = 8,0 Hz, 1,2 Hz, H_{Ar}); 7,33 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H_{Ar}); 7,41 (dd, 1H, J = 8,0 Hz, 2,0 Hz, H_{Ar}); 7,53 (d, 1H, J = 8,0 Hz, H_{Ar}); 7,66 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H_{Ar}); 7,76 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H_{Ar}); 8,23 (s, 1H, CH); 8,53 (s1, 1H, NH). RMN de ¹³C (CDCl₃-d₆, 101 MHz) δ (ppm): 27,4; 38,2; 52,5; 53,6; 102,0; 108,8; 109,2; 109,7; 111,4; 115,8; 118,4; 119,7; 120,0; 122,1; 122,3; 123,9; 127,6; 128,8; 134,1; 136,1; 138,6; 141,8; 148,5; 151,0; 158,3; 159,5; 165,4; 172,2.

4.2 Docking Molecular

O estudo de *docking* molecular teve início com a seleção da estrutura da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA) no banco de dados de proteínas (PDB). Optou-se pela estrutura com código PDB: 1O86, pois seu ligante cocrystalizado é o inibidor já conhecido lisinopril. As simulações foram realizadas utilizando o software GOLD Suite (V5.3) 5.3 desenvolvido por The Cambridge Crystallographic Data Centre (JONES; WILLETT; GLEN, 1995).

Preparo da enzima: A enzima (1O86) (NATESH *et al.*, 2003) foi projetada seguindo as oito etapas da ferramenta Wizard do Hermes (Visualizador tridimensional), tais como: *setup* da proteína, definição do sítio de ligação e a escolha da função de *score*. Neste caso, a função *score* utilizada foi a ChemScore, uma vez que essa função considera a área de contato hidrofóbico-hidrofóbico, de ligação de hidrogênio, a flexibilidade do ligante e interação do metal. Além disso, o ChemScore incorpora outros parâmetros relevantes, como: um termo (dG) que representa a mudança total de energia livre que ocorre na ligação do ligante, outro

voltado ao choque de átomos (proteína-ligante) e um terceiro termo relacionado à energia interna (Centro de Dados Cristalográficos de Cambridge, 2022). Finalizadas todas as etapas, o arquivo da proteína foi salvo com a extensão .pdb.

Preparo dos ligantes: As estruturas dos ligantes foram geradas usando Chem3D Pro (v12.0) e salvas com a extensão mol2. Após o desenho, as estruturas foram adicionadas ao software Avogadro (V.1.2.0) (HANWELL *et al.*, 2012) para minimização da energia livre. Neste caso, aplicou-se um campo de força universal (UFF), selecionando o algoritmo steepest descent e fazendo o monitoramento da variação de energia até que a mesma seja igual a zero.

Aplicação das restrições: Considerando a complexidade estrutural da ECA, foi necessário aplicar algumas restrições para encontrar as poses de encaixe mais adequadas para prosseguir o estudo *in silico*. Neste caso, as restrições usadas foram direcionadas aos átomos de nitrogênio (3826 e 2552) dos resíduos His 353 e His 513 (CABALLERO, 2020).

Após o preparo da enzima e dos ligantes, iniciou-se o ensaio de *redocking* para avaliar a eficácia do método. Feita a validação do ensaio, pôde-se prosseguir com o estudo, realizando em seguida o DM com um máximo de 100 corridas para todas as estruturas projetadas. Essa simulação durou cerca de três horas e dela foi extraída as três melhores soluções de encaixe para cada ligante, sendo utilizado para fins de discussão apenas a melhor conformação. No que refere as interações (ligante-receptor), essas foram analisadas e visualizadas por meio do programa PyMOL (V.2.5.3) desenvolvido por Copyright Schodinger e Ligplot (V.2.2.5) desenvolvido por Roman Laskowski (2009).

4.3 Teste *in vitro*

Para averiguar se os compostos sintetizados possuem ação inibitória da enzima conversora da angiotensina (ECA), realizou-se ensaios *in vitro* utilizando o kit colorimétrico disponível na Sigma-Aldrich, cujo código de identificação é MAK422. Este método avalia a capacidade da enzima ativa (ECA) em hidrolisar um substrato sintético, resultando na diminuição da absorbância medida em 345 nm. Isto possibilita testes rápidos, simples e confiáveis para triagem de inibidores da ECA.

Seguindo os procedimentos metodológicos descritos no kit, os ensaios foram realizados em duplicata usando placas de 96 poços de fundo redondo e para leitura e análise dos dados utilizou-se o

leitor de placa em absorbância da marca Multiskan SkyHing e o programa GraphPad Prism 7. Todos esses testes foram realizados no Laboratório de Cultura celular – PROMETEU (UFPE).

O kit da Eca era composto pelos seguintes itens:

- Enzima (200 μ L)
- Substrato (1,1 mL)
- Inibidor (Captopril, 100 μ L)
- Tampão (25 mL)

Como indicado pelo kit, fez-se inicialmente o preparo das seguintes soluções:

Soluções das amostras

- Solução super estoque: Uma solução com concentração de 10 mM foi preparada por meio da diluição de 5 mg de cada amostra em DMSO. Neste caso, o volume foi ajustado através de cálculos estequiométricos para atingir a concentração desejada.
- Solução estoque (SE): Feita a solução super estoque, retirou-se uma alíquota de 10 μ L da mesma para preparar a solução estoque. Essa solução também foi diluída com 190 μ L de DMSO, respeitando a concentração desejada.
- Solução de uso: A solução de uso também foi obtida por meio da diluição da solução estoque. Para isso, foi pipetado 10 μ L da SE e feito a diluição com 190 μ L de DMSO. Obtendo assim, a solução uso.

Solução da Enzima

- Solução estoque: A enzima (ECA) presente no kit já vem pronta para uso. Desse modo, fez-se necessário apenas preparar alíquotas de 200 μ L em 20 frações de 10 μ L. Posteriormente, essas amostras foram armazenadas no freezer a -20 °C.
- Solução de uso: A solução de uso foi preparada utilizando as alíquotas de 10 μ L retiradas da SE da ECA. Neste caso, foi adicionado 190 μ L do tampão para completar o volume de 200 μ L. Assim, cada alíquota possibilitou a realização de cinco testes, uma vez que, o volume indicado para adição na placa foi de 40 μ L (2 μ L da enzima + 38 μ L do tampão). É importante destacar que durante a execução do teste a enzima foi mantida sob resfriamento.

Solução do inibidor

- Solução estoque: Esta solução foi preparada por meio da diluição de 10 mM do captopril em 100 μ M. Para isso, diluiu 5 μ L do captopril (10mM) em 495 μ L do tampão.
- Solução de uso: Retirou-se da solução estoque com concentração final de 100 μ M uma alíquota de 5 μ L. Essa amostra foi diluída em 495 μ L do tampão, preparando assim a solução de uso. Após o uso, essa solução foi descartada.

Solução do substrato

- Solução estoque: O substrato foi reconstituído com a adição 1,1 mL do tampão e armazenado logo em seguida no freezer a -20 °C.
- Solução de uso: Uma alíquota de 10 μ L do substrato foi diluída em 40 μ L do tampão. Dessa forma, utilizou-se no teste 50 μ L dessa solução em cada poço.

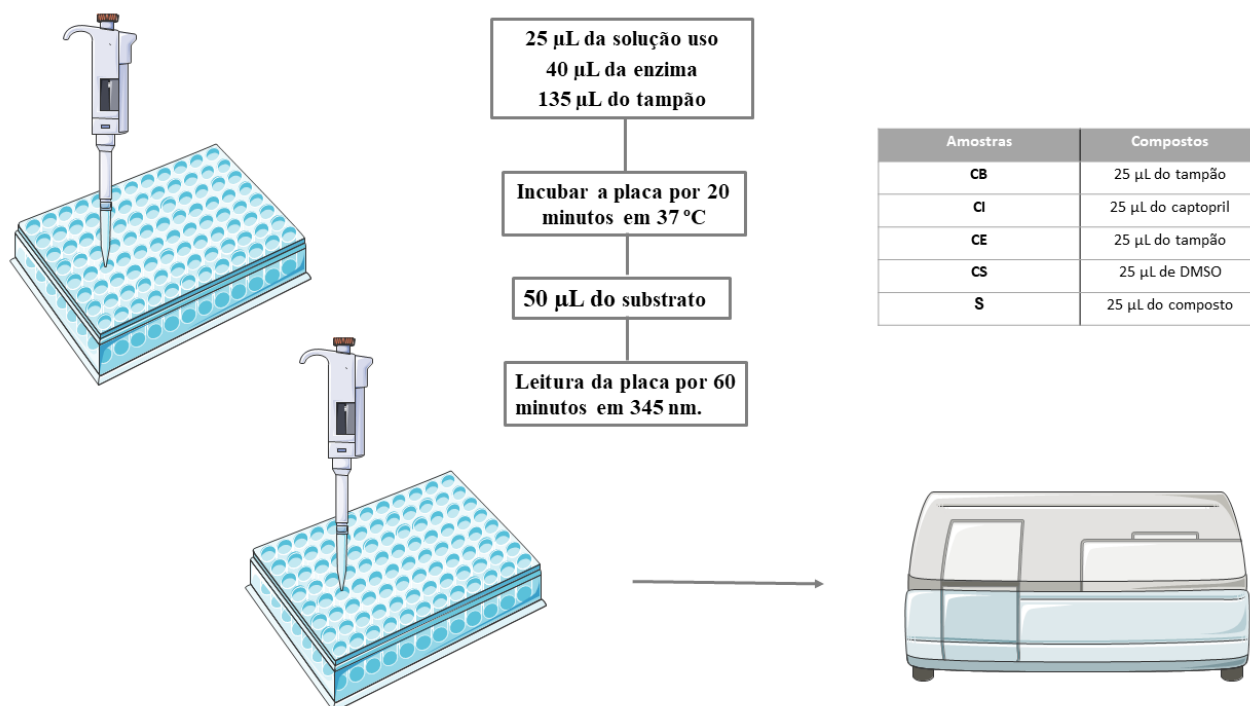
Finalizado o preparo de todas as soluções pode-se configurar o equipamento indicando as configurações adequadas para análise, tais como: temperatura (37°C), absorbância (345 nm) e tempo (60 minutos). Posteriormente, preparou-se a placa para realização do ensaio enzimático. Para isso, as amostras foram pipetadas nos poços seguindo a proporção volumétrica e ordem descrita abaixo.

1. **Controle do branco (CB):** Como no controle do branco a enzima não é adicionada, pipetou-se apenas 25 μ L do tampão + 175 μ L do tampão (para manter o volume final de 200 μ L).
2. **Controle de inibição (CI) (Controle positivo):** 25 μ L da solução uso + 40 μ L da enzima + 135 μ L do tampão.
3. **Controle enzimático (CE) (Controle negativo):** 25 μ L do tampão + 40 μ L da enzima + 135 μ L do tampão.
4. **Controle do solvente (CS):** 25 μ L da solução uso + 40 μ L da enzima + 135 μ L do tampão.
5. **Amostra teste (S):** 25 μ L da solução uso das amostras a serem testadas + 40 μ L da enzima + 135 μ L do tampão.

É importante frisar que o tampão foi adicionado em cada poço para completar o volume final de 200 μ L indicado pelo teste.

Concluído a adição de todas as soluções, a placa foi incubada por 20 minutos em uma temperatura de 37°C, protegida da luz. Decorrido esse tempo, adicionou-se em todos os poços 50 µL do substrato. Em seguida, esta placa foi posta no leitor obtendo-se assim os dados no modo cinético em um período de 61 minutos com intervalos de 1 minuto. Na **figura 23** é possível observar de forma ilustrativa todo procedimento metodológico feito no ensaio.

Figura 23 - Representação esquemática da metodologia utilizada no teste *in vitro*.



Fonte - A autora (2023)

No que diz respeito ao tratamento dos dados, fez-se inicialmente a plotagem de todos os valores de absorbância em função do tempo. Posteriormente, dois pontos que correspondem a região linear da curva foram selecionados para estimar as inclinações (CE) e (S). Os pontos escolhidos foram $T_1 = 15$ e $T_2 = 25$. Neste caso, as respectivas inclinações foram determinadas utilizando a equação 2, onde é feito a divisão das absorbâncias correspondentes pelo tempo.

$$\text{Inclinação} = \frac{A_1 - A_2}{T_1 - T_2} \quad (\text{Equação 2})$$

Determinadas as inclinações, pode-se calcular por meio da equação 3 o potencial de inibição relativa dos compostos testados.

$$\text{Inibição relativa} = \frac{(\text{Inclinação do [CE]} - \text{Inclinação da [S]}) \times 100}{\text{Inclinação do [CE]}} \quad (\text{Equação 3})$$

As amostras que apresentaram os melhores percentuais de inibição (**11a**, **11e**, **11g**, **11k** e **11l**) foram submetidas a novas análises para estimar o CI_{50} . Este ensaio seguiu os mesmos procedimentos metodológicos adotados anteriormente variando apenas a concentração dos compostos citados entre 1 μM , 1,5 μM , 2,5 μM , 20 μM e 30 μM .

5 PERSPECTIVAS

- Caracterizar as substâncias da série **11a-l** por meio de ensaios de espectrometria de massas;
- Repetir os ensaios de polarimetria;
- Sintetizar novas substâncias com a finalidade de obter inibidores com maior percentual de inibição, superando os desafios vivenciados neste trabalho;
- Buscar métodos que promovam a hidrólise das substâncias sintetizadas **11a-l**;
- Fazer novos ensaios de *docking molecular* com diferentes estruturas cristalográficas da ECA para um melhor entendimento das interações enzima-inibidor, além de explorar as condições de restrições.

6 CONCLUSÃO

Através das seis reações subsequentes da rota sintética proposta neste trabalho, obteve-se 36 substâncias inéditas (**7a-l**), (**9a-l**) e (**11a-l**), com os respectivos rendimentos químicos na faixa de 50-99%, 56-96% e 66-96%. Contudo, apenas as substâncias (**11a-l**) foram caracterizadas por meio das técnicas de espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C .

O estudo de *docking molecular* possibilitou um melhor entendimento a nível molecular sobre as interações entre as substâncias sintetizadas (**11a-l**) e a ECA. As simulações mostraram que as substâncias fazem, ao menos, uma ligação de hidrogênio com quatro resíduos em específico: His³⁵³, His³⁸³, Asn⁶⁶ e Try⁵²⁰. Em relação às interações com o zinco catalítico (Zn^{2+}), observou-se que as substâncias **11a**, **11c**, **11e**, **11f**, **11g**, **11h**, **11i**, **11k**, e **11l** realizam interações com o zinco catalítico (Zn^{2+}) por meio do grupamento carboxila. No entanto, as demais interações que são tidas como relevantes tanto para manutenção da atividade inibitória não foram identificadas.

Embora a substância **11d** não tenha apresentado nenhuma interação com o zinco catalítico, verificou-se a formação de três ligações de hidrogênio com os resíduos conservados no subsítio S₂ para domínio cECA, isto é, Gln²⁸¹, Lys⁵¹¹, Tyr⁵²⁰ e Ala³⁵⁶, sendo este um indício de seletividade para o domínio cECA.

Os resultados do *docking molecular* corroboraram com os dados obtidos no ensaio *in vitro*, uma vez que, nenhum percentual de inibição considerável foi registrado nos ensaios para substâncias **11a-l**. Estima-se que a falta de seletividade das substâncias testadas possa ser melhorada ao realizar a hidrólise dessas substâncias, deixando a porção de ácido carboxílico terminal ligado ao grupamento triptofano livre para interagir com subsítio S₂. Ademais, acredita-se que modificações estruturais que promovam o aumento das interações do tipo ligação de hidrogênio também sejam capazes de influenciar positivamente no potencial de inibição das substâncias, promovendo assim maiores interações com o sítio ativo da ECA.

REFERENCIAS

ANTONIOS, T.F.T.; MACGREGOR, G.A.. Inibidores da enzima conversora de angiotensina na hipertensão: problemas potenciais, **Journal of Hypertension**, [s. l], v. 13, p. 11-16, set. 1995.

BAKRIS, G. L. Is blockade of the renin-angiotensin system appropriate for all patients with diabetes? **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 3, n. 5, p. 288-290, Oct. 2009.

BARROSO, W. K. S. *et al.* Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial-2020. **Arq Bras Cardiol**, 2021. v. 116, n. 3, p. 516–658.

BROUWERS, Sofie *et al.* Arterial hypertension. The Lancet, [s. l], v. 398, n. 10296, p. 249-261, jun. 2021.

CABALLERO, Julio. Considerations for Docking of Selective Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 2, p. 295, 11 jan. 2020. MDPI AG.

CAI, Jin *et al.* Discovery and preliminary evaluation of 2-aminobenzamide and hydroxamate derivatives containing 1,2,4-oxadiazole moiety as potent histone deacetylase inhibitors. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 96, p. 1-13, maio 2015. Elsevier BV.

CLAPP, Leallyn B.. 1, 2, 4-Oxadiazoles. **Advances In Heterocyclic Chemistry**, [S.L.], v. 20, p. 65-116, 1976. Elsevier.

COTTON, Joël *et al.* Selective Inhibition of the C-Domain of Angiotensin I Converting Enzyme by Bradykinin Potentiating Peptides. **Biochemistry**, [S.L.], v. 41, n. 19, p. 6065-6071, 20 abr. 2002. American Chemical Society (ACS).

CUSHMAN, DW; PLUSCEC, J.; WILLIAMS, NJ; WEAVER, ER; SABO, EF; KOCY, O.; CHEUNG, HS; ONDETTI, MA. **Inibição da enzima de cobertura da angiotensina por análogos de peptídeos do veneno de Bothrops jararaca**. Experiência 1973, 29, 1032-1035. DIVE, Vincent *et al.* RXP407, a phosphinic peptide, is a potent inhibitor of angiotensin I converting enzyme able to differentiate between its two active sites. **Proc. Natl. Acad. Sci. Usa** 96, [s. l], v. 96, n. 8, p. 4330-4335, abr. 1999.

FIENBERG, Stephen *et al.* The Design and Development of a Potent and Selective Novel Diprolyl Derivative That Binds to the N-Domain of Angiotensin-I Converting Enzyme. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 61, n. 1, p. 344-359, 21 dez. 2017. American Chemical Society (ACS).

FREITAS, Luiza Baptista de Oliveira *et al.* A reação: aspectos químicos e aplicações. **Química Nova**, [S.L.], v. 34, n. 10, p. 1791-1804, 2011. FapUNIFESP (SciELO). FUCHS, Sebastien *et al.* Role of the N-terminal Catalytic Domain of Angiotensin- converting Enzyme Investigated by Targeted Inactivation in Mice. **Journal Of Biological Chemistry**, [s. l], p. 15946-15953, abr. 2004.

FUCHS, S *et al.* Enzima de conversão da angiotensina O domínio catalítico C-terminal é o principal local de clivagem da angiotensina I in vivo. **Hipertensão** 2008 , 51 , 267-274.

GEORGIADIS, Dimitris *et al.* Structural Determinants of RXPA380, a Potent and Highly Selective Inhibitor of the Angiotensin-Converting Enzyme C-Domain. **Biochemistry**, [S.L.], v. 43, n. 25, p. 8048-8054, 1 jun. 2004. American Chemical Society (ACS).

GHORANI, Hussamal *et al.* Arterial hypertension – Clinical trials update 2021. **Elsevier: Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, Alemanha, v. 32, n. 1, p. 21-31, jan. 2022.

HEIN, Jason E.; FOKIN, Valery V.. Copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(i) acetylides. **Chemical Society Reviews**, [S.L.], v. 39, n. 4, p. 1302, 2010. Royal Society of Chemistry (RSC).

HOFFMAN, B. B. **Catecholamines, Sympathomimetic Drugs and Adrenergic Receptor Antagonists. In Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics:** Hardman, J. G.; Limbird, L. E.; Eds. McGraw-Hill: New Yprk, 2001, 10th Ed., pp. 215-268. HUISGEN, Rolf; SZEIMIES, Günter; MÖBIUS, Leander. 1.3-Dipolare Cycloadditionen, XXXII. Kinetik der Additionen organischer Azide an CC-Mehrfachbindungen. **Chemische Berichte**, [S.L.], v. 100, n. 8, p. 2494-2507, ago. 1967. Wiley.

HURSTON, H. Angiotensin-converting enzyme inhibition as first-line treatment for hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. **Physiol. Suppl.*** 1992, 19, 67–71.

HUSSEIN, Ahmad Q.. Heterocycles from nitrile oxides. 3. 1,2,4-Oxadiazol-5(4H)-ones. **Journal Of Chemical & Engineering Data**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 127-128, jan. 1987. American Chemical Society (ACS).

IMAI, Yumiko *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. **Nature**, [S.L.], v. 436, n. 7047, p. 112-116, jul. 2005. Springer Science and Business Media LLC.

INDRASENA, Reddy K. Oxadiazol, 5(4H) O Aruna C, Sudhakar Babu K, nes and E et al. A valuation of their Trade Science Inc. Ethyl nti IM midazole1ycobacterial C arboxylate as a A ctivity N ovel C .**Org Chem Ind J.** 2017;13(arbonylating 1):113.

Jl, Xiaofei *et al.* Marine-Natural-Product Development: first discovery of nortopsentin alkaloids as novel antiviral, anti-phytopathogenic-fungus, and insecticidal agents. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 66, n. 16, p. 4062-4072, 9 abr. 2018. American Chemical Society (ACS).

JULIUS, Stevo et al. Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine: the value randomised trial. *The Lancet*, [S.L.], v. 363, n. 9426, p. 2022-2031, jun. 2004. Elsevier BV.

KANG, Kiwan et al. Antihypertensive and Renal Protective Effects of Oryeongsan in Spontaneously Hypertensive Rats. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 2020, p. 1-6, 21 dez. 2020. Hindawi Limited.

KEARNEY, Patricia M *et al.* Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **The Lancet**, Nova Orleans, v. 365, n. 9455, p. 217-223, jan. 2005.

KORYAKOVA, Angela G. *et al.* Novel aryl and heteroaryl substituted N-[3-(4-phenylpiperazin-1-yl)propyl]-1,2,4-oxadiazole-5-carboxamides as selective GSK-3 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 18, n. 12, p. 3661-3666, jun. 2008. Elsevier BV.

KOLB, Hartmuth C. *et al.* Click Chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. **Angewandte Chemie International Edition**, [S.L.], v. 40, n. 11, p. 2004-2021, 1 jun. 2001. Wiley.

LAMOTTA, Concettina *et al.* Acetic Acid Aldose Reductase Inhibitors Bearing a Five-Membered Heterocyclic Core with Potent Topical Activity in a Visual Impairment Rat Model. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 51, n. 11, p. 3182-3193, 2 maio 2008. American Chemical Society (ACS).

LÓPEZ-SENDÓN, José *et al.* Expert consensus document on beta-adrenergic receptor blockers. The Task Force on Beta-Blockers of the European Society of Cardiology. **European Heart Journal**, [S.L.], v. 25, n. 15, p. 1341-1362, ago. 2004. Oxford University Press (OUP).

MAYER, J. C. P. *et al.* Synthesis, spectroscopic characterization and DNA/HSA bind study of (phenyl/naphthyl)ethenyl-substituted 1,3,4-oxadiazolyl-1,2,4-oxadiazoles. **New Journal of Chemistry**, 2021. v. 45, p. 471-484.

MALACHIAS, Mvb *et al.* Capítulo 7 – Tratamento Medicamentoso. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [S.L.], v. 107, n. 3, p. 425-440, set. 2016. Sociedade Brasileira de Cardiologia.

MESSERLI, Dr. Franz H; WILLIAMS, Bryan; RITZ, Eberhard. The eye in hypertension. **The Lancet**, [s. l], v. 369, n. 9559, p. 425-435, ago. 2007.

NATESH, Ramanathan *et al.* Structural Details on the Binding of Antihypertensive Drugs Captopril and Enalaprilat to Human Testicular Angiotensin I-Converting Enzyme. **Biochemistry**, Reino Unido, v. 43, n. 27, p. 8718-8724, 18 jun. 2004.

NAKAO, Milton *et al.* Dificuldades no Controle da Tosse em Otorrinolaringologia, Quando Provocada por Anti-Hipertensivos Angiotensina - Inibidores da Enzima Conversora. **Journal Of Otorhinolaryngology**, [s. l], v. 66, n. 3, p. 217-222, jun. 2000.

OKAMOTO, Kazuhiro; OHE, Kouichi; SHIMBAYASHI, Takuya. Synthesis of Imidazoles and Pyrimidines Using Palladium-Catalyzed Decarboxylative Intramolecular Condensation of 1,2,4-Oxadiazol-5(4H)-ones. **Synlett**, [S.L.], v. 25, n. 13, p. 1916-1920, 25 jun. 2014. Georg Thieme Verlag KG.

OLIVEIRA JÚNIOR, José Oswaldo de; PORTELLA JUNIOR, Caio Sander Andrade; COHEN, Cláudia Panossian. Inflammatory mediators of neuropathic pain. **Revista Dor**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 35-42, 2016. GN1 Genesis Network.

ONO, Masahiro *et al.* A novel bifunctional chelating agent based on bis(hydroxamamide) for ^{99m}Tc labeling of polypeptides. **Journal Of Labelled Compounds And Radiopharmaceuticals**, [S.L.], v. 55, n. 2, p. 71-79, 12 dez. 2011. Wiley. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Hipertensão Arterial**. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/campanhas/dia-mundial-da-hipertensao-2022>. Acesso em: 01.nov.2022.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). Dia Mundial da **Hipertensão 2020**. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/campanhas/dia-mundial-da-hipertensao-2020>. Acesso em: 23.nov.2022.

OS I, Hjermann I, NORDBY G. **Hypertensjon som del av et metabolsk kardiovaskulaert syndrom [Hypertension as a part of metabolic cardiovascular syndrome]**. Tidsskr Nor Laegeforen. 1991 Oct 20;111(25):3062-4. Norwegian. PMID: 1948918.

REDDY, I. K. *et al.* Synthesis of 1,2,4-Oxadiazol-5(4H)-Ones and Evaluation of their Anti-Mycobacterial Activity. **Organic Chemistry: An Indian Journal, Índia**, v. 13, n. 1, p. 1-13, maio 2017.

REICHERT, Anja *et al.* Binding interactions between 3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-ones and a trisimidazoline base. **Journal Of The Chemical Society, Perkin Transactions 1**, [S.L.], n. 11, p. 1321-1328, 2001. Royal Society of Chemistry (RSC).

SANTOS, Giovanni *et al.* A QUÍMICA POR TRÁS DOS MEDICAMENTOS DISTRIBUÍDOS PELO PROGRAMA FARMÁCIA POPULAR NO BRASIL: rotas sintéticas, relação estrutura-atividade e perspectivas futuras. **Química Nova**, [S.L.], v. 44, n. 10, p. 12801299-1299, 2021. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).

SENTANDREU, M. Á.; TOLDRÁ, F. A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. **Food Chemistry**, v. 97, n. 3, p. 546–554, 2006.

SHABANIAN M, MOGHANIAN H, HAJIBEYGI M, MOHAMADI A. **Estudo Funcional da Densidade dos Efeitos do Solvente e Substituto no Tautomerismo de Derivados de 3-Hidroxi-1,2,4-Oxadiazol**. Orient J Chem 2012;28(2).

SHEVTSOVA, I. A.; TYRKOV, A. G.. Reaction of 2,2-dinitro-2-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-acetonitrile with diazomethane and diazoethane. **Russian Journal Of Organic Chemistry**, [S.L.], v. 43, n. 11, p. 1742-1744, nov. 2007. Pleiades Publishing Ltd. SILVA, Daniel Gedder. **Modelagem racional de novos dipeptídeos modificados como inibidores da enzima conversora de angiotensina**. 2013. 121 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBH). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia- 2020. **Arq Bras Cardiol**, 2021. v. 116, n. 3, p. 528–530.

SOLDATOVA, Natalia S. *et al.* Copper-Catalyzed Selective N-Arylation of Oxadiazolones by Diaryliodonium Salts. **Advanced Synthesis & Catalysis**, [S.L.], v. 363, n. 14, p. 3566-3576, 8 jun. 2021. Wiley.

SOUBRIER, F; ALHENC-GELAS, F; HUBERT, C; ALLEGRINI, J; JOHN, M; TREGGAR, G; CORVOL, P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 85, n. 24, p. 9386-9390, dez. 1988. Proceedings of the National Academy of Sciences.

SOUZA, Márcia Cristina. **Análise Estrutural de Complexos de Zn com Inibidores da Enzima Carboxipeptidase - ECA**. 2015. 149 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora -, Juiz de Fora, 2015.

STRELNIKOVA, Julia O. *et al.* Rh(II)-Catalyzed Transannulation of 1,2,4-Oxadiazole Derivatives with 1-Sulfonyl-1,2,3-triazoles: regioselective synthesis of 5-sulfonamidoimidazoles. **The Journal Of Organic Chemistry**, [S.L.], v. 83, n. 18, p. 11232-11244, 30 jul. 2018. American Chemical Society (ACS).

SUN, Yin *et al.* Settings Open Access Article Design, Synthesis, and Evaluation of Novel Phenolic Acid/Dipeptide/Borneol Hybrids as Potent Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitors with Anti-hypertension Activity. **Molecules**, [s. l], v. 1739, n. 22, p. 1-11, nov. 2017.

TABEL, Katsumi *et al.* Cyclization of O-acetoacetylbenzamide oxime derivatives. **Chemical And Pharmaceutical Bulletin**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 336-340, 1982. Pharmaceutical Society of Japan.

TAVARES, Maurício Temotheo *et al.* DRUG-RECEPTOR INTERACTIONS: in silico approaches applied to experimental classes regarding the evolution of angiotensin converting enzyme inhibitors. **Química Nova**, [S.L.], v. 38, n. 8, p. 1117-1124, 2015. GNGenesis Network.

THOMOPOULOS, Costas; PARATI, Gianfranco; ZANCHETTI, Alberto. Effects of blood pressure lowering on outcome incidence in hypertension. 1. Overview, meta-analyses, and meta-regression analyses of randomized trials. **Journal Of Hypertension**, [S.L.], v. 32, n. 12, p. 2285-2295, dez. 2014. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

VICENTE, Dmisticles de Andrade; FREITAS FILHO, João Rufino de; FREITAS, Juliano Carlo Rufino. Aplicação de amidoximas como catalisadores da reação de alilação por alitrifluoroborato de potássio em meio bifásico. **Química Nova**, [S.L.], v. 39, n. 10, p. 1225-1235, 25 ago. 2016. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).

WANG, Zuoquan *et al.* Synthesis and Properties of Energetic 1,2,4-Oxadiazoles. **European Journal Of Organic Chemistry**, [S.L.], v. 2015, n. 34, p. 7468-7474, 3 nov. 2015.

WHELTON, Paul K *et al.*, 2017, ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: executive summary. **Hypertension**, [S.L.], v. 71, n. 6, p. 1269-1324, jun. 2018. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

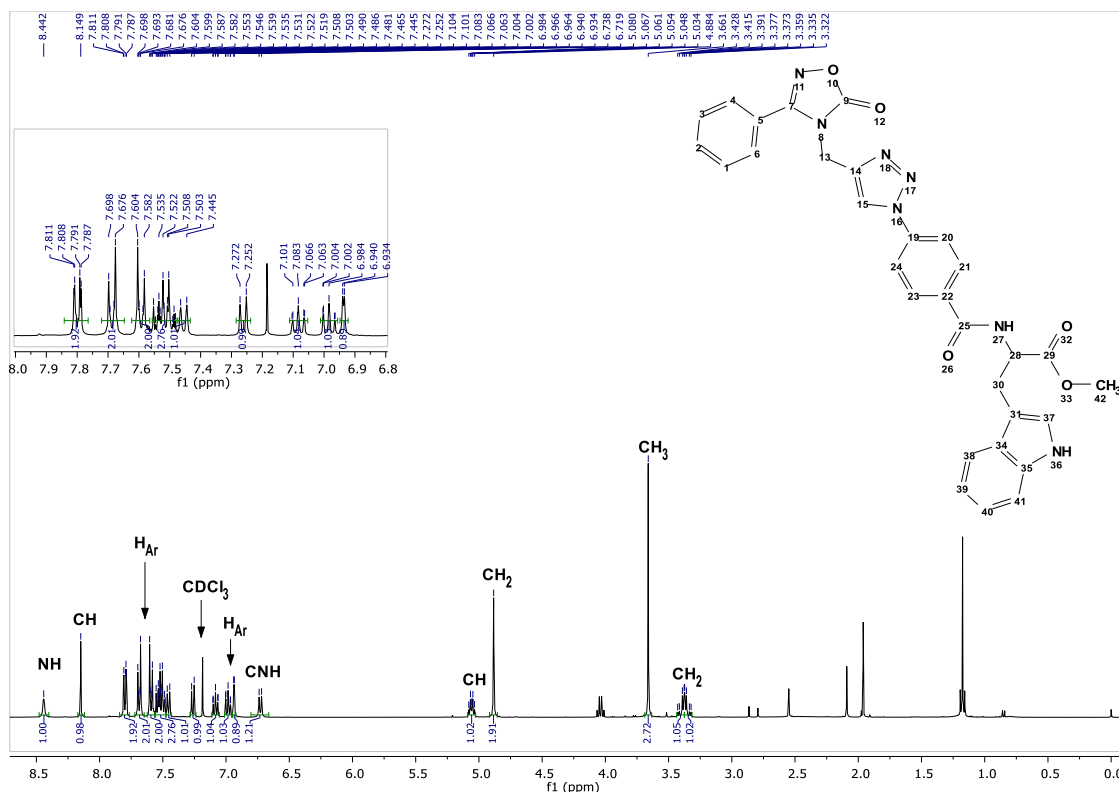
WHITE, Donald A. Alkylations with Potassium Carbonate in Dimethylformamide. **Synthetic Communications**, [S.L.], v. 7, n. 8, p. 559-568, jan. 1977. Informa UK Limited. Catalyzed 'Click Chemistry' from Azides and Acetylene Gas. **Synlett**, 2009. v. 9, p. 1453-1456. XU, Le-Cun *et al.* Synthesis and Evaluation of Hydroxamamide-Based Tetradentate Ligands as a New Class of Thiol-Free Chelating Molecules for ^{99m}Tc Radiopharmaceuticals. **Nuclear Medicine And Biology**, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 295-303, abr. 1998. Elsevier BV.

ZAMAN, Mohammad Amin; OPARIL, Suzanne; CALHOUN, David A Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 1, n. 8, p. 621-636, ago. 2002. Springer Science and Business Media LLC.

WU, L.-Y. *et al.* A Convenient Synthesis of 1-Substituted 1, 2, 3-Triazoles via CuI / Et 3 N

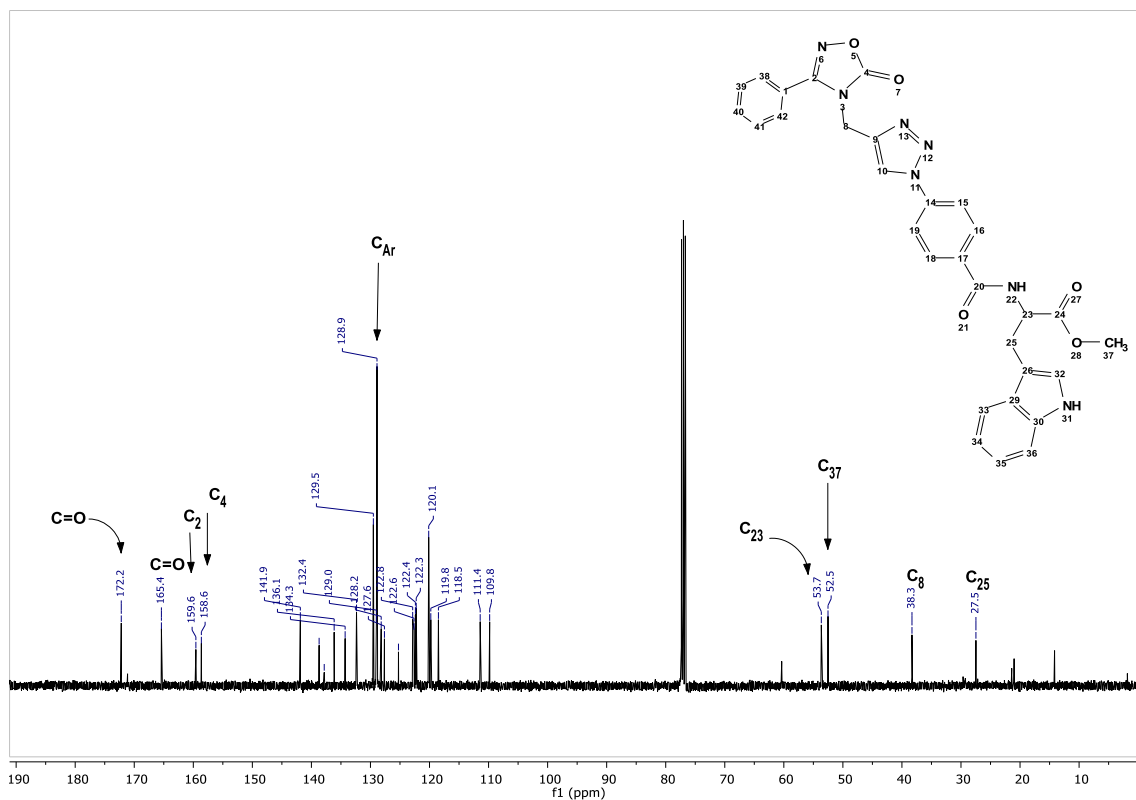
APÊNDICE A – ESPECTROS DE RMN

Figura 24 - Espectro de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) 11a.



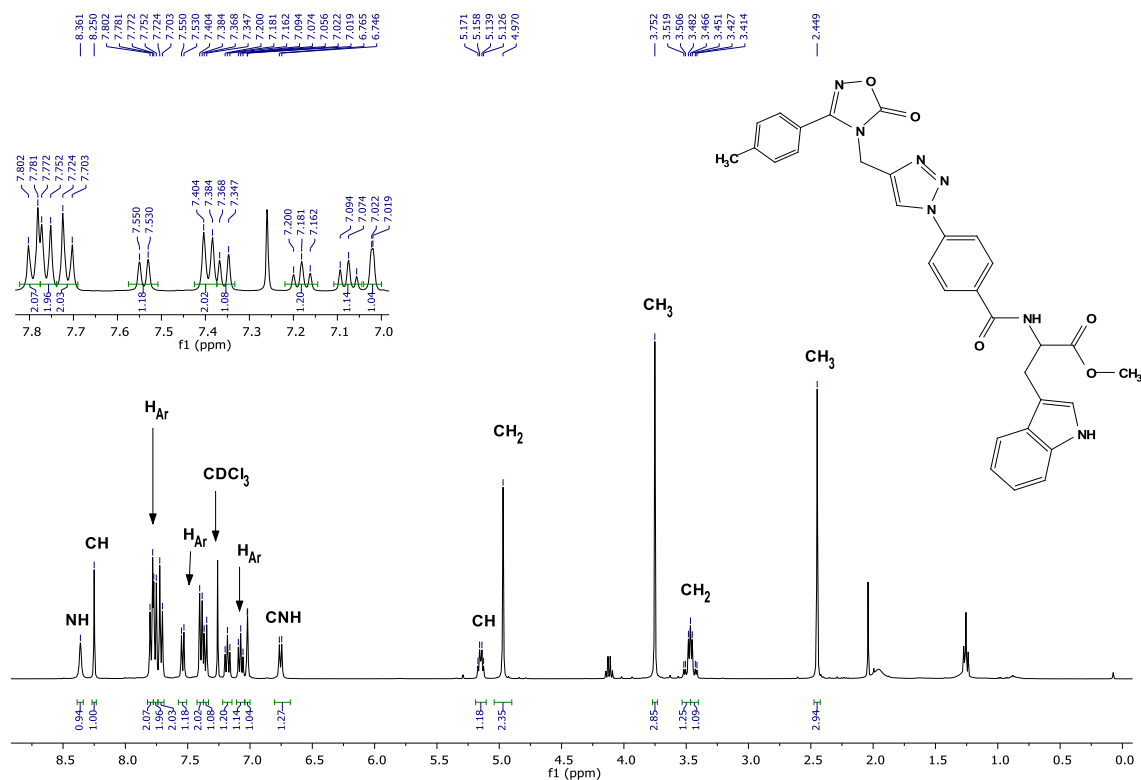
Fonte: A autora (2023)

Figura 25 - Espectro de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) 11a



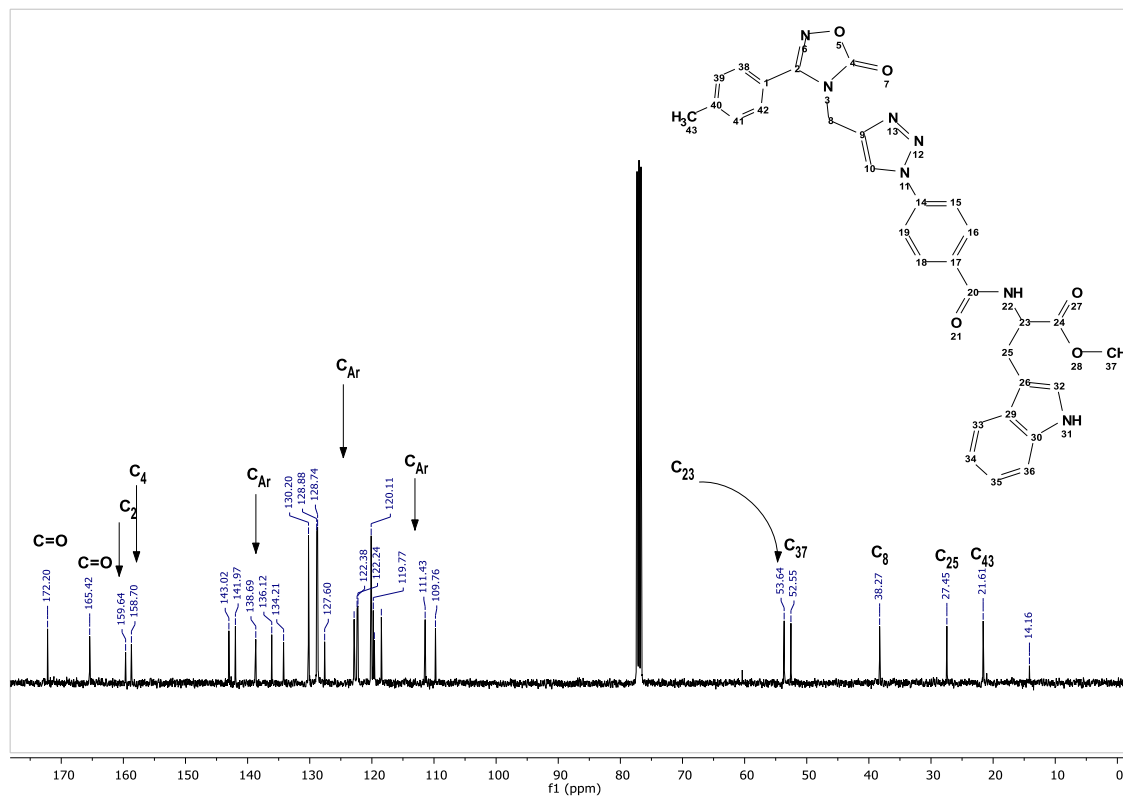
Fonte: A autora (2023)

Figura 26 - Espectro de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) **11b.**

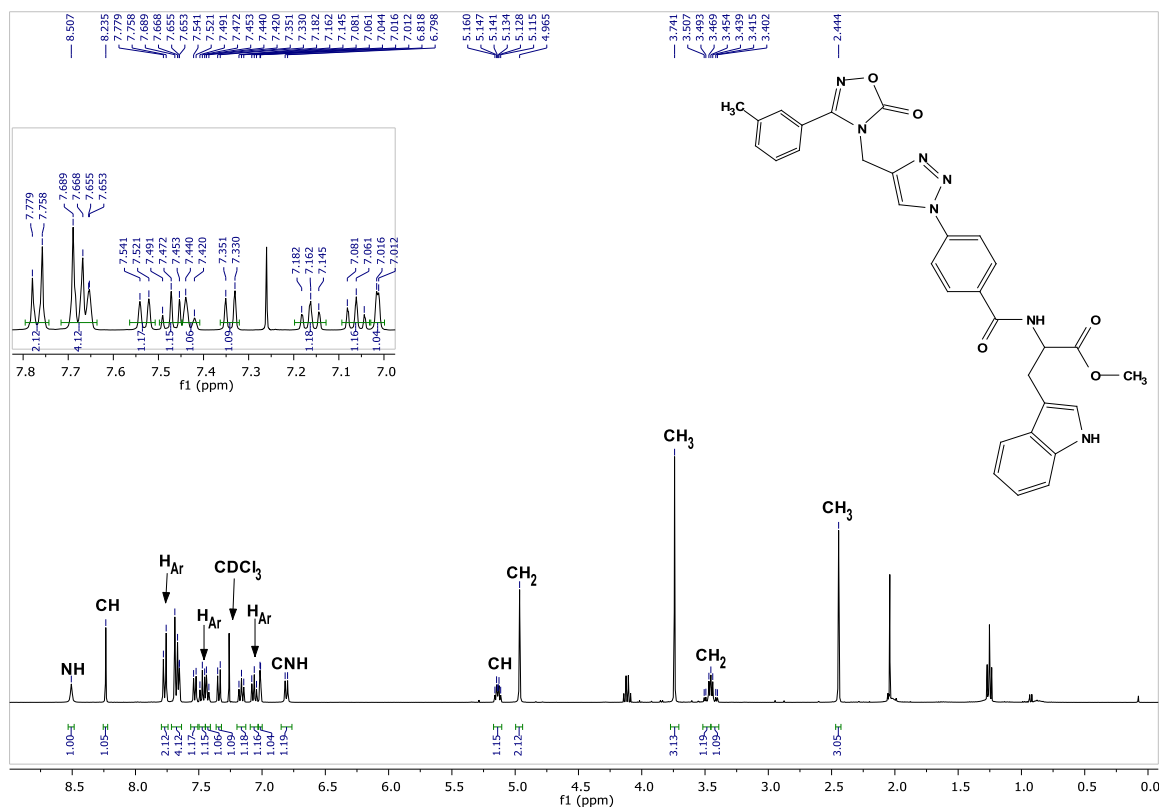


Fonte: A autora (2023)

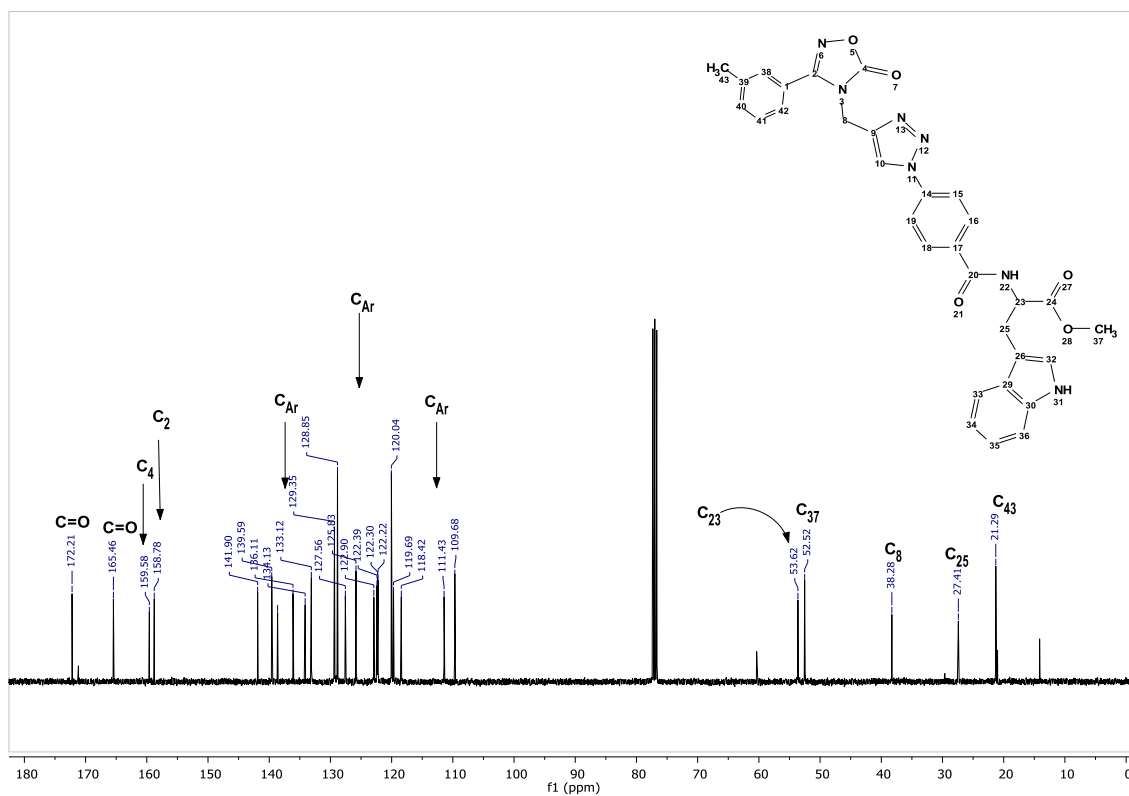
Figura 27 - Espectro de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) **11b.**



Fonte: A autora (2023)

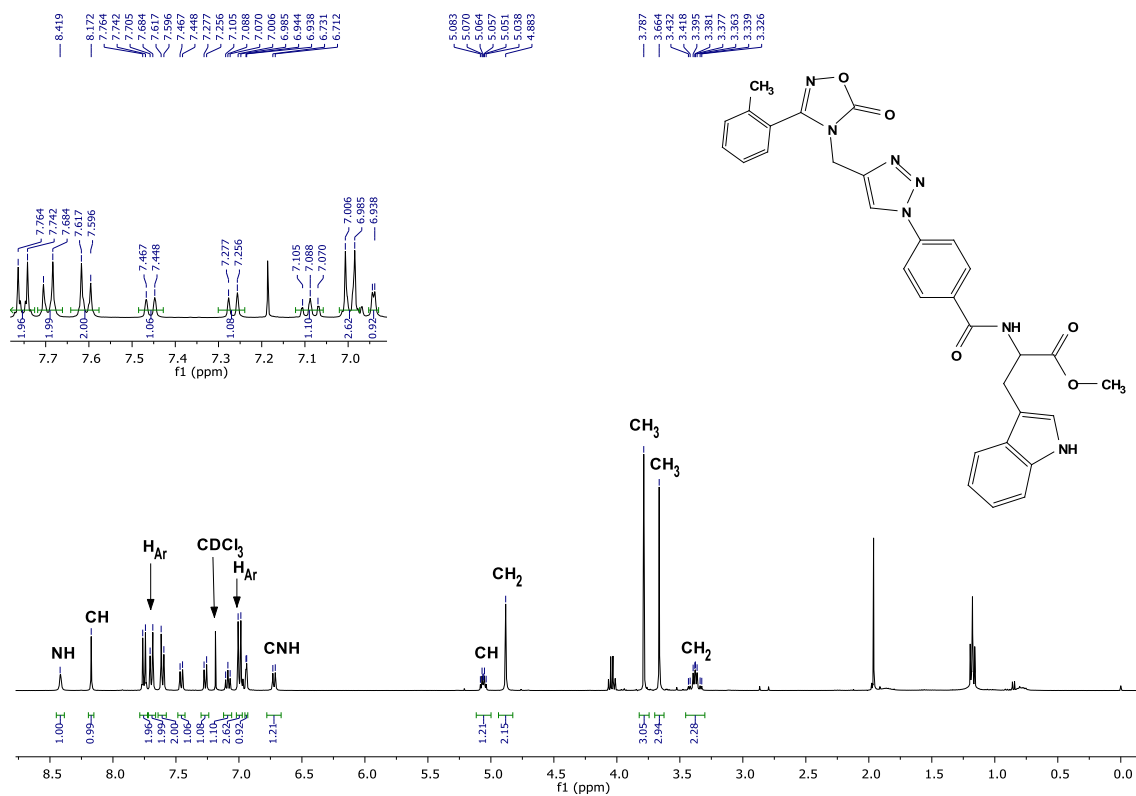
Figura 28 - Espectro de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) **11c**.

Fonte: A autora (2023)

Figura 29 - Espectro de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) **11c**.

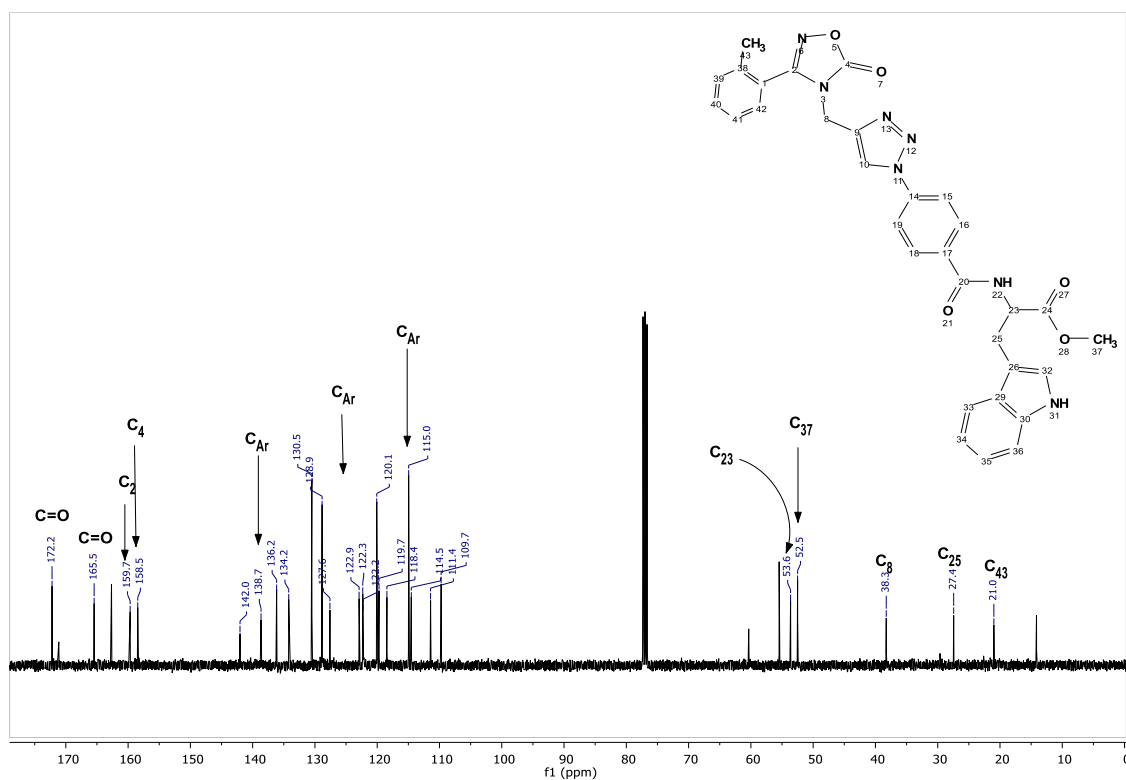
Fonte: A autora (2023)

Figura 30 - Espectro de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) 11d.

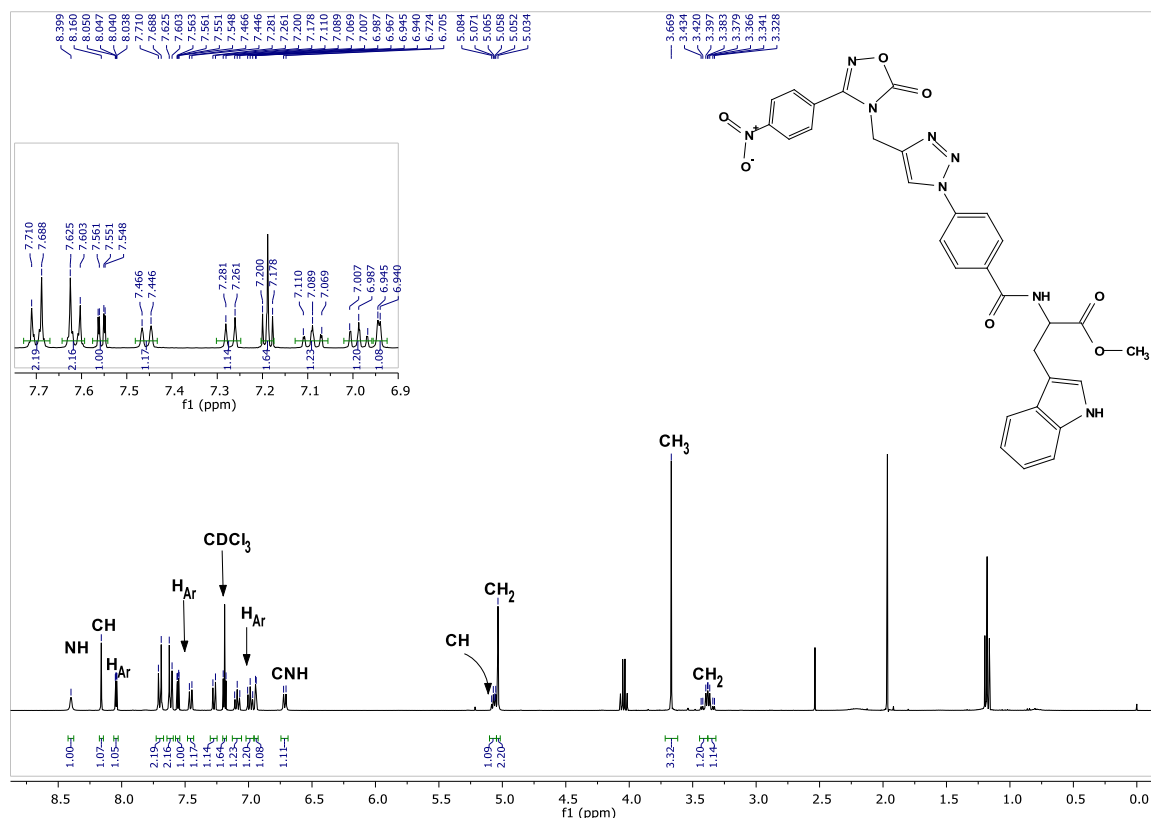


Fonte: A autora (2023)

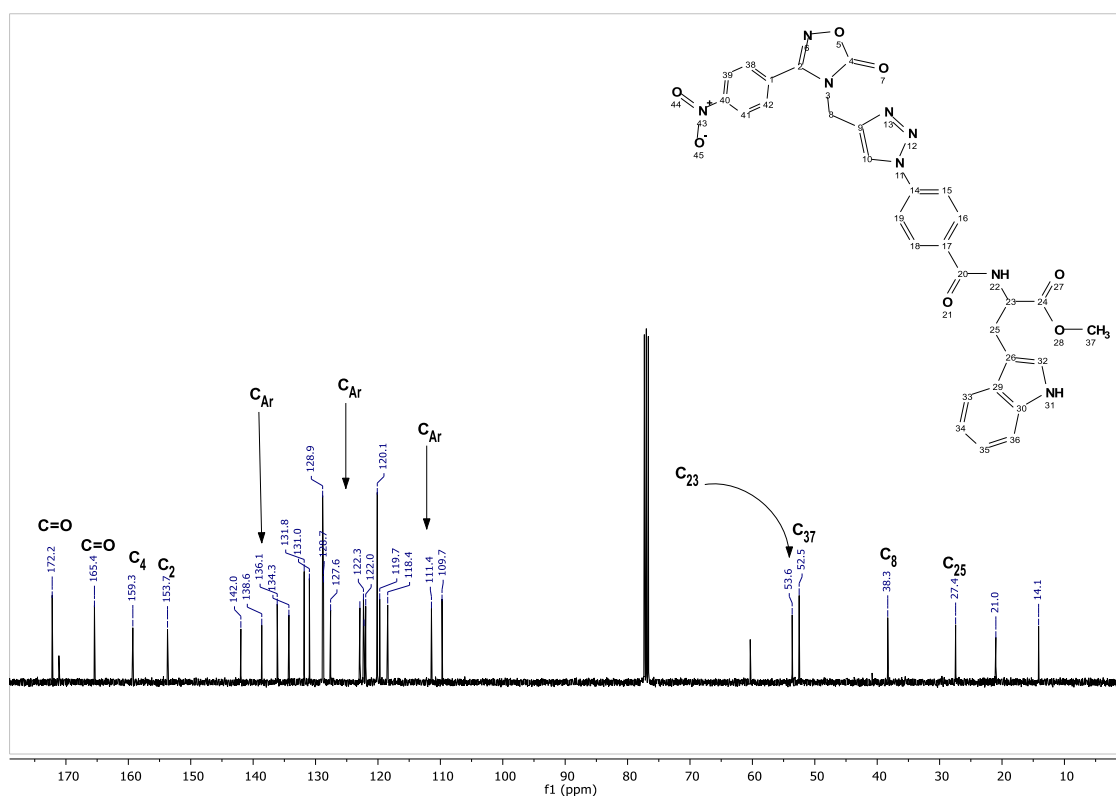
Figura 31 - Espectro de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) 11d.



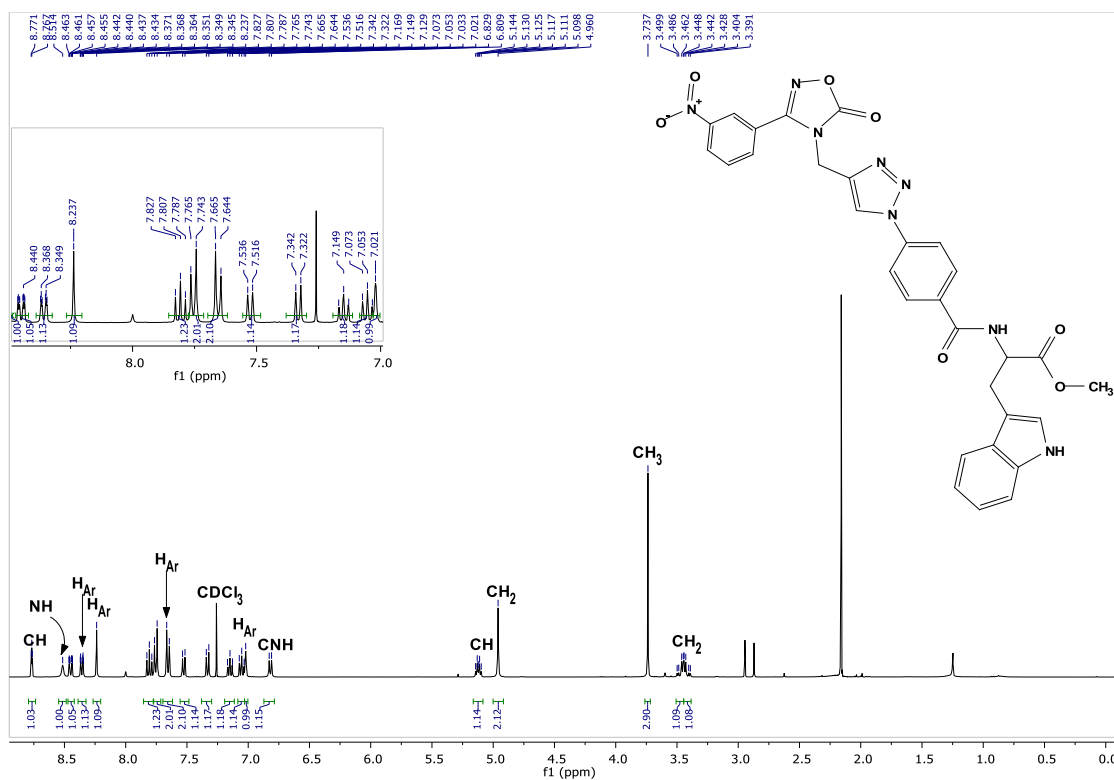
Fonte: A autora (2023)

Figura 32 - Espectro de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) 11e.

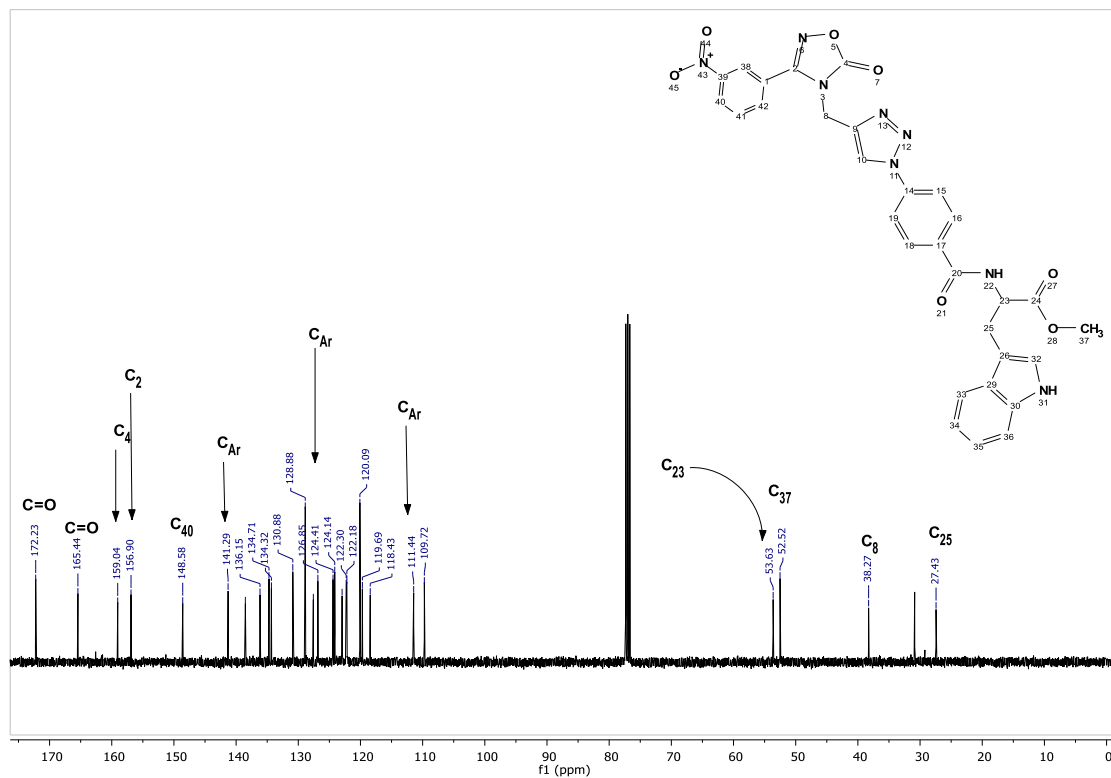
Fonte: A autora (2023)

Figura 33 - Espectro de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) 11e.

Fonte: A autora (2023)

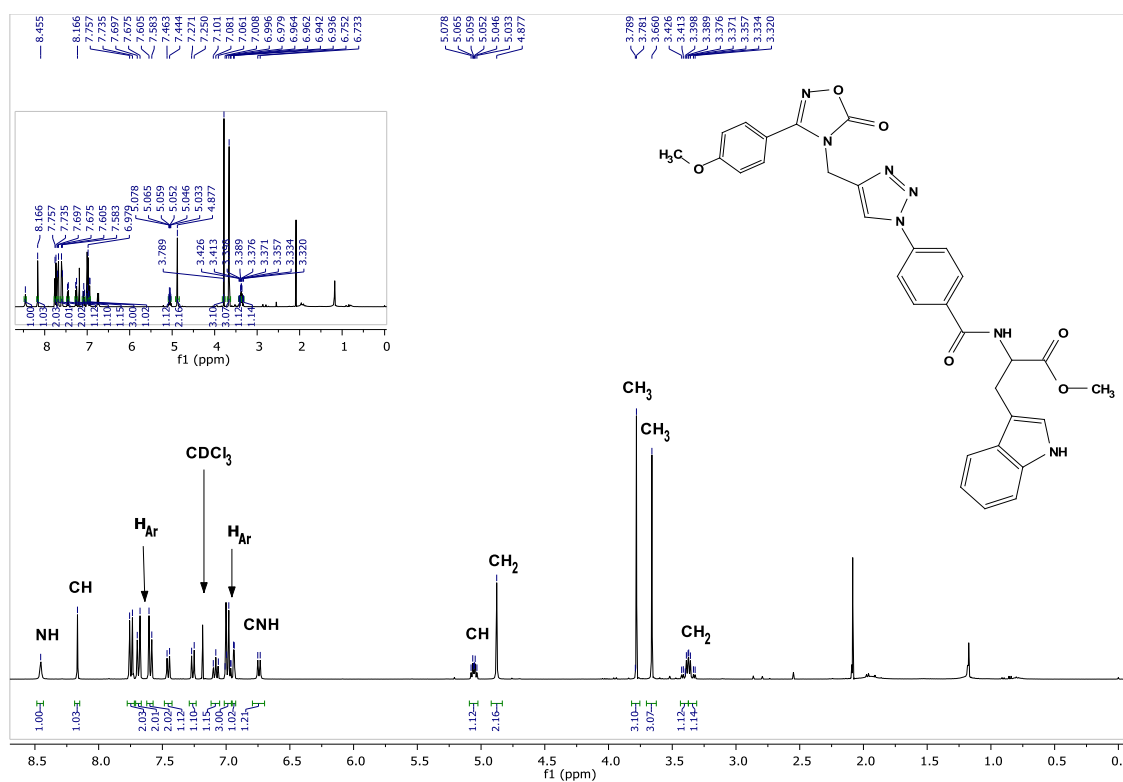
Figura 34 - Espectro de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) 11f.

Fonte: A autora (2023)

Figura 35 - Espectro de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) 11f.

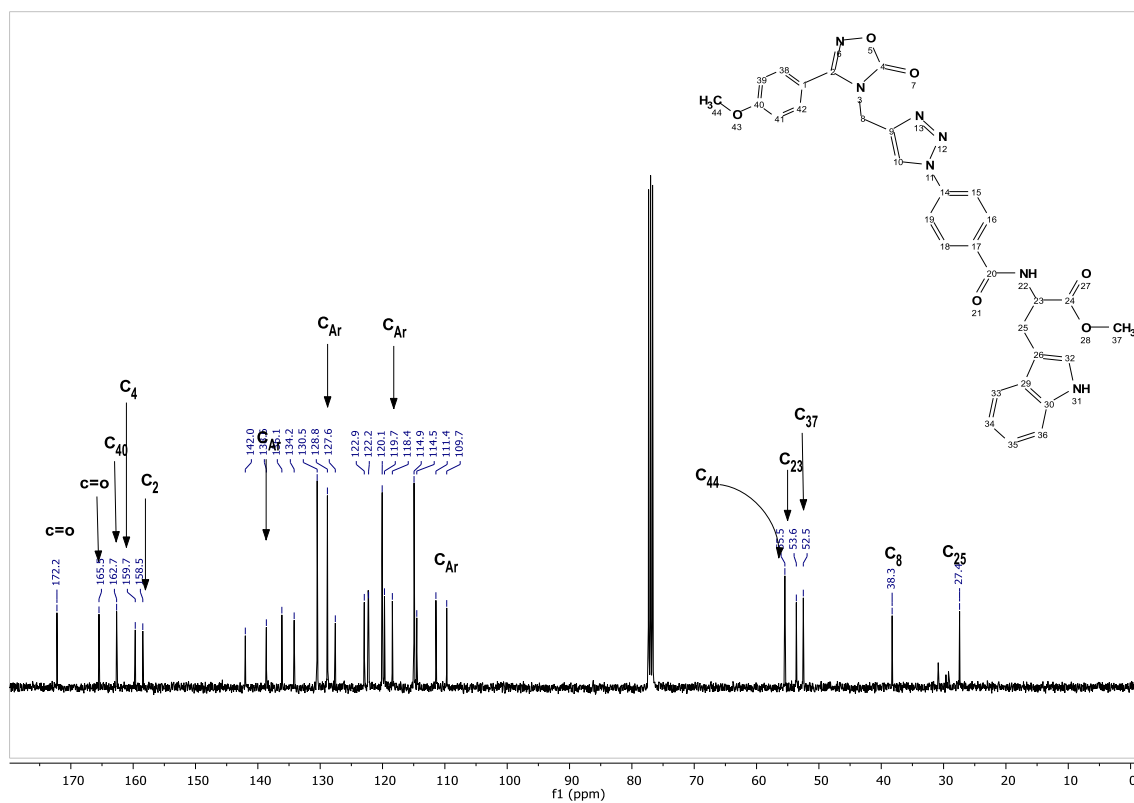
Fonte: A autora (2023)

Figura 36 - Espectro de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) **11g.**



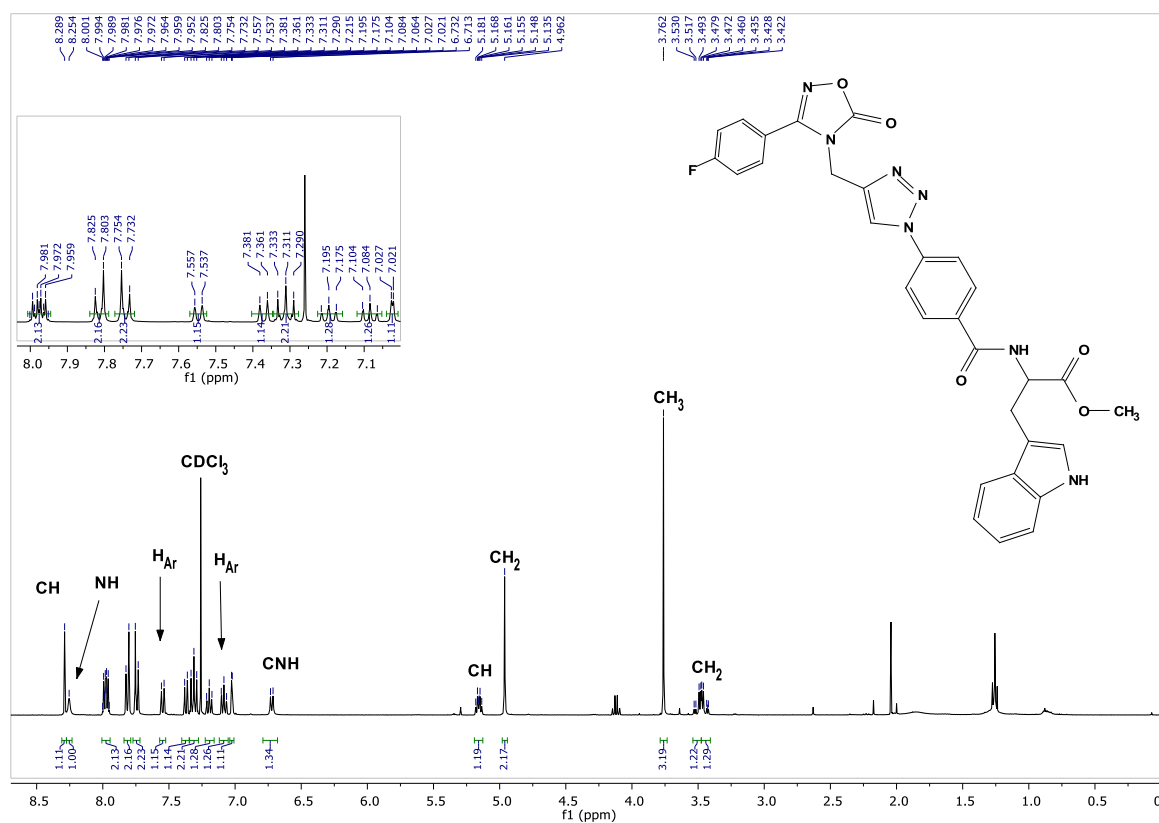
Fonte: A autora (2023)

Figura 37 - Espectro de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) **11g.**



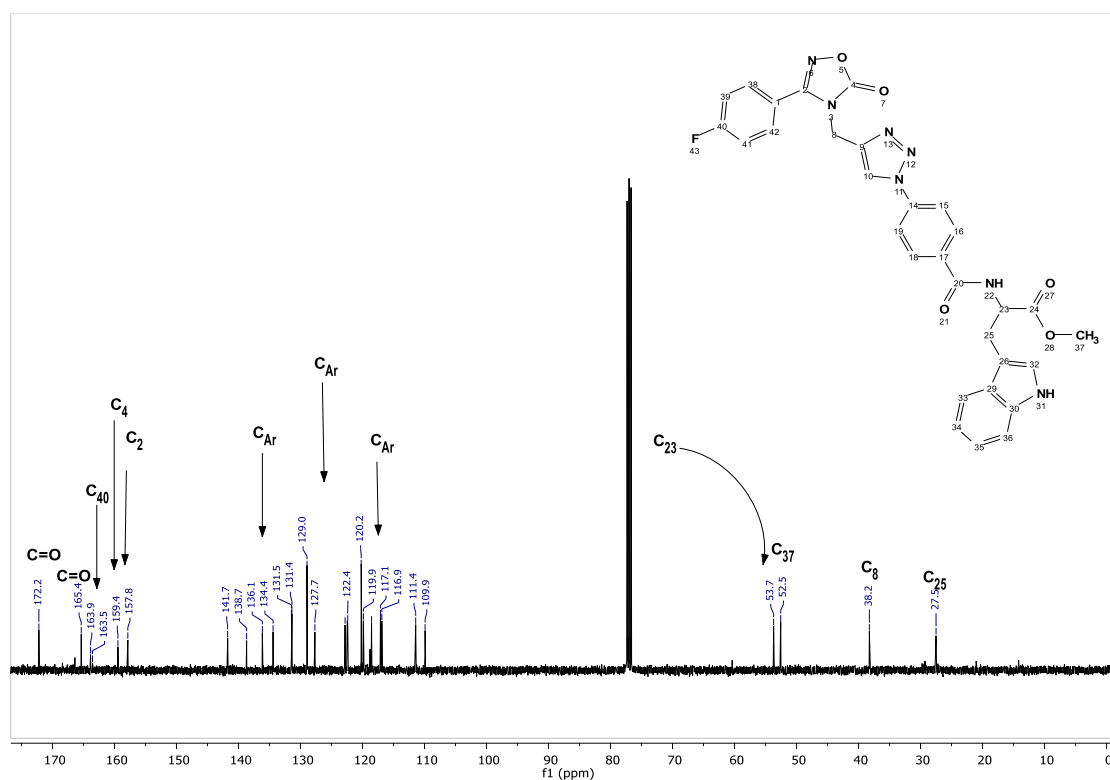
Fonte: A autora (2023)

Figura 38 - Espectro de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) 11h.



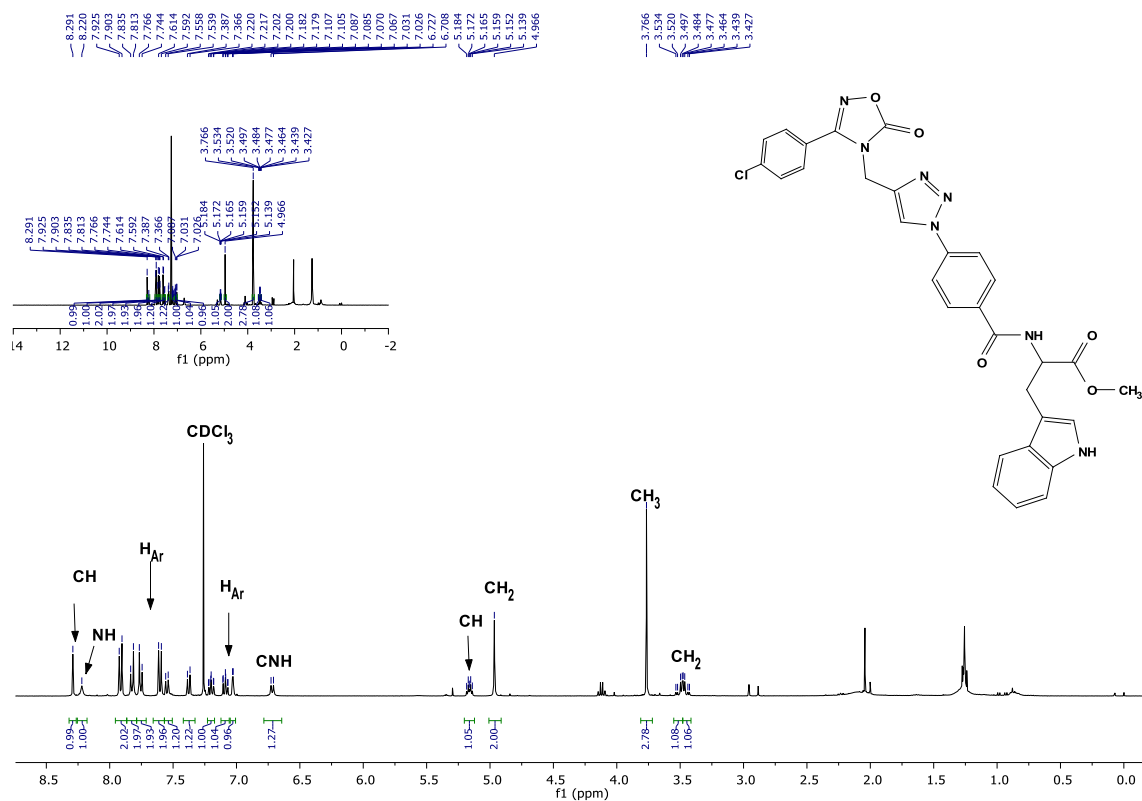
Fonte: A autora (2023)

Figura 39 - Espectro de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) 11h.



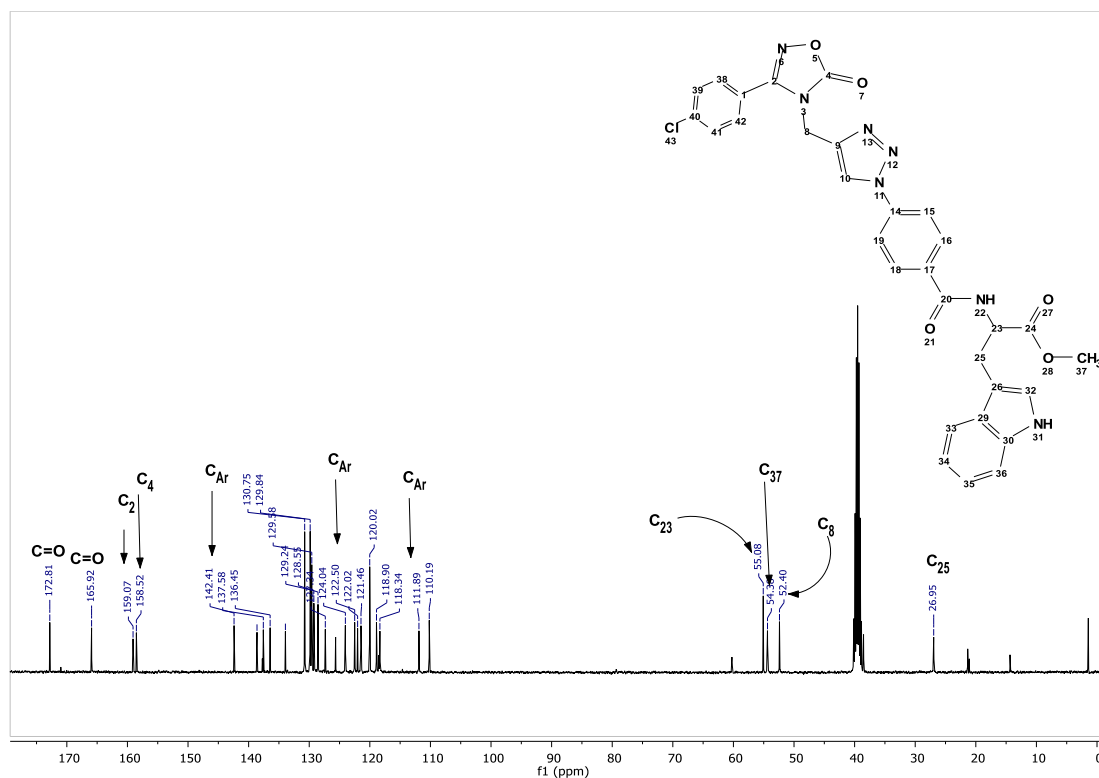
Fonte: A autora (2023)

Figura 40 - Espectro de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) 11i.



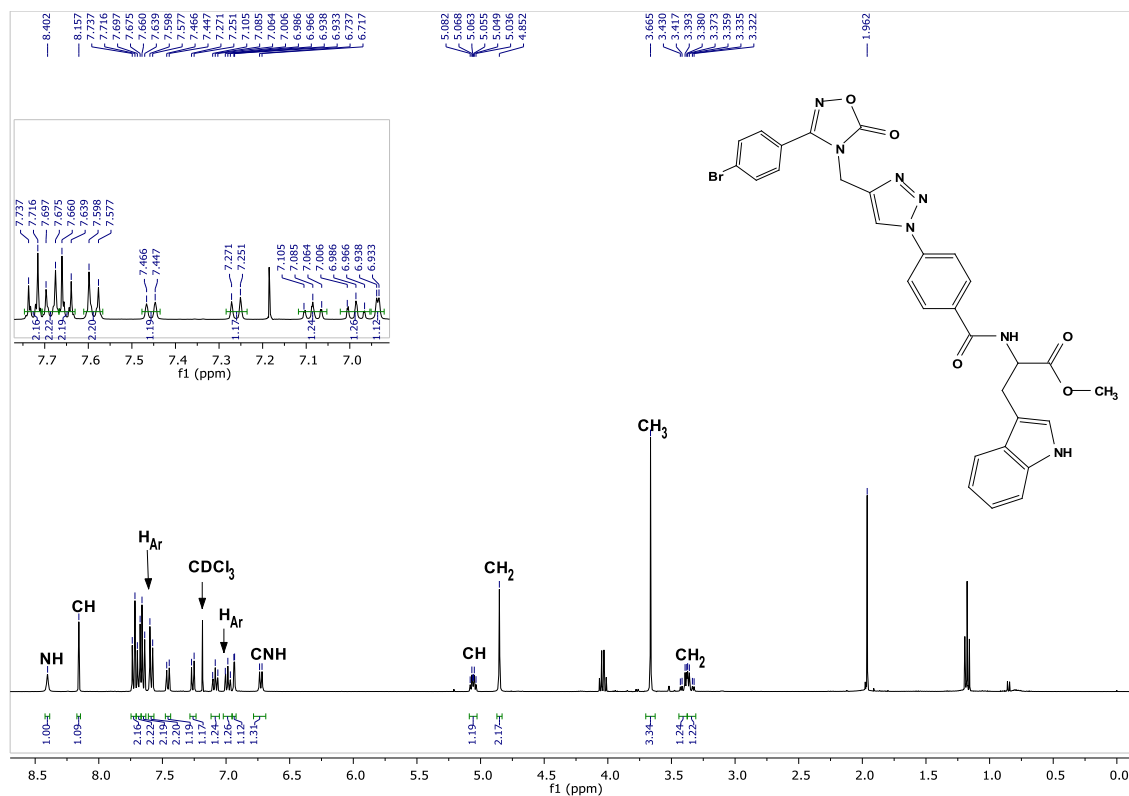
Fonte: A autora (2023)

Figura 41 - Espectro de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) 11i.



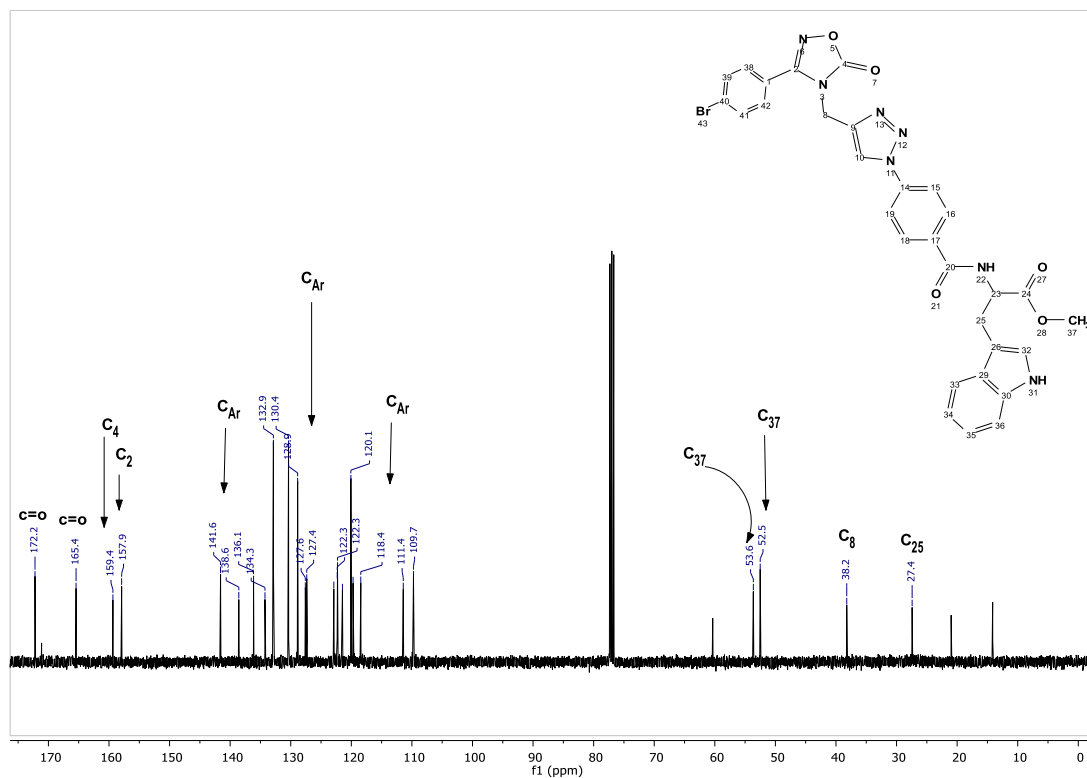
Fonte: A autora (2023)

Figura 42 - Espectro de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) **11j.**



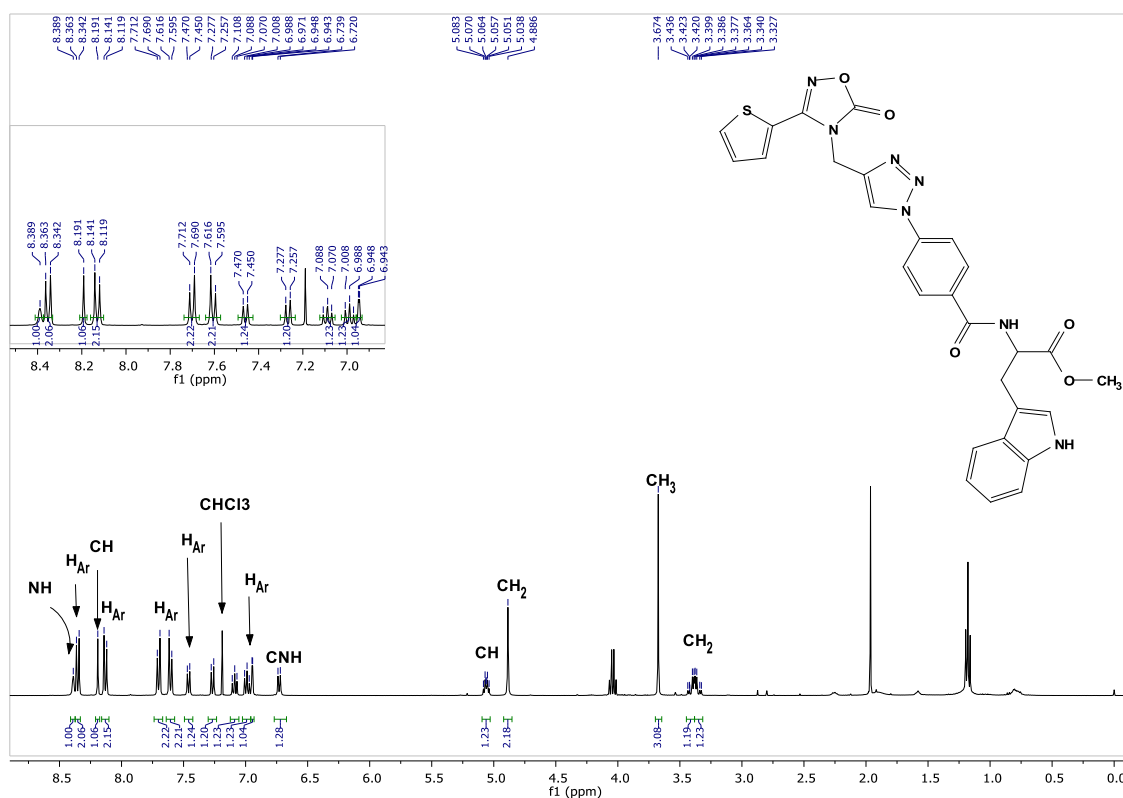
Fonte: A autora (2023)

Figura 43 - Espectro de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) 11j.



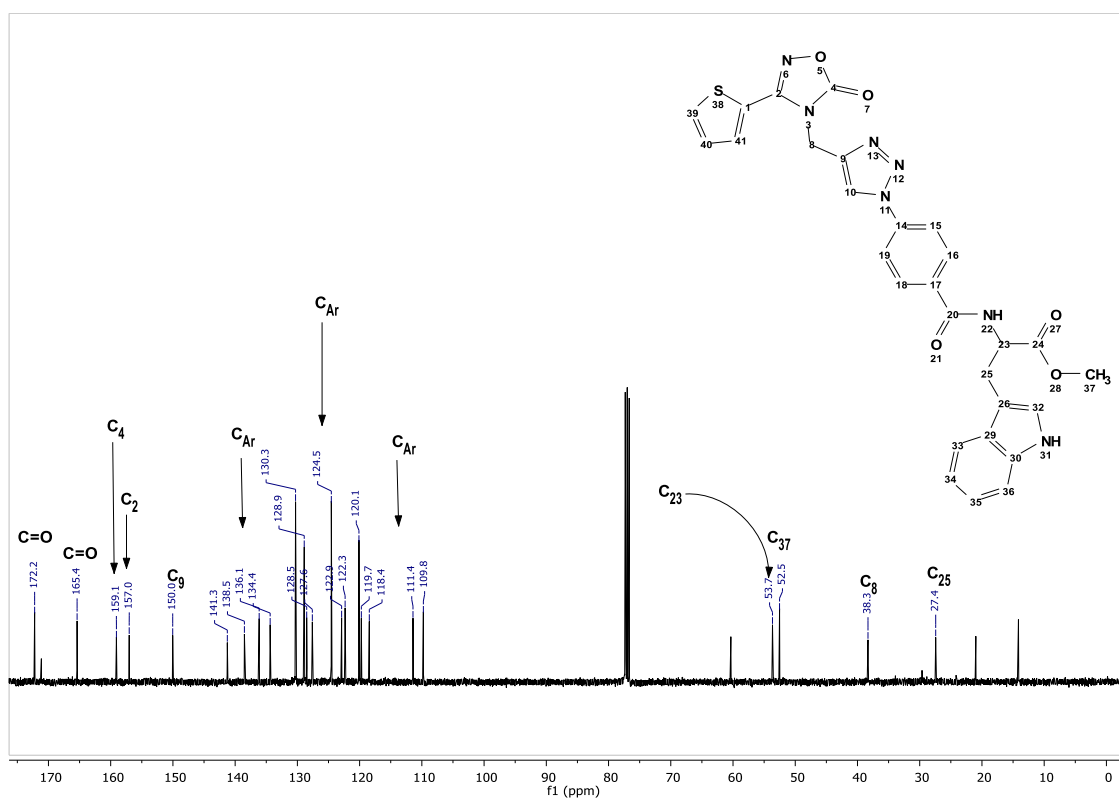
Fonte: A autora (2023)

Figura 44 - Espectro de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) 11k.



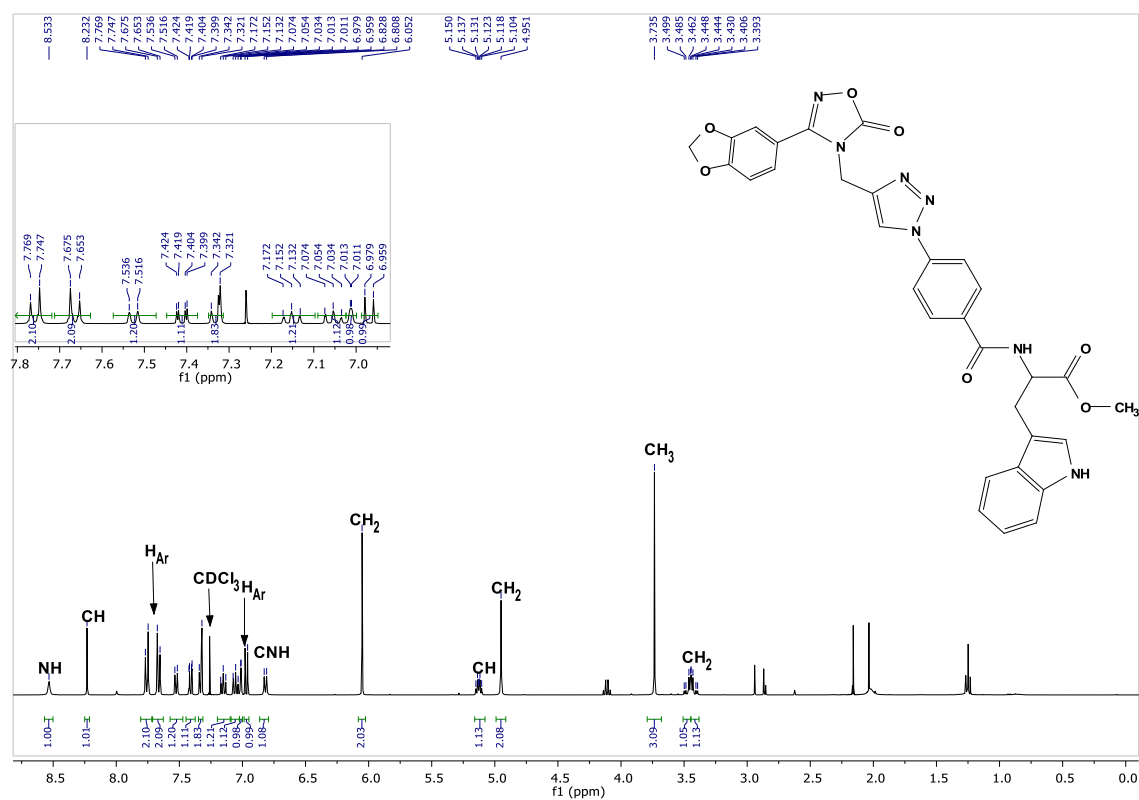
Fonte: A autora (2023)

Figura 45 - Espectro de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) 11k.



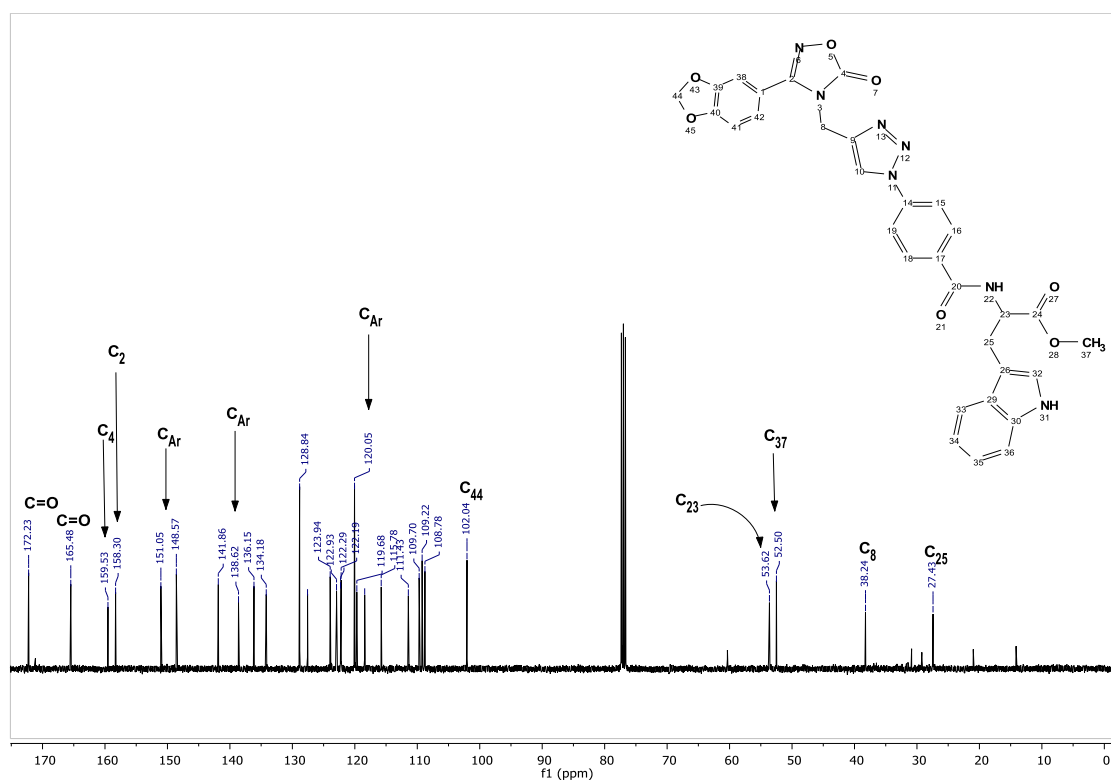
Fonte: A autora (2023)

Figura 46 - Espectro de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) 11l.



Fonte: A autora (2023)

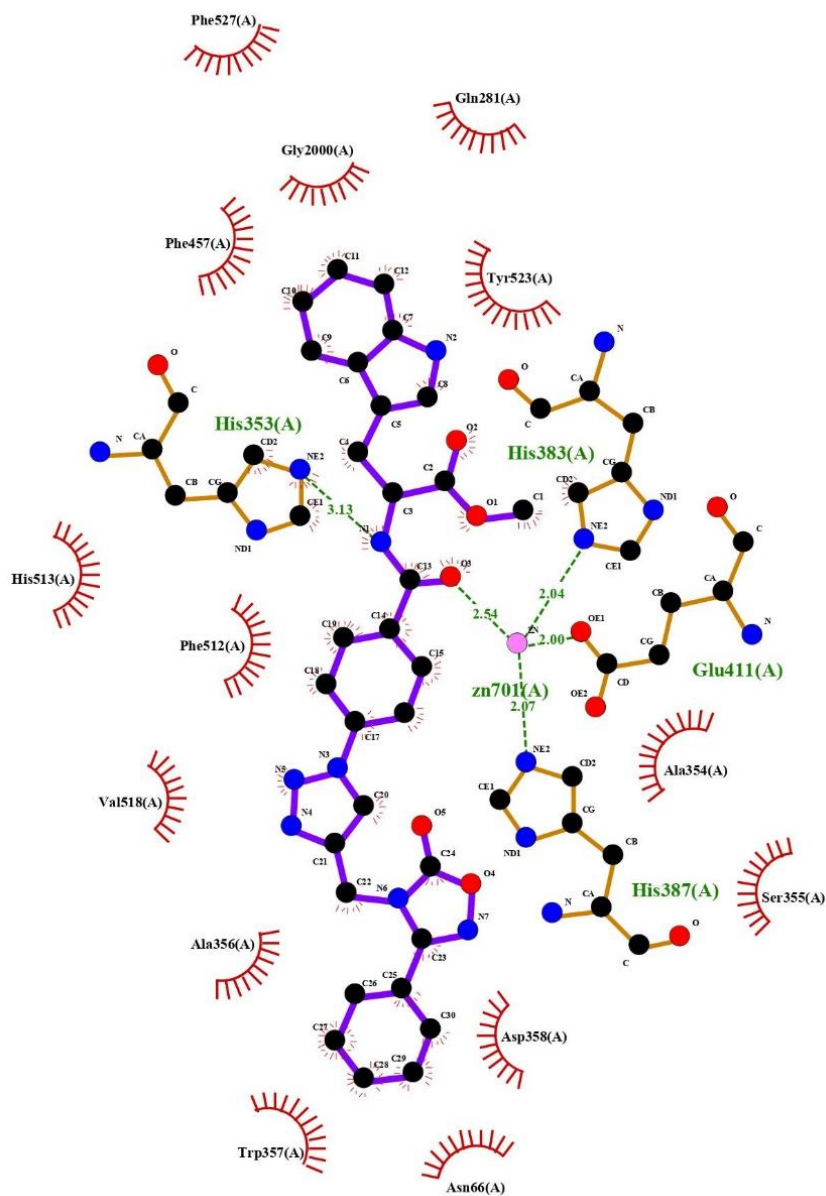
Figura 47 - Espectro de ^{13}C ($\text{CDCl}_3\text{-d}_6$, 100 MHz) 11l.



Fonte: A autora (2023)

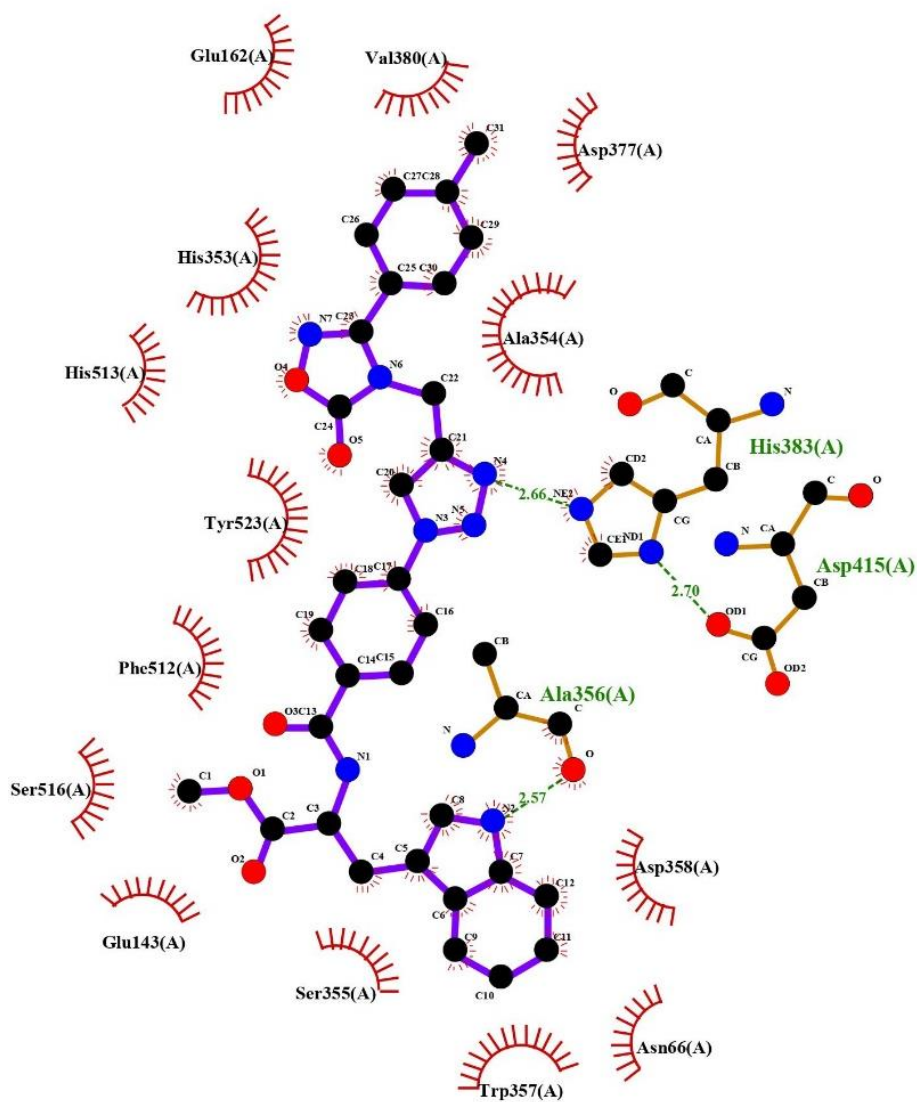
APÊNDICE B – COMPLEXOS DA SÉRIE (11a-l)

Figura 48 - Complexo referente a substância **11a** .



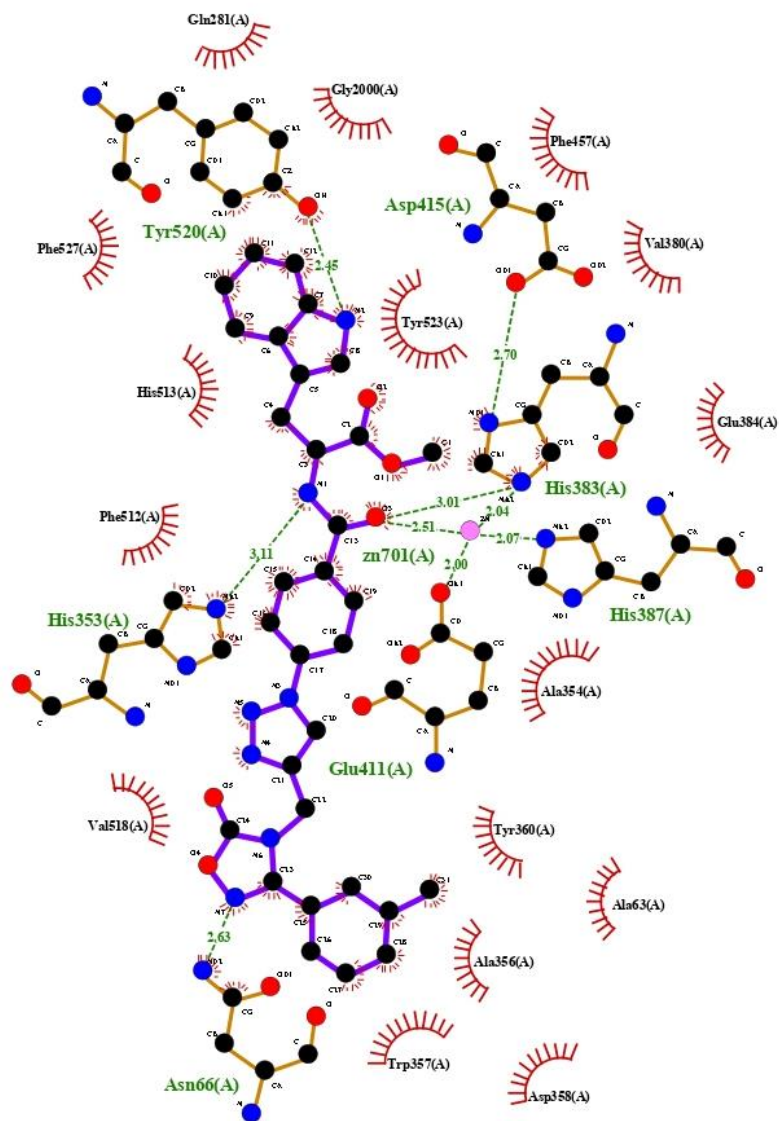
Fonte: A autora (2023)

Figura 49 - Complexo referente a substância 11b .



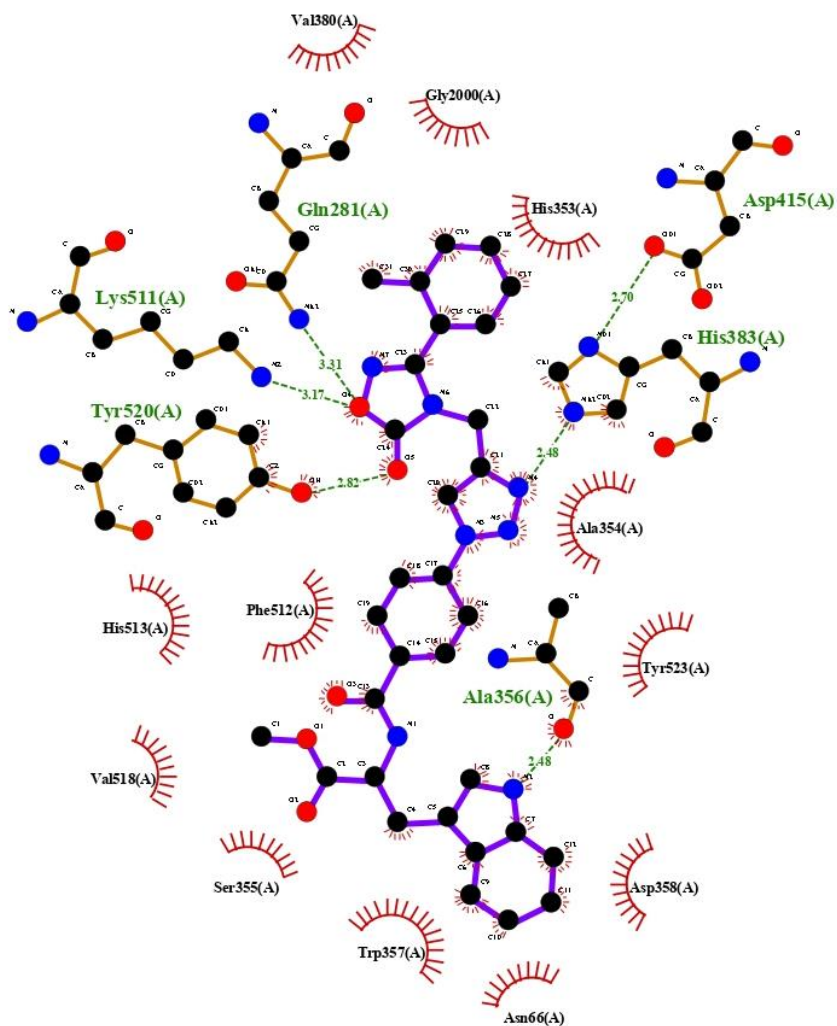
Fonte: A autora (2023)

Figura 50 - Complexo referente a substância 11c.



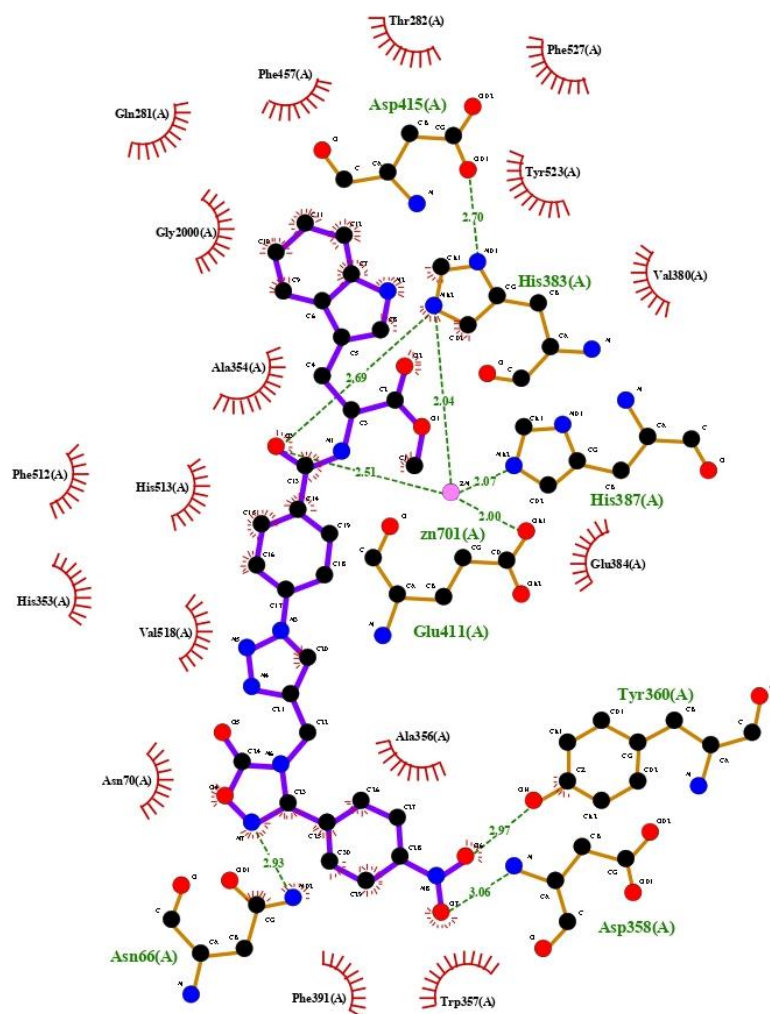
Fonte: A autora (2023)

Figura 51 - Complexo referente a substância 11d.



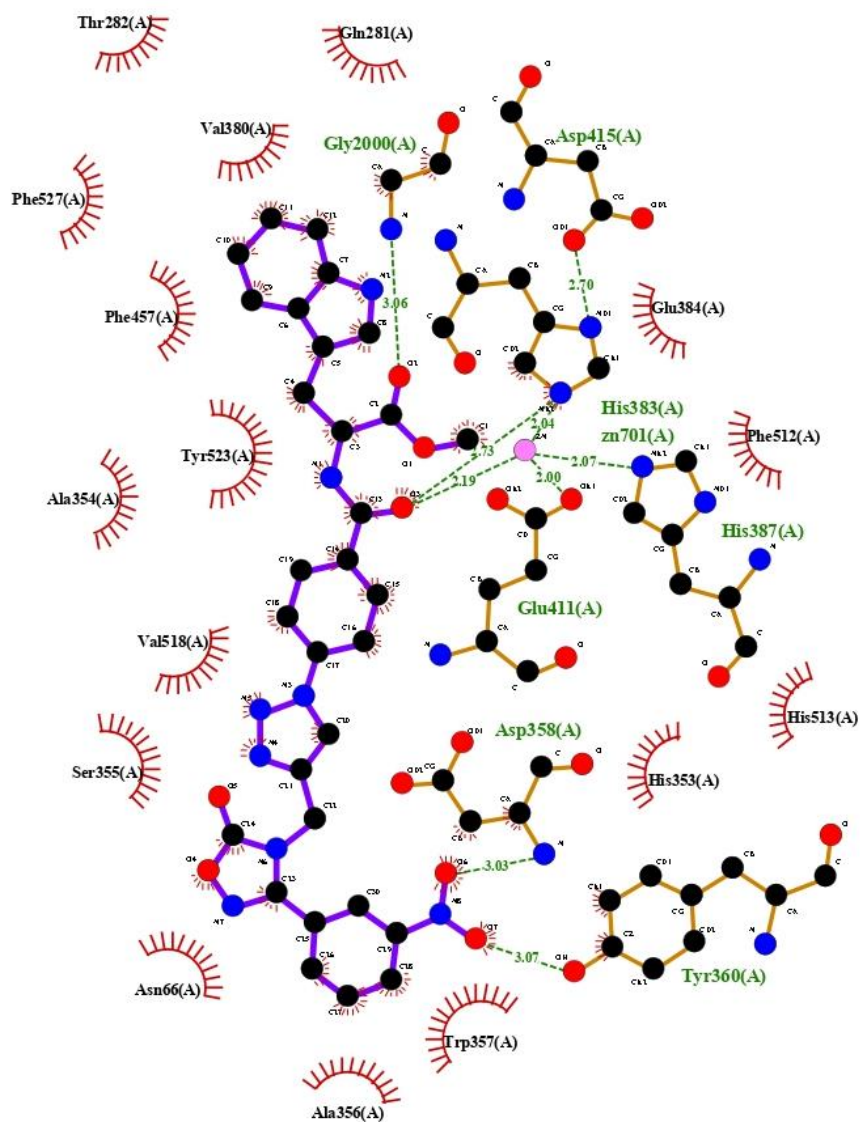
Fonte: A autora (2023)

Figura 52 - Complexo referente a substância 11e.



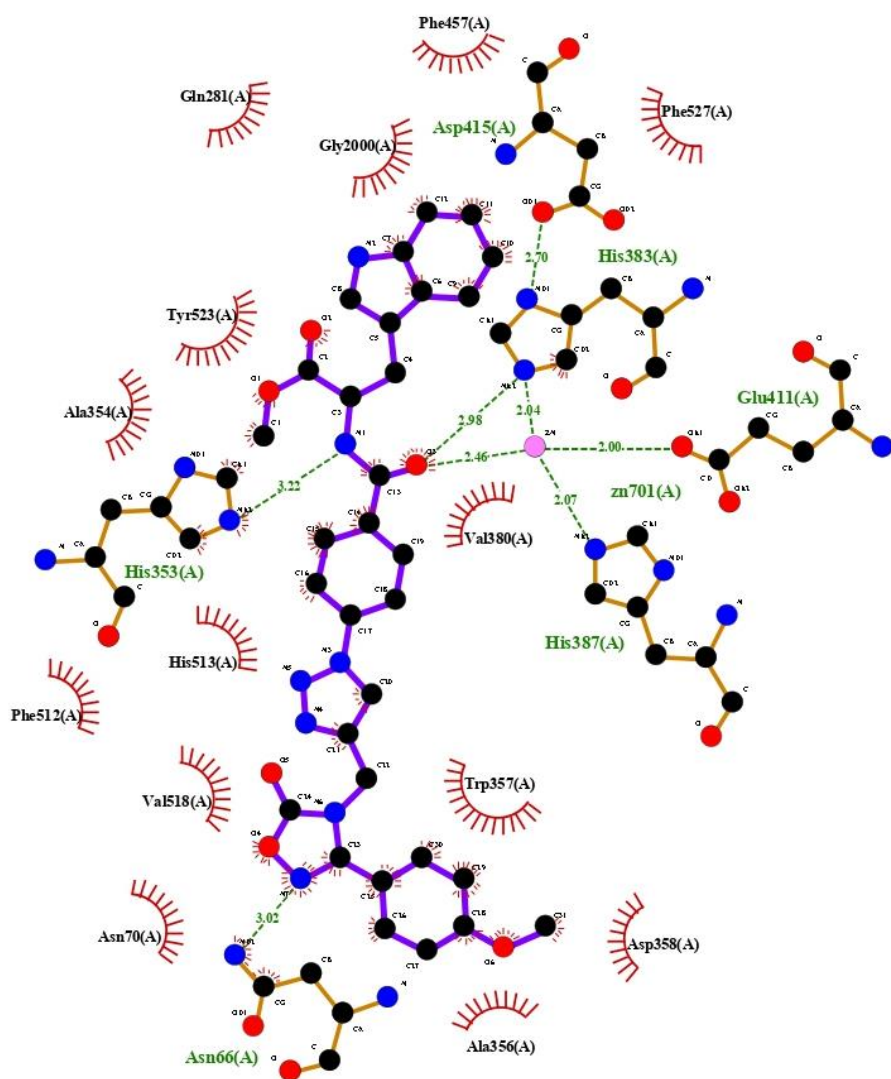
Fonte: A autora (2023)

Figura 53 - Complexo referente a substância 11f.



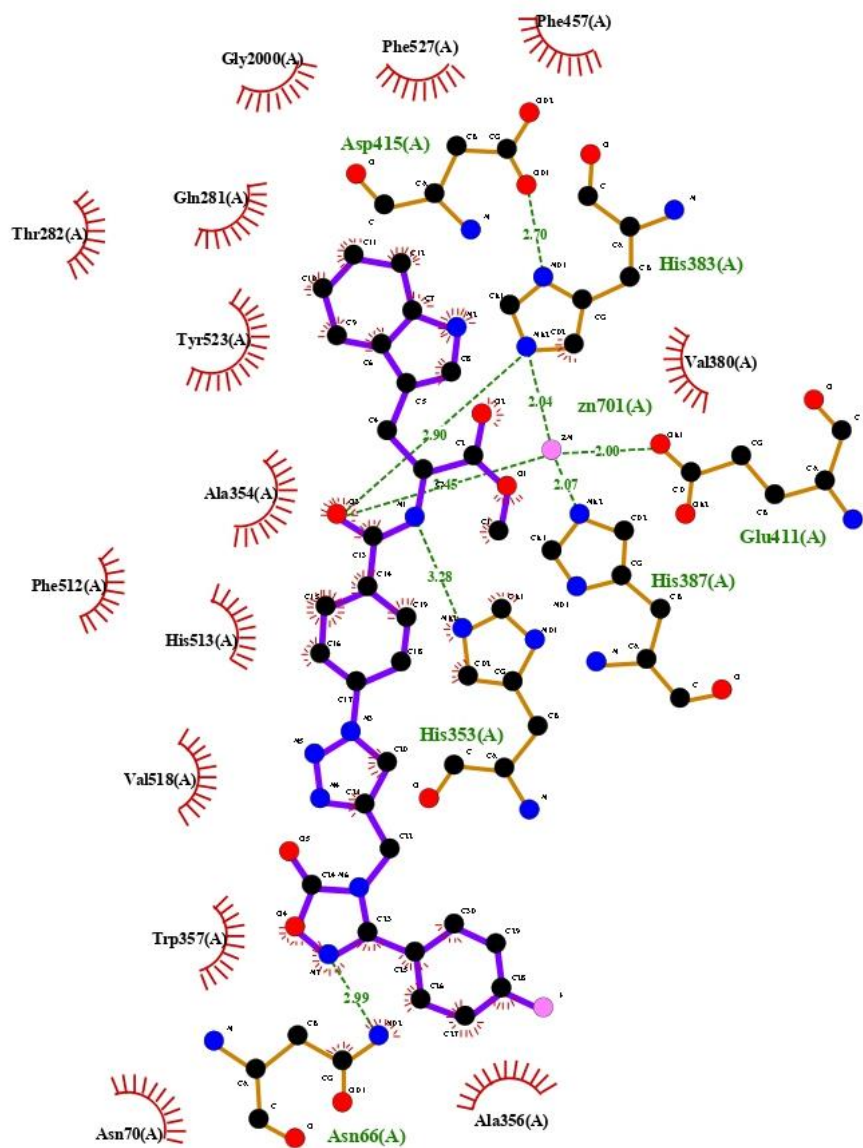
Fonte: A autora (2023)

Figura 54 - Complexo referente a substância 11g.



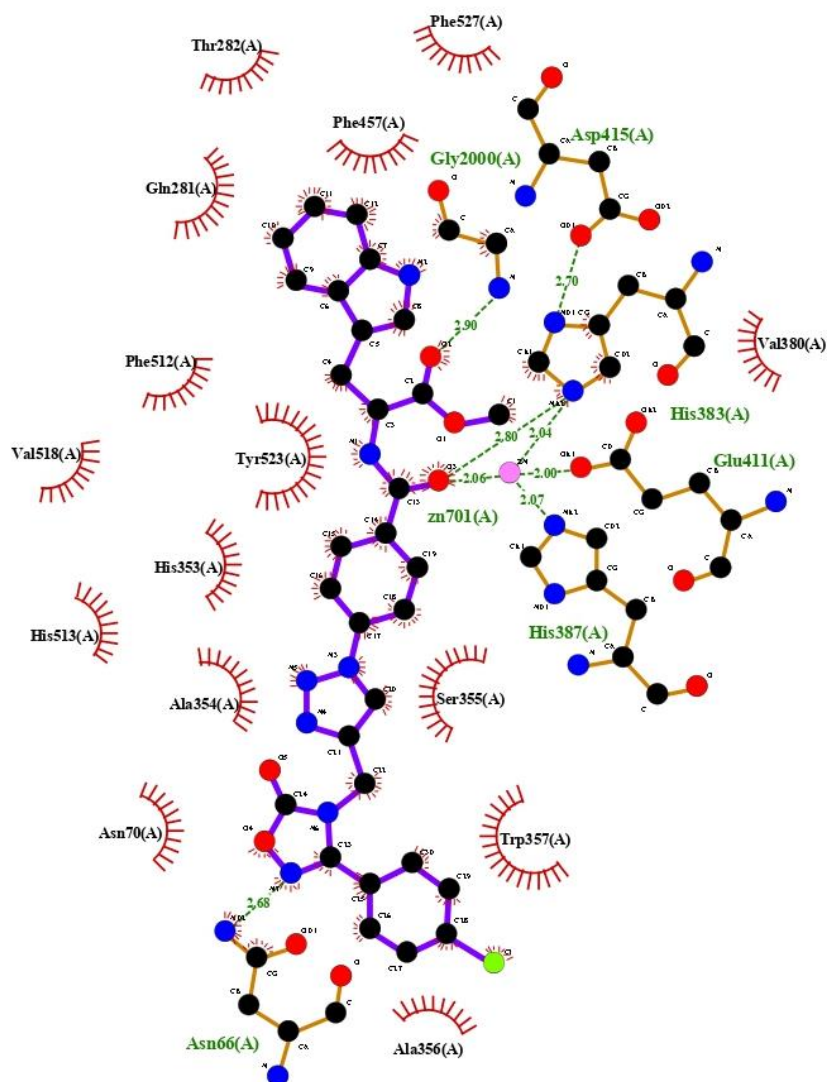
Fonte: A autora (2023)

Figura 55 - Complexo referente a substância 11h.



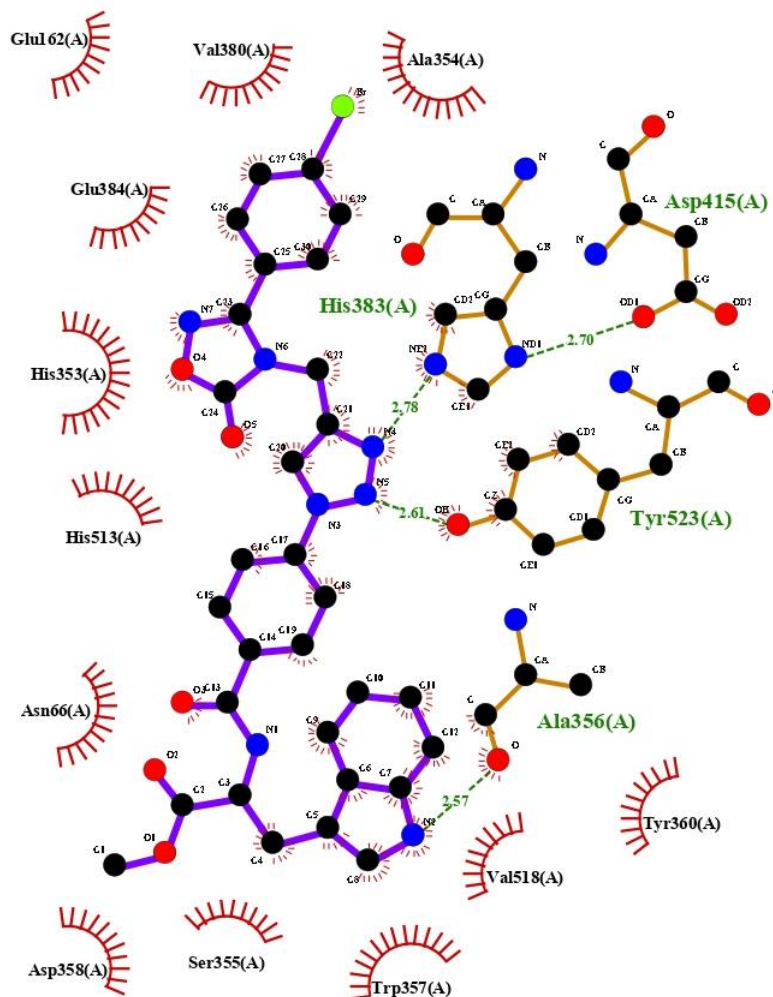
Fonte: A autora (2023)

Figura 56 - Complexo referente a substância **11i**.



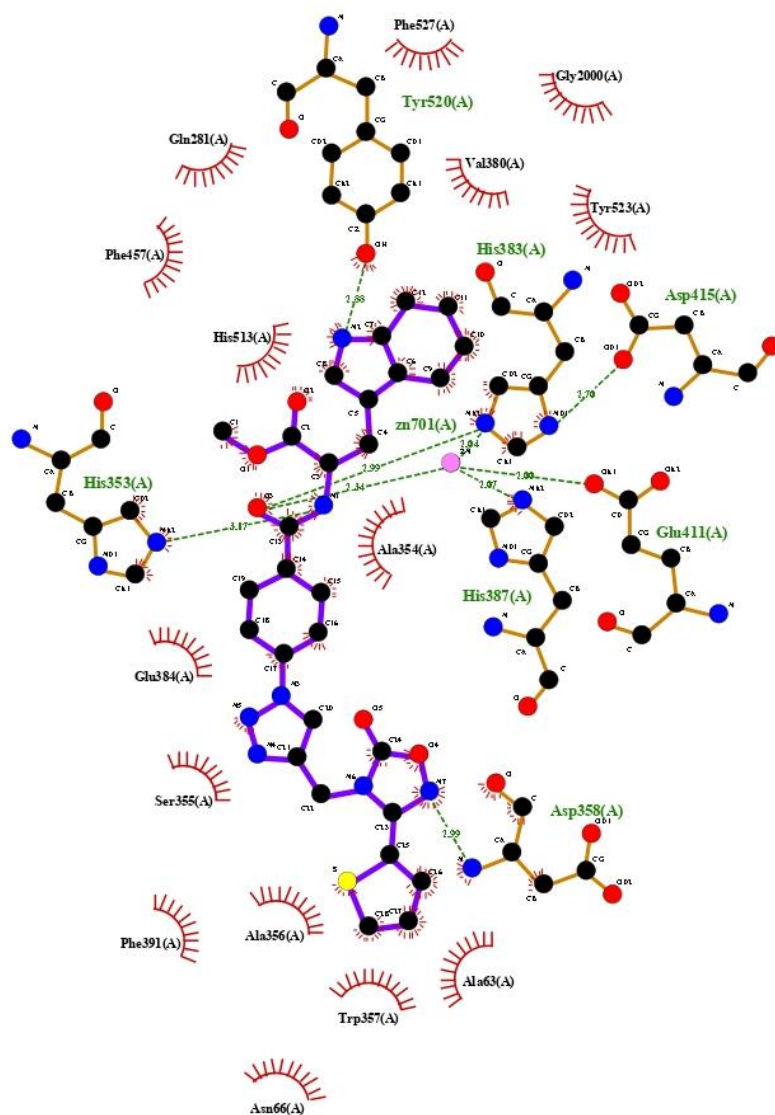
Fonte: A autora (2023)

Figura 57 - Complexo referente a substância 11j.



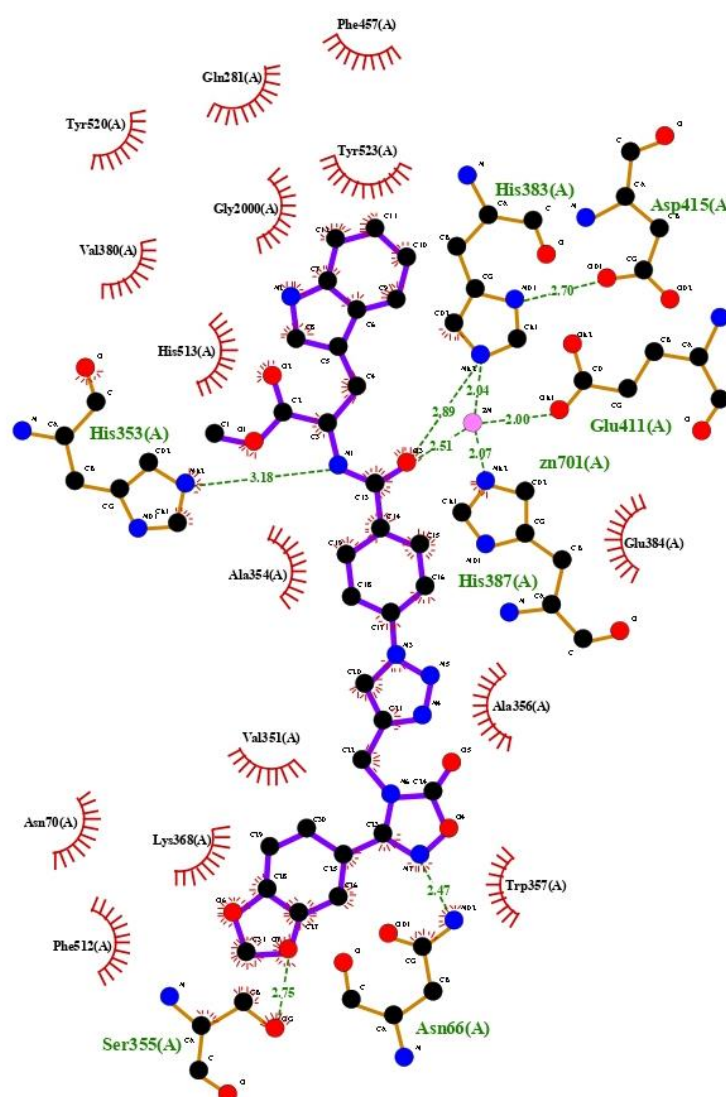
Fonte: A autora (2023)

Figura 58 - Complexo referente a substância 11k.



Fonte: A autora (2023)

Figura 59 - Complexo referente a substância 11l.



Fonte: A autora (2023)