

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DA BENZOAMIDOXIMA

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF THE *IN VITRO* ANTIOXIDANT ACTIVITY OF BENZOAMIDOXIME

Claudicéia Maria dos Santos Oliveira

Cmso@dicente.ifpe.edu.br

Prof. Dr. Jonh Anderson Macêdo Santos

Jonh.santos@barreiros.ifpe.edu.br

RESUMO

A importância das amidoximas é incontestável devido ao seu amplo espectro de aplicações tanto na química medicinal quanto na área de materiais. A benzoamidoxima, em particular, é um exemplo que apresenta diferentes atividades biológicas e aplicações sintéticas e tecnológicas. Nessa perspectiva, esse trabalho teve como objetivo sintetizar e estudar as suas propriedades. A benzoamidoxima foi obtida na forma de um sólido cristalino com um rendimento de 75% através da reação da benzonitrila com o cloridrato de hidroxilamina na presença de uma solução hidroetanólica, sob banho ultrassônico. As técnicas de espectrometria de massas e ressonância magnética de hidrogênio (RMN 1H) e carbono (RMN 13C) foram empregadas para confirmar a formação do produto e os dados estão de acordo com a estrutura do composto. A capacidade antioxidante da benzoamidoxima foi avaliada através dos métodos do DPPH, ABTS e poder redutor. Os ensaios revelaram uma forte atividade antioxidante para os diferentes métodos testados. Sugerindo que este composto possui um grande potencial como candidato a fármaco.

Palavras-chave: amidoxima; síntese orgânica; atividade biológica.

ABSTRACT

The importance of amidoximes is undeniable due to their wide spectrum of applications both in medicinal chemistry and in the area of materials. Benzoamidoxime, in particular, is an example that presents different biological activities and synthetic and technological applications. From this perspective, this work aimed to synthesize and study its properties. Benzoamidoxime was obtained in the form of a crystalline solid in a yield of 75% through the reaction of benzonitrile with hydroxylamine hydrochloride in the presence of a hydroethanolic solution under an ultrasonic bath. Hydrogen (1H NMR) and carbon (13C NMR) mass spectrometry and magnetic resonance techniques were used to confirm the formation of the product and the data are in

agreement with the structure of the compound. The antioxidant capacity of benzoamidoxime was evaluated using the DPPH, ABTS and reducing power methods. The tests revealed a strong antioxidant activity for the different methods tested. Suggesting that this compound has great potential as a drug candidate.

Keywords: amidoxime; organic synthesis; biological activity.

1 INTRODUÇÃO

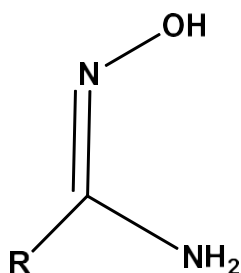
As amidoximas são uma classe de compostos de interesse sintético e podem servir como materiais de partida para a síntese de compostos heterocíclicos e outros compostos valiosos. A sua utilização como materiais tem permitido uma ampla gama de aplicações em novos produtos farmacêuticos, agentes antitumorais, agentes antimalária, substratos de sintase de óxido nítrico (NOS), materiais têxteis aperfeiçoados, polímeros sintéticos e resinas quelantes (Freitas Filho *et al.*, 2015). Devido às amidoximas possuírem uma fórmula geral $RC(=NOH)NH_2$, onde R pode ser um grupo alquila ou arila, são denominadas óximas de hemiacetais (Schepetkin *et al.*, 2021).

A importância das amidoximas e seus derivados são incontestáveis, pois são empregados em diferentes áreas do conhecimento, especificamente na química sintética, atuando como os principais intermediários para síntese de compostos heterocíclicos.

O primeiro relato da síntese das amidoximas foi descrito por Lossen e Schifferdecker, em 1873, através da reação entre o ácido cianídrico com hidroxilamina, o que levou a um composto denominado R = alquila, arila R = H, ilustrado na figura 1, “*isuretin*”. No entanto, só em 1884 o nome amidoxima foi utilizado por Tiemann com a síntese da mandelamidoxima e benzomidoxima (Santos *et al.*, 2018).

Do ponto de vista físico-químico a estrutura das amidoximas é fascinante, pois a presença dos grupos funcionais $-NH_2$ (amina) e $=NOH$ ilustrado na figura 1 (isonitroso) fornecem a esses compostos um caráter anfótero (Freitas Filho *et al.*, 2015).

Figura 1 - Estrutura geral das amidoximas



Fonte: o autor (2023)

Em produtos biológicos e farmacêuticos, as amidoximas podem atuar como pró-fármacos das amidinas, com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade, além disso, uma enzima chamada mARC (Componente Redutor de Amidoxima Mitocondrial) pode biotransformar amidoximas em amidinas (Silva, 2021).

Portanto, as amidoximas são moléculas versáteis com diversas atividades biológicas, incluindo antimicrobiana, anti-inflamatória, antihipertensiva, antioxidante, antiarrítmica e fungicida. Sua capacidade intrínseca de neutralizar espécies reativas de oxigênio, atuando como agentes antioxidantes, não apenas preserva a integridade celular, mas também amplia seu potencial terapêutico em várias áreas biomédicas (Fylaktakidou *et al.*, 2008).

Os antioxidantes atuam de várias maneiras para proteger as células contra o estresse oxidativo. Eles podem doar elétrons aos radicais livres, neutralizando sua reatividade e impedindo que danifiquem as biomoléculas. Além disso, os antioxidantes podem regenerar outros antioxidantes oxidados, restaurando sua atividade antioxidante. Também podem modular vias de sinalização celular relacionadas ao estresse oxidativo e ativar a expressão de genes envolvidos na defesa antioxidante (Flieger *et al.*, 2021).

A importância dos antioxidantes na saúde humana tem sido amplamente reconhecida. Estudos epidemiológicos sugerem que uma dieta rica em antioxidantes está associada a um menor risco de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares e câncer. Além disso, os antioxidantes têm propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras, contribuindo para a saúde geral e o bem-estar (Vasconcelos, 2014).

Diante da necessidade na descoberta de novos agentes antioxidantes, o objetivo deste trabalho foi realizar a síntese e avaliar atividade antioxidante *in vitro* da benzoamidoxima.

2 METODOLOGIA

2.1 Síntese da benzoamidoxima 2

A síntese da benzoamidoxima **2** foi baseada na metodologia desenvolvida por Barros *et al.* (2011), com algumas modificações. Deste modo, em um balão de fundo redondo com capacidade de 50 mL, o cloridrato de hidroxilamina (208,47 mg; 3 mmol) e carbonato de sódio (158,98 mg; 1,5 mmol) foram dissolvidos em 10 mL de água destilada à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 1,0 mmol da benzonitrila **1** em 10 mL de etanol. A mistura reacional foi colocada em um banho ultrassônico durante 30 minutos sob temperatura de 50 °C. O término da reação foi comprovado por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando como sistema de eluição hexano:acetato de etila (7:3), até o consumo total da nitrila. Após o término da reação, o etanol foi evaporado, resultando em duas fases: a fase aquosa e o produto insolúvel em água. O produto obtido em forma de óleo foi extraído do meio aquoso com acetato de etila (3 x 15 mL). A fase orgânica foi separada, secada com Na₂SO₄ como agente secante, filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida. Em seguida, a fase orgânica foi filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida, sendo a amostra obtida por cristalização em clorofórmio:hexano (4:6).

2.2 Avaliação da atividade antioxidante

2.2.1 Avaliação da atividade sequestradora do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

O teste foi realizado seguindo a metodologia descrita por Oliveira (2006). Cada solução estoque da benzoamidoxima foi preparada em concentrações variando de 1,0 mg/mL. Através de triagem preliminar, quantidades apropriadas das frações foram transferidas para tubos de ensaios, em seguida, foram adicionados 270 μ L da solução de DPPH (23,6 μ g/mL), o volume foi completado para 300 μ L com EtOH. Cada concentração foi analisada em triplicata. Após 30 minutos de agitação em aparelho de ultrassom, a quantidade de radicais DPPH foi analisada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 517 nm. Como controle positivo foi empregado o ácido ascórbico, e a percentagem de atividade sequestradora (% AS) foi calculada pela equação:

$$\% \text{ AS} = 100 \times (\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}) / \text{Abs}_{\text{controle}}$$

Onde, o $\text{Abs}_{\text{controle}}$ é a absorvância do controle, contendo apenas a solução etanólica do radical DPPH, e $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ é a absorvância do radical na presença das frações ou do padrão ácido ascórbico.

2.2.2 Avaliação da atividade Antioxidante pelo cátion radical ABTS^{•+} (2,2 AZINO BIS [3-ethylbenzo thiazoline 6 sulfonic acid])

O teste foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Re *et al.* (1999). O cátion radical ABTS^{•+} foi preparado pela mistura de uma solução de ABTS (7 mM) com uma solução de persulfato de potássio (140 mM) ambas em água destilada. A solução foi mantida no escuro à temperatura ambiente durante um período de 12-16 horas antes do uso. Então, a solução do radical ABTS^{•+} foi diluída com etanol (1:100 v/v) até uma absorvância de $0,7 \pm 0,05$, no comprimento de onda de 734 nm, em espectrofotômetro. As amostras foram preparadas na concentração de (1 mg/mL = 1000 μ g/mL), onde foi adicionado 50 μ L da amostra, e em seguida adicionou-se 950 μ L da solução de ABTS^{•+}. As soluções foram agitadas e, após 6 minutos de reação, a absorvância das amostras e do padrão foram medidas em um espectrofotômetro em comprimento de onda de 734 nm.

2.2.3 Poder Redutor

A análise da atividade antioxidante foi determinada através do poder redutor pelo método de Waterman e Mole (1994). 100 μ L das soluções testes (soluções de benzoamidoxima diluídos em metanol em uma concentração de 500 ppm) foram adicionados em 8,5 mL de água deionizada ou destilada. Logo em seguida foi adicionada 1,0 mL da solução de FeCl₃ 0,1 M, depois de 3 min, foi colocada 1,0 mL

da solução de ferricianeto de potássio 0,08 M. Misturou-se. Após 15 min, foi necessária a realização da leitura da absorbância da solução em espectrofotômetro a 720nm.

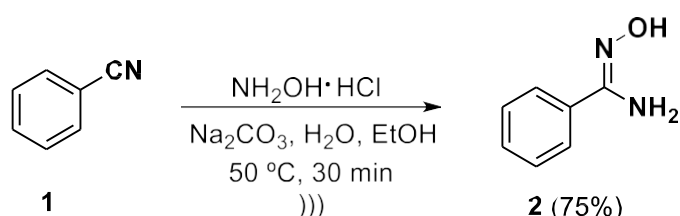
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Estratégia sintética e caracterização da benzoamidoxima

Dentre os vários métodos para síntese de alquil- e arilamidoximas, um que se destaca por ser o mais utilizado, está baseado na utilização de diferentes alquil- ou arilnitrilas e cloridrato de hidroxilamina na presença de uma base, com um solvente apropriado, e em uma temperatura ambiente. Na literatura existem alguns relatos de otimização desse protocolo visando a diminuição do tempo reacional e melhora do rendimento (Rahman *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2015; Barros *et al.*, 2011).

A síntese da benzoamidoxima **2**, a molécula-alvo, foi realizada a partir da reação da benzonitrila **1** com o cloridrato de hidroxilamina na presença de carbonato de sódio, etanol e água. A mistura reacional foi mantida sob banho ultrassônico e em uma temperatura de 50 °C, de acordo com método desenvolvido por Barros *et al.* (2011) com algumas modificações (Figura 2). Esse método foi escolhido devido ao baixo tempo reacional e a sua eficiência.

Figura 2 - Síntese da benzoamidoxima **2**



Fonte: o autor (2023)

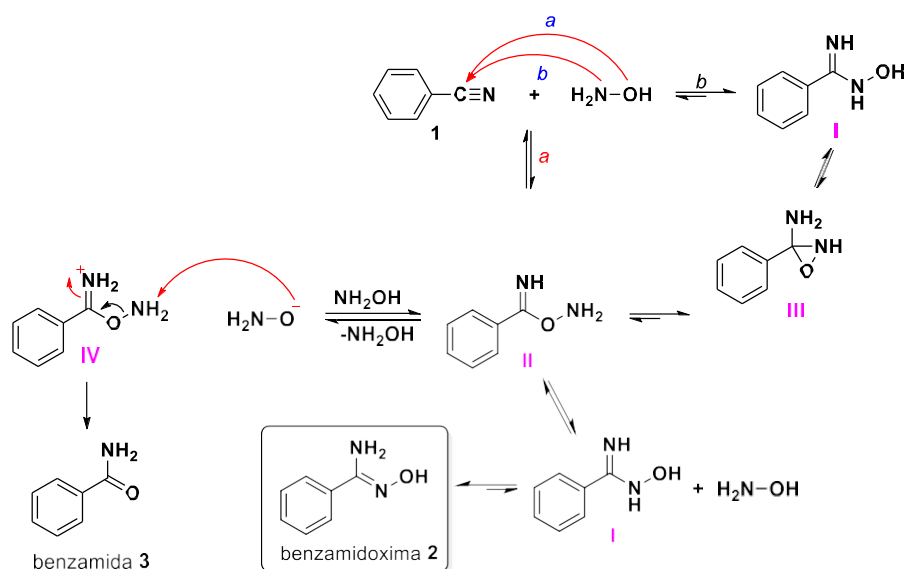
A reação foi acompanhada por CCD e durou 30 min. A benzoamidoxima foi obtida com um rendimento de 75%, após ser purificada por cristalização, na forma de um sólido cristalino, cujo ponto de fusão variou de 79-80 °C, valor condizente com os resultados descritos por Oliveira *et al.* (2021).

Baseado no estudo descrito pelo grupo de Srivastava *et al.* (2009), o provável mecanismo para a formação da benzoamidoxima é mostrado na figura 2. Neste mecanismo, que justifica a formação do composto 2, temos que inicialmente a benzonitrila 1 sofre ataque nucleofílico da hidroxilamina. Este ataque proveniente da hidroxilamina pode ser promovido pelo par de elétrons do átomo de O (rota a) ou do N (rota b), resultando nos intermediários II e I, respectivamente. Ambas as rotas “a” e “b” estão em equilíbrio, no entanto a rota “b” tem o equilíbrio mais deslocado para na direção do intermediário I devido a maior estabilidade desta espécie quando comparada com o intermediário II e pelo fato da hidroxilamina está em excesso o que

Instituto Federal de Pernambuco. Campus Barreiros. Curso de Licenciatura em Química. 22 de dezembro de 2023.

pelo Princípio de Le Chatelier promove o deslocamento do equilíbrio. Outro fato interessante é que o intermediário II pode sofrer ataque nucleofílico do par de elétrons do átomo de N ligado ao átomo do O levando ao ciclo de três membros, ou seja, intermediário III. O intermediário III está em equilíbrio com o composto I. Uma vez formado o intermediário I, o mesmo pode sofrer ataque intramolecular seguido de um rearranjo alílico da estrutura, levando assim ao composto desejado 2. Além disso, pode ocorrer também a formação da benzamida dependendo do aumento do pH do meio, levando à formação do ânion NH_2O^- .

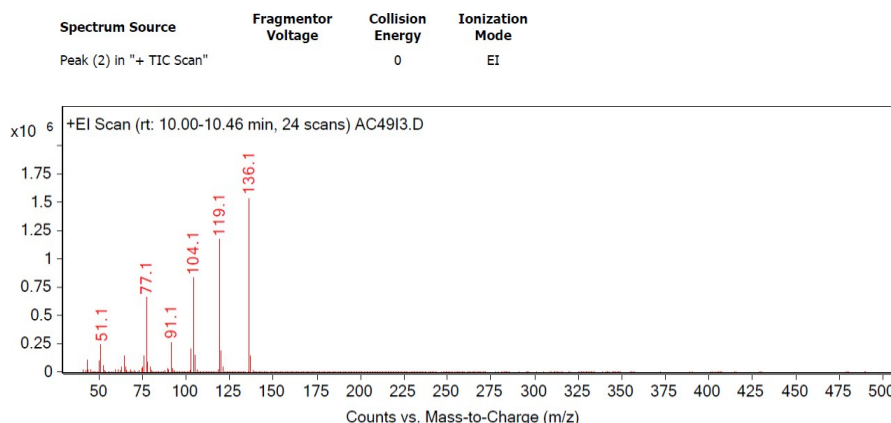
Figura 3 - Mecanismo da reação para formação da benzoamidoxima 2



Fonte: o autor (2023)

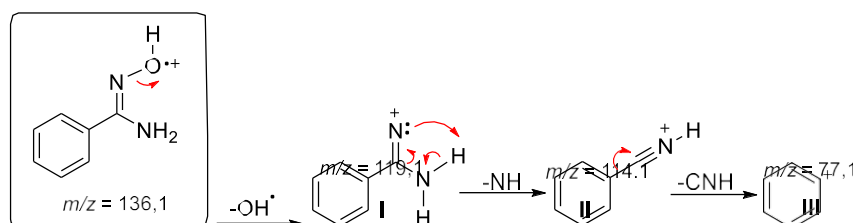
A estrutura do composto **2** foi elucidada através de diferentes técnicas espectrais. Preliminarmente, o composto formado foi analisado através da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria massas (GC-MS). O cromatograma apresentou apenas um pico com um tempo de retenção de 10,08 min, constatando a pureza do composto.

O espectro de massa do composto **2** (Figura 3) foi obtido pelo método de ionização por elétrons (EI-MS) com feixe padrão de 70 eV. O EI-MS mostra o pico do íon molecular $[\text{M}]^+$ com $m/z = 136,1$, que corresponde ao peso molecular do composto **2** (PM = 136,06 g/mol).

Figura 4 - Espectro de massa da benzoamidoxima **2**

Fonte: o autor (2023)

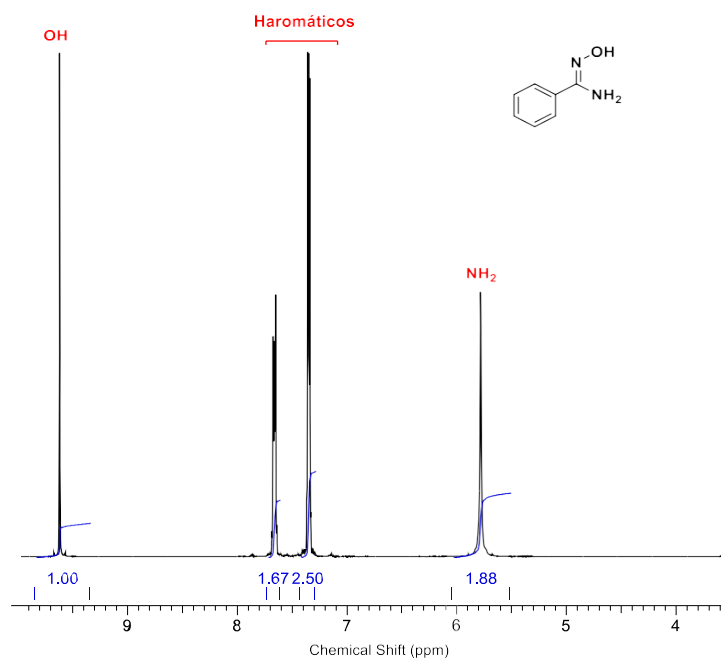
A análise do EI-MS mostrou a fragmentação esperada para o composto **2**, de acordo com a proposta apresentada na figura 4. Para explicar a formação do íon com $m/z = 119,1$ (**I**) sugerimos que após a formação do íon molecular $[M]^+$ ocorre a perda do radical OH^\cdot . Assumimos que na estrutura **I** ocorre uma transferência intramolecular de hidrogênio e quebra da ligação C-N levando ao íon **II** com $m/z = 114,1$. Além disso, a perda de uma molécula de acetonitrila origina o íon **III** ($m/z = 77,1$).

Figura 5 - Fragmentação proposta para a benzoamidoxima **2**

Fonte: o autor (2023)

A estrutura do composto **2** também foi elucidada através das técnicas de RMN ^1H e RMN ^{13}C . No espectro de RMN ^1H , observa-se a presença de quatro sinais que condiz com a quantidade de hidrogênios quimicamente diferentes na estrutura do composto **2**. Além disso, o somatório das integrais é igual a oito, o que corresponde ao número total de hidrogênios da estrutura analisada. Em 9,63 ppm é observado a presença de um simpleto atribuído ao hidrogênio ácido (H-1) pertencente ao grupo isonitroso (NOH). Na região entre 7,70 a 7,66 ppm revela um multipletto entre com integral igual a dois, enquanto que na região entre 7,39-7,35 ppm, há outro multipletto com integral igual a três, sendo estes sinais atribuídos aos hidrogênios aromáticos. Um outro sinal que merece destaque é um simpleto que aparece em 5,81 ppm, atribuído aos hidrogênios H-2 do grupo NH_2 (Figura 5).

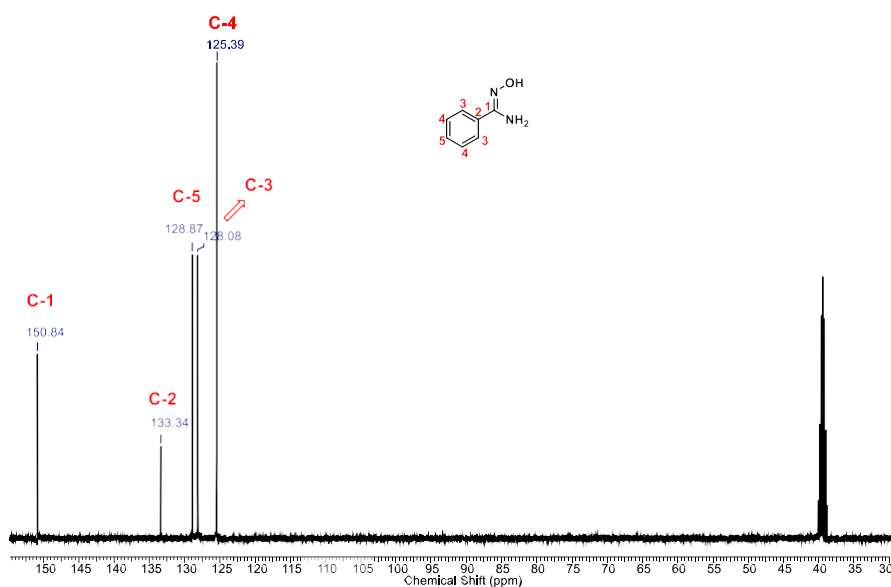
Figura 6 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) da benzoamidoxima **2**



Fonte: o autor (2023)

Na figura 6 é apresentado o espectro de RMN ^{13}C e nota-se cinco sinais, que equivalem ao número de carbonos quimicamente diferentes do composto **2**.

Figura 7 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) da benzoamidoxima **2**



Fonte: o autor (2023)

O sinal em 150,8 ppm foi atribuído ao carbono C-1, por estar diretamente ligado a dois átomos de nitrogênios que o desblindam e desloca seu sinal para uma região de campo baixo. O sinal em 133,3 ppm refere-se ao carbono C-2 devido o mesmo sofrer desblindagem em virtude da sua proximidade com a função amidoxímica que retira densidade eletrônica e também por se tratar de um carbono não hidrogenado, que é caracterizado por uma menor intensidade do sinal. O sinal em 128,9 ppm foi atribuído ao carbono C-5 devido ao efeito de ressonância da função amidoxímica que retira elétrons nas posições *para* e *orto*. Os sinais em 128,1 e 125,4 ppm foram atribuídos aos carbonos C-4 e C-3, respectivamente. Os sinais de C-3 quanto o de C-4 é gerado por dois carbonos quimicamente equivalentes, que aumentam a intensidade do sinal.

3.2 Atividade antioxidante

Na tabela 1 apresenta os resultados da avaliação da atividade antioxidante da benzoamidoxima, que indica que a benzoamidoxima demonstrou atividade antioxidante significativa em todos os métodos de análise empregados.

Tabela 1 - Atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e poder redutor da benzoamidoxima

Concentração	DPPH AA (%)	ABTS AA (%)	Poder Redutor Mg EQ/g
1000 µg/mL	71,9 ± 2,85	99,6 ± 0,115	763,93 ± 0

AA: Atividade antioxidante. Mg EQ/g miligramas equivalentes de ácido ascórbico.

Fonte: o autor (2023)

No método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), a molécula apresentou inibição de 71,9 % do radical enfatizando o potencial desta molécula como agente antioxidante. Quando foi empregado o método do radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico), o valor de inibição foi praticamente o máximo possível para este radical, sendo observado um valor de 99,6% de inibição. No método do poder redutor, que se baseia na redução do ferricianeto (Fe³⁺) a ferrocianeto (Fe²⁺), a benzoamidoxima apresentou uma alta concentração na formação do complexo. Esses métodos são amplamente utilizados para medir a atividade antioxidante de substâncias, revelando a capacidade do composto em neutralizar radicais livres e combater o estresse oxidativo.

4 CONCLUSÃO

A análise do processo de produção da benzoamidoxima apresentou resultados promissores indicando que a síntese é viável e obteve rendimento significativo. A eficiência na obtenção desta molécula indica que o método utilizado para a produzir é robusto e eficaz. Além disso, os testes sobre a atividade antioxidante da benzoamidoxima foram encorajadores. A molécula apresentou atividade antioxidante significativa comparável ao padrão validado pelo método de análise utilizado. Esta comparação com o padrão de referência aumenta a confiança na importância da benzoamidoxima como antioxidante eficaz. A observação de que a atividade antioxidante da benzoamidoxima é comparável à de um padrão estabelecido indica que a substância sintetizada possui propriedades desejáveis em aplicações relacionadas à neutralização de espécies reativas de oxigênio e que pode ter vantagens potenciais, por exemplo, em produtos farmacêuticos e culinária. ou na indústria química.

REFERÊNCIAS

- BARROS, C. J. P. *et al.* Synthesis of amidoximes using an efficient and rapid ultrasound method. **Journal of the Chilean Chemical Society**, [s. l.], v. 56, n. 2, p. 721- 722, 2011.
- FLIEGER, J. *et al.* Antioxidants: classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles. **Materials (Basel)**, [s. l.], v. 14, n. 15, p. 4135-4189, 2021.
- FREITAS FILHO, J. R. *et al.* Amidoximas: aplicações e principais estratégias sintéticas. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 549-2596, 2015.
- FYLAKTAKIDOU, K. C. *et al.* Recent developments in the chemistry and in the biological applications of amidoximes. **Current pharmaceutical design**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 1001-1047, 2008.
- OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s. l.], v. 17, p. 36-44, 2006.
- OLIVEIRA, R. J. *et al.* Design, synthesis and antitumoral activity of New - alkylamidoximes. **ChemistrySelect**, [s. l.], v. 6, n. 33, p. 8774-8778, 2021.
- RAHMAN, M. N. *et al.* Synthesis and characterization of an amidoxime compound with benzimidazole moiety and ph sensing behavior under basic condition in methanol and DMSO. **Journal of the Chilean Chemical Society**, [s. l.], v. 63, n. 3, p. 4047-4050, 2018.
- RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 26, p. 1231–1237, 1999.
- Instituto Federal de Pernambuco. *Campus Barreiros*. Curso de Licenciatura em Química. 22 de dezembro de 2023.

SANTOS, F. A. *et al.* Prospecção Tecnológica: Uma Visão Geral dos Aspectos e Impactos Relevantes das Amidoximas. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 10, n. 5, 2018.

SCHEPETKIN, I. A. *et al.* Oximes: novel therapeutics with anticancer and anti-inflammatory potential. **Biomolecules**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 777, 2021.

SILVA, P. V. R. **Síntese, caracterização e avaliação toxicológica de amidoximas aromáticas frente à Artemia salina Leach**. 2021. Monografia (Bacharelado em Farmácia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2021.

SRIVASTAVA, R. M. *et al.* Synthesis, mechanism of formation, and molecular orbital calculations of arylamidoximes. **Monatshefte für Chemie**, [s. l.], v. 140, p. 1319- 1324, 2009.

VASCONCELOS, T. B. M. de *et al.* Radicais livres e antioxidantes: proteção ou perigo? **Journal of Health Sciences**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 213-219, 2014.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. Analysis of phenolic plant metabolites. **Blackwell Scientific Publications**, Oxford, p. 66-103, 1994.

YANG, C. T. *et al.* “One-pot” synthesis of amidoxime via Pd-catalyzed cyanation and amidoximation. **Organic & Biomolecular Chemistry**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 2541-2545, 2015.