



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PRISCILA GOES CAMARGO DE CARVALHO

**SÍNTESE DE TIOIDANTOÍNAS, ESTUDO DE SUAS
ATIVIDADES BIOLÓGICAS E INTERAÇÕES COM
PROTEÍNAS POR RMN**

PRISCILA GOES CAMARGO DE CARVALHO

**SÍNTESE DE TIOIDANTOÍNAS, ESTUDO DE SUAS
ATIVIDADES BIOLÓGICAS E INTERAÇÕES COM
PROTEÍNAS POR RMN**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Cesar de Macedo Jr.

Londrina
2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C331s Carvalho, Priscila Goes Camargo de.
Síntese de Tioidantoínas, estudo de suas atividades biológicas e interações com proteínas por RMN / Priscila Goes Camargo de Carvalho. - Londrina, 2017.
131 f.: il.

Orientador: Fernando Cesar de Macedo Junior.
Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2017.
Inclui bibliografia.

1. Síntese Orgânica - Tese. 2. Tioidantoínas - Tese. 3. Atividades biológicas - Tese. 4. RMN - Tese. I. Macedo Junior, Fernando Cesar. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. III. Título.

CDU: 547

PRISCILA GOES CAMARGO DE CARVALHO

**SÍNTESE DE TIOIDANTOÍNAS, ESTUDO DE SUAS ATIVIDADES
BIOLÓGICAS E INTERAÇÕES COM PROTEÍNAS POR RMN**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Fernando Cesar de
Macedo Jr.
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Marcelle de Lima Ferreira Bispo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Ivete Conchon Costa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 14 de fevereiro de 2017.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Marina, ao seu carinho e seu amor que sempre motivou todos os atos realizados em minha vida sendo base de minha esperança em nunca desistir.

A todos meus familiares que sempre apoiaram e acreditaram em meu potencial, em especial ao meu avô Abílio Goes e meu primo Diego Goes que me abençoam e me acompanham sempre, aos meus cunhados e cunhadas Dayana, Ricardo, Rogério e Vanessa, e aos meus irmãos Amanda, Emmanuel e Guilherme, pelo apoio incondicional e compreensão.

Ao meu esposo Rodrigo, pelo seu amor, companheirismo, paciência e dedicação que a cada dia me ajudou a atravessar por cada obstáculo durante esta caminhada onde a perseverança sempre foi propícia a salientar **nossos** sonhos.

Ao Professor Dr. Adriano Lopes Romero, por ter incentivado a minha curiosidade e interesse pela Química Orgânica guiando e instigando o início do meu caminho a acarretar a busca pelo conhecimento.

À minha querida e sempre amiga Prof. Dra. Lilian Tatiani Dusman Tonin, por sua colaboração em parceria a este trabalho, paciência, ensinamentos e dedicação. Juntamente agradeço à UTFPR pelo espaço cedido às análises.

Ao meu orientador Fernando Macedo, àquele quem me acolheu de braços abertos me conduzindo pelos caminhos da pesquisa com paciência e maestria, pelos seus ensinamentos, dedicação, confiança, e por ser o total responsável pelo meu carinho para com a realização deste trabalho, pois sem ele nada disso seria possível.

Aos amigos Ana Hilário, Ana Nunes, Anna Veronese, Bianca Minelli, Bruno Oshiro, Caroline Tonetti, Cesar Valério, Cristiana Gonzaga, David Martins, Felipe Mulari, Filipe Martinez, Jackson Falquembak, Juliana Zambonato, Larissa Nazário, Maiara Mendes, Max Detogni, Maxuel Mello, Natalia Caputo e Vanessa Barbosa. Em especial ao quinteto: Bruno Simões, Gabriela Salgado, Lucas Camargo, Maiara Taniguchi e Manoela Gonçalves, amigos que compartilharam de meus momentos de desespero e descontração e foram os alicerces para a superação de todas as dificuldades encontradas durante esta caminhada, compartilhando dos medos e frustrações, mas também das alegrias e das vitórias alcançadas, por sempre me motivarem e me fazerem acreditar que se temos vontade tudo é possível.

Ao Laboratório de Protozoologia Experimental (CCB), aos professores colaboradores Dr. Wander Pavanelli e Dra. Ivete Costa e aos amigos integrantes

Bruna Bortoletti, Fernanda T-Pellissier, João Assolini e Milena Miranda-Sapla, pelos ensaios realizados, paciência e ensinamentos.

Aos Professores Dr. Ângelo de Fátima e Dra. Luzia Modolo, juntamente a UFMG pelos ensaios realizados.

À Marcelle de Lima Ferreira Bispo pelas colaborações e aceite para a banca.

A todos os professores e colaboradores da UEL que auxiliaram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho, em especial a estagiária Vanessa Liberatti pelas análises de RMN e ao Dr. Jurandir Pereira pelo auxílio.

A todos os integrantes do LPMBA e LAPSSO, em especial aos amigos Camila Nascimento, Henrique Esteves, Jéseka Schirmann, Marcio Oliveira, Paula Rivero, Simone Birkheur e Tiago Brito por me acolherem com tanto carinho e me proporcionarem o sentimento de constituição de uma família científica tão amável e memorável.

CARVALHO, Priscila Goes Camargo. **Síntese de tioidantoínas, estudo de suas atividades biológicas e interações com proteínas por RMN**. 2017. 131 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Tioidantoínas são derivados sulfurados das hidantoínas que possuem grande destaque devido à sua diversidade de propriedades biológicas. Por estas razões, neste trabalho, descrevemos a síntese e avaliação de vinte e duas tioidantoínas derivadas de aminoácidos e a avaliação do seu potencial antioxidante, leishmanicida contra *Leishmania amazonensis* e inibitória contra a enzima urease de *Canavalia ensiformis*. Descrevemos também a avaliação das interações ligante-enzima de dois compostos através de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear, DOSY (Difusion Ordered Spectroscopy) e STD (Saturation Transfer Difference). A maioria das tioidantoínas foram facilmente obtidas através da reação de condensação da tiouréia e um aminoácido sem a necessidade de procedimentos complexos de purificação. O ensaio *in vitro* contra urease de *Canavalia ensiformis* revelou que quatro tioidantoínas foram mais ativas como inibidores do que a substância controle positivo, hidroxureia. O estudo *in silico* sugere que as tioidantoínas não possuem violações nas Regras de Lipinski e não possuem risco de toxicidade. Os ensaios *in vitro* frente à *Leishmania amazonensis* demonstraram que os compostos avaliados possuem potencial leishmanicida, atingindo um percentual de mortalidade de até 100% em 48 horas de análise. Os ensaios *in vitro* da cinética da atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) indicaram comportamentos cinéticos lento, intermediário e rápido. Seis compostos demonstraram potencial alto para o sequestro do radical livre DPPH.

Palavras-chave: Tioidantoínas. Urease. *L. amazonenses*. Atividade antioxidante.

CARVALHO, Priscila Goes Camargo. **Synthesis of thiohydantoin, study of their biological activities and interactions with proteins by NMR.** 2017. 131 p. .
Dissertation (Postgraduate in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Thiohydantoin are sulfur derivatives of hydantoin that have a diversity of biological properties. For these reasons, in this work, we describe the synthesis and evaluation of twenty-two thiohydantoin derived from amino acids and the evaluation of their antioxidant and leishmanicidal potential against *Leishmania amazonensis* and inhibitory potential against *Canavalia ensiformis* urease. We also investigate the ligand-enzyme interactions using two methods of Nuclear Magnetic Resonance, DOSY (Diffusion-Oriented Spectroscopy) and STD (Difference of Saturation Transfer). Most thiohydantoin were easily obtained through of a condensation reaction between thiourea and an amino acid without a necessity of complexities purification procedures. The *in vitro* assay against *Canavalia ensiformis* revealed that four thiohydantoin were more active as inhibitors than a positive control substance, hydroxyurea. The *in silico* study demonstrated that thiohydantoin have no violations in Lipinski rules and have no risk of toxicity. *In vitro* assays solve the mortality of promastigote forms of *L. amazonensis* of the until 100% in 48 hours of analysis. *In vitro* assays of the kinetics of antioxidant activity by the free radical sequestration method DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazil), showed slow, intermediate and fast kinetic behavior. Six compounds demonstrated potential for sequestration of the DPPH free radical.

Key words: Thiohydantoin. Urease. *L. amazonensis*. Antioxidant activity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|-------------------------------------------------------|
| 2D | duas dimensões |
| 3D | três dimensões |
| δ | deslocamento químico |
| %AA | porcentagem de atividade antioxidante |
| %ABS | porcentagem de absorção |
| Abs | absorbância |
| AIDS | Acquired Immuno Deficiency Syndrome |
| A _{STD} | fator de amplificação |
| BHT | hidroxitolueno butilado |
| CCB | Centro de Ciências Biológicas |
| CCE | Centro de Ciências Exatas |
| CO ₂ | dióxido de carbono |
| D ₂ O | água deuterada |
| D | coeficiente de difusão |
| D | duplete |
| Dd | duploduplete |
| DMSO | dimetilsulfóxido |
| DOSY | Diffusion Ordered Spectroscopy |
| DPPH | 2,2 difenil-1-picrilhidrazil |
| EDTA | etilenodiamino tetra-acético |
| [E] | concentração da enzima |
| HDL | high density lipoprotein |
| HU | hidroxiureia |
| I ₀ = | intensidade relativa do sinal sem efeito STD |
| IC ₅₀ | concentração inibitória de 50% |
| I _{STD} | intensidade relativa do sinal posterior ao efeito STD |
| J | constante de acoplamento |
| K _D | constante de dissociação |
| K _i | constante de inibição |
| [L] | concentração do ligante |
| L/E | razão ligante-enzima |
| m | multipleto |

| | |
|-------------------|-----------------------------------------------------|
| MeOD | metanol deuterado |
| MgSO ₄ | sulfato de magnésio |
| milogP | coeficiente partição octanol-água |
| MM | massa molecular |
| MW | micro-ondas |
| nALH | número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio |
| NaOH | hidróxido de sódio |
| NBPT | N-(n-butil) tiofosfórico triamida |
| nDLH | número de grupos doadores de ligação de hidrogênio |
| NH ₃ | amônia |
| NH ₄ | amônio |
| NPS | nitroprussiato de sódio |
| PBS | fosfato de potássio |
| PSA | polar surface area |
| Q | quarteto |
| RMN | ressonância magnética nuclear |
| S | simpleto |
| STD | Saturation Transfer Difference |
| T | tripleto |
| TMS | tetrametil silano |
| UCE | urease <i>Canavalia ensiformis</i> |
| UEL | Universidade Estadual de Londrina |
| UTFPR | Universidade Tecnológica Federal do Paraná |
| UV | ultravioleta |

LISTA DE ESQUEMAS

| | | |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Esquema 1. | Obtenção de tioidantoína a partir da reação do cloridrato de aminoacetato de etila com tiocianato de potássio..... | 22 |
| Esquema 2. | Passo 1: Obtenção de 1-acetil-2-tioidantoína a partir da reação da glicina com tiocianato de potássio. Passo 2: Obtenção da 2-tioidantoína a partir da reação com HCl..... | 22 |
| Esquema 3. | Síntese combinatória em fase líquida de 3,5-dissubstituídas-tioidantoínas assistida por micro-ondas..... | 23 |
| Esquema 4. | Síntese de 2-tioidantoínas a partir da reação de um aminoácido com tioureia..... | 23 |
| Esquema 5. | Síntese <i>one pot</i> de tioidantoínas usando micro-ondas..... | 23 |
| Esquema 6. | Síntese das tioidantoínas (5a-n) a partir da reação de aminoácidos (3a-n) com tioureia..... | 29 |
| Esquema 7. | Mecanismo proposto para a síntese das tioidantoínas (5a-n). Adaptado de (WANG, <i>et al.</i> , 2006)..... | 30 |
| Esquema 8. | Mecanismo proposto para a síntese das tioidantoínas (6a-n) em condições ácidas..... | 32 |
| Esquema 9. | Mecanismo proposto para a reação de eliminação de 5I | 33 |
| Esquema 10. | Representação esquemática da reação de hidrólise enzimática da ureia..... | 50 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. | Estrutura química da ureia | 19 |
| Figura 2. | Estrutura para os enantiômeros da Talidomida..... | 20 |
| Figura 3. | Estrutura geral para hidantoínas e tioidantoínas | 21 |
| Figura 4. | Estrutura para as tioidantoínas e acetil tioidantoínas | 35 |
| Figura 5. | Espectro de RMN de ¹ H 5e (400,13 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ | 36 |
| Figura 6. | Espectro de RMN de ¹³ C 5e (100,61 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ | 36 |
| Figura 7. | Espectro de RMN de ¹ H de 6e (400,13 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ | 37 |
| Figura 8. | Espectro de RMN de ¹³ C de 6e (100,61 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ | 37 |
| Figura 9. | Estrutura para 3-(3-alkuil-2,6-diaril-piperidina-4-ilideno)-2-tioxo-4-imidazolidina..... | 45 |
| Figura 10. | Estrutura para o derivado tioidantoínico (8) | 46 |
| Figura 11. | Estrutura para derivado tioidantoínico (9a-b) | 46 |
| Figura 12. | Estrutura para o derivado tioidantoínico (10)..... | 47 |
| Figura 13. | Estrutura para os derivados tioidantoínicos (11a-b)..... | 48 |
| Figura 14. | Estruturas moleculares dos fármacos Anfotericina B e Pentamidina. | 49 |
| Figura 15. | Estrutura para o composto tioidantoínico (12)..... | 50 |
| Figura 16. | Representação da estrutura do sítio ativo da urease (Adaptado de BENINI <i>et al.</i> , 1999) | 51 |
| Figura 17. | Estrutura do inibidor de urease <i>N</i> -(<i>n</i> -butil)triamidatofosfórico (NBPT) | 52 |
| Figura 18. | Estrutura para a tioureia (13)..... | 52 |
| Figura 19. | Estrutura de benzoiltioureias (14a-f) | 53 |
| Figura 20. | 20a: Equilíbrio químico de associação/dissociação (K_D). 20b: Princípios de um experimento de STD (Adaptado de CABRITA <i>et al.</i> , 2011) | 55 |
| Figura 21. | Sequência de pulsos spin-eco (adaptado de HANH, 1950) | 57 |
| Figura 22. | Espectro de DOSY para uma mistura de cafeína, <i>n</i> -propanol e água. | 57 |
| Figura 23. | Reação entre a molécula de DPPH e um antioxidante para formar DPPH reduzido..... | 64 |

| | | |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 24. | Cinética de reação para o padrão utilizado BHT nas concentrações de 100 e 50 μM no período de 45 min..... | 66 |
| Figura 25. | Cinética de reação para 5e nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 μM no período de 75 min | 67 |
| Figura 26. | Cinética de reação para 5l nas concentrações de 500, 250, 50 e 25 μM no período de 60 min | 67 |
| Figura 27. | Cinética de reação para 6e nas concentrações de 500, 250, 50 e 25 μM no período de 60 min | 68 |
| Figura 28. | Efeito inibitório de tioidantoinas frente à urease <i>C. ensiformis</i> . HU (hidroxiureia, como padrão)..... | 73 |
| Figura 29. | STD-RMN de 5n com UCE , L/E = 100: (A) Espectro de STD utilizado como referência de 5n com UCE ; (B) Espectro de STD da solução de 5n (4 mM) com UCE (0,04 mM)..... | 74 |
| Figura 30. | Espectro 2D de DOSY do composto 5n (4,0 mM) com UCE (44,44 μM), L/E= 100 onde D= difusão média..... | 76 |
| Figura 31. | Espectro Pseudo-2D de DOSY do composto 5n (20,00 mM) onde D = difusão média | 76 |
| Figura 32. | Coeficiente de difusão ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) de 5n em função da concentração do ligante [L] (mM) | 77 |
| Figura 33. | Espectro Pseudo-2D de DOSY do composto 6a (4,0 mM) com UCE (44,44 μM), L/E= 100, onde D= difusão média..... | 78 |
| Figura 34. | Espectro Pseudo-2D de DOSY do composto 6a (20,00 mM), onde D= difusão média | 78 |
| Figura 35. | Coeficiente de difusão ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) de 6a em função da concentração do ligante [L] (mM) | 79 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. | Rendimento para a síntese das tioidantoínas (5a-n)..... | 31 |
| Tabela 2. | Rendimento para a síntese das acetil-tioidantoínas (6a-n)..... | 33 |
| Tabela 3. | Rendimento para a síntese das tioidantoínas (5a-b e 5e)..... | 34 |
| Tabela 4. | Regras de Lipinski, porcentagem de absorção e área de superfície polar para 5a-n | 38 |
| Tabela 5. | Avaliação de risco de toxicidade das tioidantoínas (5a-n)..... | 39 |
| Tabela 6. | Regras de Lipinski, porcentagem de absorção e PSA para 6a-n | 39 |
| Tabela 7. | Avaliação de risco de toxicidade das tioidantoínas (6a-n)..... | 40 |
| Tabela 8. | Valores de atividade antioxidante em IC ₅₀ para os compostos avaliados | 65 |
| Tabela 9. | Valores de inibição frente às formas promastigota de <i>L. amazonensis</i> em 24 horas | 69 |
| Tabela 10. | Valores de inibição frente às formas promastigota de <i>L. mazonensis</i> em 48 horas | 70 |
| Tabela 11. | Atividade inibitória das tioidantoínas sintetizadas frente à urease <i>C. ensiformis</i> | 72 |

SUMÁRIO

| | |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CAPÍTULO I | |
| 1 | INTRODUÇÃO19 |
| 2 | OBJETIVOS25 |
| 1.1 | OBJETIVO GERAL25 |
| 1.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....25 |
| 3 | METODOLOGIA26 |
| 3.1 | SÍNTESE DAS TIOIDANTOÍNAS26 |
| 3.1.1 | Reagentes e Solventes.....26 |
| 3.1.2 | Procedimento para a síntese das tioidantoínas (5a-n).....26 |
| 3.1.3 | Procedimento para a síntese das acetil-tioidantoínas (6a-n) e tioidantoínas (5a-b, 5e e 5l)27 |
| 3.2 | MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO27 |
| 3.3 | ESTUDO IN SILICO DAS TIOIDANTOÍNAS28 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO29 |
| 4.1 | SÍNTESE DAS TIOIDANTOÍNAS29 |
| 4.2 | CARACTERIZAÇÃO DAS TIOIDANTOÍNAS.....35 |
| 4.1 | ESTUDOS IN SILICO DAS PROPRIEDADES DAS TIOIDANTOÍNAS38 |
| 5 | CONCLUSÃO41 |
| | REFERÊNCIAS42 |
| CAPÍTULO II | |
| 1 | INTRODUÇÃO45 |
| 1.1 | ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE TIOIDANTOÍNAS.....45 |
| 1.2 | ANTIOXIDANTES.....47 |
| 1.3 | LEISHMANIOSE.....48 |
| 1.4 | ATIVIDADE ANTIUREOLÍTICA50 |

| | | |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.5 | ESTUDO DE INTERAÇÕES DE LIGANTES COM PROTEÍNAS POR RMN..... | 54 |
| 1.5.1 | Diferença de Transferência de Saturação (STD)..... | 55 |
| 1.5.2 | Difusion Ordered Spectroscopy (DOSY)..... | 56 |
| 2 | OBJETIVOS | 59 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL..... | 59 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 59 |
| 3 | METODOLOGIA | 60 |
| 3.1 | ESTUDO CINÉTICO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE..... | 60 |
| 3.2 | ATIVIDADE LEISHMANICIDA IN VITRO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. amazonensis</i> | 61 |
| 3.3 | ESTUDO IN VITRO DE INIBIÇÃO DA UREASE <i>Canavalia ensiformis</i> | 62 |
| 3.4 | AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES LIGANTE-ENZIMA DOS COMPOSTOS ATRAVÉS DE TÉCNICAS AVANÇADAS DE RMN..... | 62 |
| 3.4.1 | Preparação das Amostras..... | 62 |
| 3.4.2 | Experimentos de STD e DOSY..... | 63 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 64 |
| 4.1 | ATIVIDADE ANTIOXIDANTE..... | 64 |
| 4.2 | ATIVIDADE LEISHMANICIDA..... | 69 |
| 4.3 | ATIVIDADE INIBITÓRIA FRENTE À UREASE <i>C. ensiformis</i> | 71 |
| 4.4 | AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES LIGANTE-PROTEÍNA DOS COMPOSTOS ATRAVÉS DE TÉCNICAS DE RMN..... | 74 |
| 4.4.1 | Saturation Transfer Difference (STD)..... | 75 |
| 4.4.2 | Difusion Ordered Spectroscopy (DOSY)..... | 75 |
| 5 | CONCLUSÃO | 80 |
| | REFERÊNCIAS | 81 |
| | APÊNDICES | 86 |

CAPÍTULO I

Síntese, caracterização e estudo *in silico* de tioidantoinas.

1. INTRODUÇÃO

A última parte dos séculos XIX e XX testemunharam avanços impressionantes na área da metodologia sintética, que impulsionou a arte da síntese orgânica para níveis mais elevados de elegância, praticidade e eficiência.

No início dos anos 1800, os cientistas já tinham aprendido a isolar muitos compostos das plantas. No entanto, eles pensavam que a força vital nas plantas era a única maneira de produzir esses compostos. Em 1828 Friedrich Wohler foi o primeiro cientista a produzir sinteticamente um destes compostos, a ureia **(1)** (Figura1). Essa descoberta fez com que os cientistas percebessem que esses compostos orgânicos poderiam de fato ser sintetizados (NICOLAU, 2014).

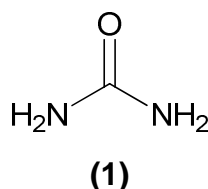


Figura 1. Estrutura química da ureia.

Um exemplo clássico em síntese de moléculas para uso farmacêutico foi a Talidomida **(2)**, lançada, em 1956, que logo se tornou um dos mais populares medicamentos na Europa, principalmente na Alemanha, seu país de origem.

As indicações da talidomida estenderam-se à combate de sintomas como tosse, asma, dor de cabeça e enjôos para mulheres grávidas usada livremente em mais de 40 países. Em meados de 1959 médicos começaram a perceber o fato da ocorrência de deformação congênita principalmente nos membros de milhares de bebês, estar associado ao uso clínico da talidomida causando um desastre histórico, envolvendo o uso de medicamentos (MARTÍNEZ-FRÍAS, 2011).

Apenas na década de 60, se descobriu o que provocou a ocorrência desses fatos, a Talidomida é um composto quiral que possui dois enantiômeros (Figura 2) e foi utilizada nas prescrições médicas em sua forma racêmica, onde o enantiômero *R* possuía as atividades analgésicas e sedativas mas no entanto o enantiômero *S* possuía efeito teratogênico responsável por essas más formações (MARTÍNEZ-FRÍAS, 2011).

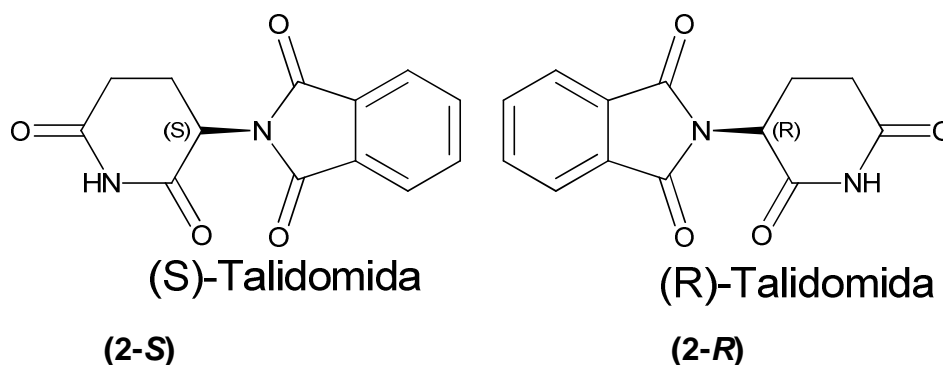


Figura 2. Estrutura para os enantiômeros da Talidomida.

Em 1874, houve mais avanços de extrema importância na química orgânica. Os cientistas começaram a perceber que, às vezes, os compostos reagiam de maneiras diferentes, mesmo que tivessem a mesma fórmula química. Eles perceberam que as diferenças eram devidas à direção que os átomos estavam dispostos no átomo de carbono. Jacobus van 't Hoff e Joseph-Achille Le Bel desenvolveram um sistema para indicar o modo como esses átomos estavam dispostos no carbono, chamado de representação estereoquímica em 3D. Um descoberta de grande relevância para a aplicabilidade da síntese de compostos (RIDDEL & ROBISON, 1974).

Dentre o desenvolvimento de métodos podemos destacar duas das descobertas em síntese orgânica de grande relevância: a reação de Wittig para a construção de duplas ligações carbono-carbono, desenvolvida pelo químico alemão Georg Wittig, e a reação de hidroboração, desenvolvida pelo químico americano Herbert C. Brown, os quais compartilharam o Prêmio Nobel de Química em 1979 por seu desenvolvimento do uso de compostos que contêm boro e fósforo, respectivamente (MAERCKER, 2011; BROWN *et al.*, 1973).

A síntese orgânica em geral levou a uma série impressionante de benefícios para a sociedade, incluindo produtos úteis que vão desde produtos farmacêuticos, corantes, cosméticos, produtos químicos agrícolas, a materiais de alta tecnologia usados em computadores, telefones celulares e naves espaciais.

Os fármacos de origem sintética representam significativa parcela do mercado farmacêutico, estimado em 2000, em 390 bilhões de dólares. Até 1991, entre os fármacos usados na terapêutica, 79% eram de origem sintética. Sobre as estruturas dos fármacos empregados na terapêutica, constata-se que 62% deles são heterocíclicos. (MENEGATTI *et al.*, 2001).

Desta maneira, a química desses compostos tem sido um campo de intensos estudos devido as diversas atividades farmacológicas apresentadas por estas substâncias.

As tioidantoínas são compostos heterocíclicos que possuem um anel de cinco membros do tipo 2-tioxo-imidazolidin-4-onas. Portanto são derivados sulfurados das hidantoínas, as quais possuem uma carbonila no carbono C-2 ao invés de um grupo tioxo. São possíveis variações estruturais das tioidantoínas que estão representados na Figura 3.

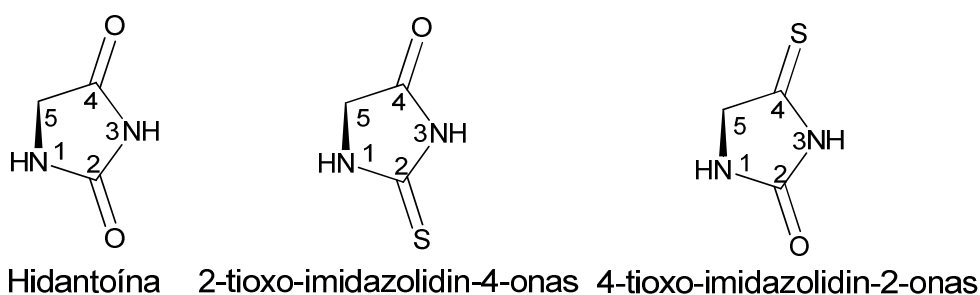
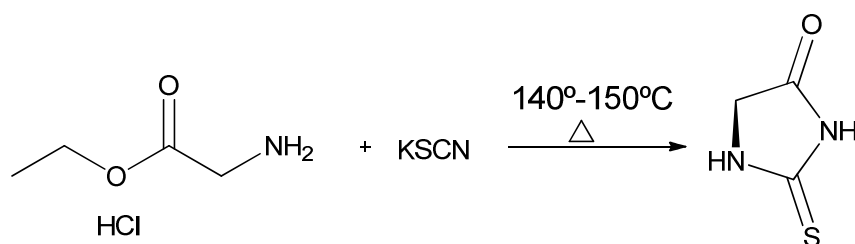


Figura 3. Estrutura geral para hidantoínas e tioidantoínas.

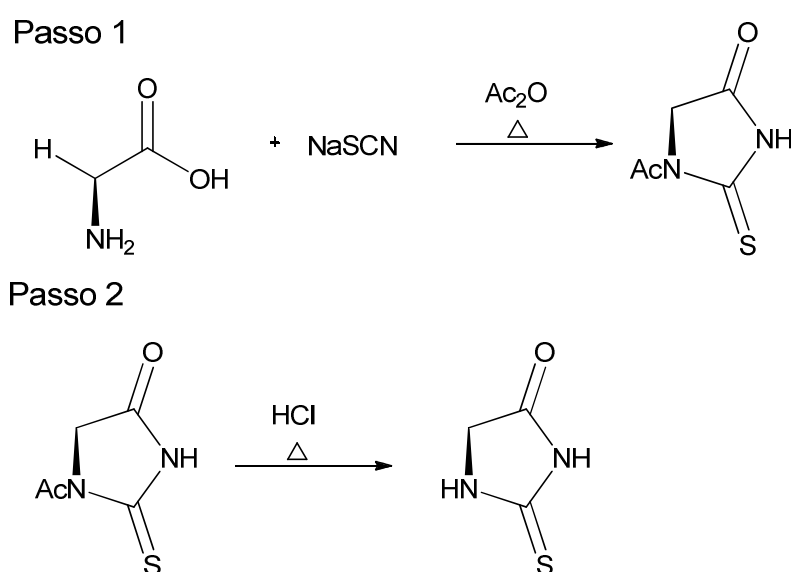
As hidantoínas são ácidos fracos (pKa 9,12) devido à dissociação do próton ligado ao átomo de nitrogênio na posição 3, quando comparadas as tioidantoínas sutilmente mais ácidas (pKa 8,5) uma vez que o grupo tiocarbonila é mais atrator de elétrons que o grupo carbonila (ZIEF & EDSALL, 1937). Importantes artigos de revisão sobre tioidantoínas escritos por WARE (1950) e EDWARD (1966) relatam que os derivados tiocarbonilados são mais facilmente sintetizados e isolados, e por sua vez, possuem maior reatividade quando comparados aos compostos carbonilados.

A primeira síntese de tioidantoínas foi proposta por KLASON em 1890, onde o autor relata a reação do cloridrato de aminoacetato de etila com tiocianato de potássio (Esquema 1).



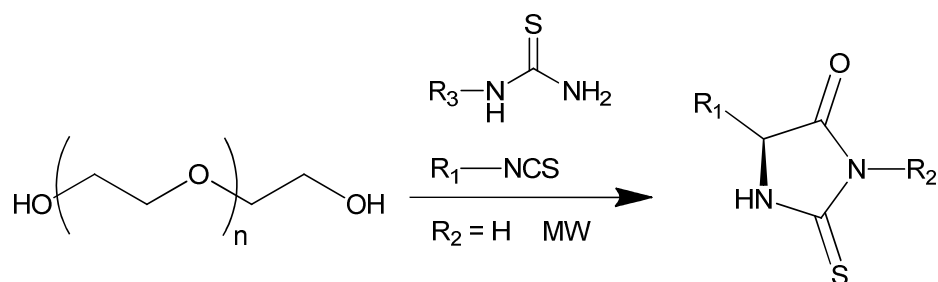
Esquema 1. Obtenção de tioidantoína a partir da reação do cloridrato de aminoacetato de etila com tiocianato de potássio

Posteriormente em 1911, KOMATSU sintetizou a tioidantoína a partir da reação entre o tiocianato de sódio e glicina. Ele observou que a glicina reagiu com o tiocianato de sódio na presença de anidrido acético resultando em uma tioidantoína acetilada que posteriormente pode ser convertida em uma tioidantoína através da reação de hidrólise na presença de um ácido forte como o ácido clorídrico (Esquema 2).



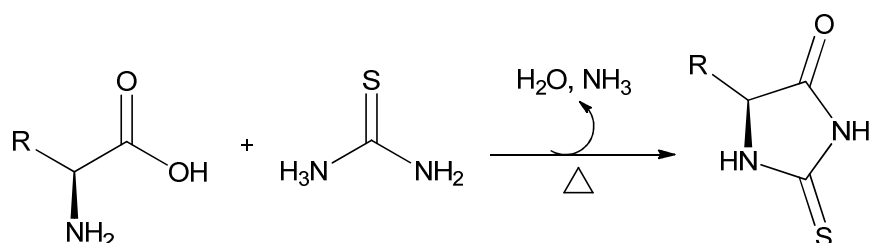
Esquema 2. Passo 1: Obtenção de 1-acetil-2-tioidantoína a partir da reação da glicina com tiocianato de potássio. Passo 2: Obtenção da 2-tioidantoína a partir da reação com HCl

Outros métodos eficientes foram desenvolvidos para síntese desses compostos. LIN *et al.* (2003), relataram a síntese combinatória em fase líquida de tioidantoínas 3,5-dissubstituídas assistida por microondas, na qual os produtos desejados foram liberados da matriz solúvel utilizada com um bom rendimento e pureza (Esquema 3).



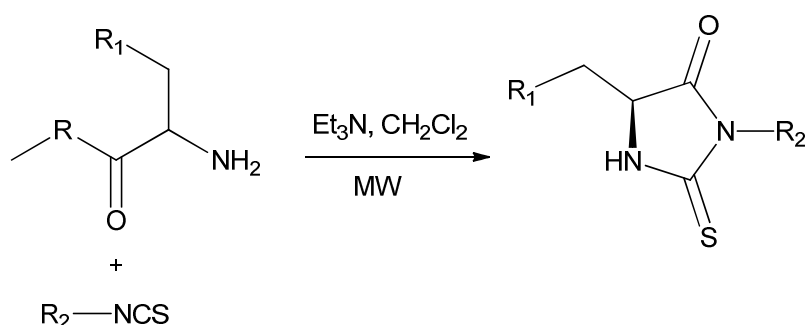
Esquema 3. Síntese combinatória em fase líquida de 3,5-dissubstituídas-tiohidantóinas assistida por microondas

Já em 2006, WANG *et al.*, relataram um método simples para a preparação de derivados tiohidantóinicos a partir de aminoácidos. Esta reação envolve a condensação direta entre α -amino ácidos e tioureia (Esquema 4).



Esquema 4. Síntese de 2-tiohidantóinas a partir da reação de um aminoácido com tioureia

Em 2015 SELVARAJU e colaboradores descreveram a síntese de tiohidantóinas através da reação de diversos aminoésteres e tiocianatos em diclorometano e trietilamina (Esquema 5).



Esquema 5. Síntese *one pot* de tiohidantóinas usando micro-ondas.

Ferramentas de modelagem molecular ou estudos de relações qualitativas entre uma estrutura atividade ou estrutura propriedade com base em bancos de dados estão sendo cada vez mais integradas ao processo de planejamento de

fármacos, agregando valor na busca de compostos bioativos com propriedades que podem ser otimizadas para aplicação à Química Medicinal.

Um exemplo de empregabilidade de um desses métodos é o estudo *in silico* (expressão usada com o significado de “executado em computador”) através da “regra dos cinco de Lipinski”, que pode fornecer parâmetros relacionados à biodisponibilidade oral e topologia de novas moléculas, a fim de serem analisados os potenciais dos compostos como fármacos (LIPINSKI *et al.*, 2001).

A biodisponibilidade oral se refere à fração do fármaco administrado que chega de fato à via sistêmica, onde poderá encontrar seu receptor-alvo e exercer o efeito terapêutico (LIPINSKI *et al.*, 2001).

As regras estabelecem que para uma boa absorção e permeabilidade a molécula deve ter:

- Número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio ($nALH$) menor ou igual a 10.
- Número de grupos doadores de ligação de hidrogênio ($nDLH$) menor ou igual a 5.
- Massa Molecular (MM) menor ou igual a 500.
- Coeficiente de partição octanol-água (milogP) menor ou igual a 5.

Moléculas que violam mais do que uma das regras, podem ter problemas com a biodisponibilidade.

Além das propriedades moleculares propostas por LIPINSKI, outra propriedade tem sido discutida, a área da superfície polar (PSA, do inglês, *polar surface area*), que se define pela soma das superfícies de átomos de uma molécula polar, e pode ser considerada na análise da permeabilidade celular. Valores inferiores a 140 Å² indicam uma boa permeabilidade do fármaco na membrana plasmática celular (ERTL, P.; ROHDE, B.; SELZER, P., 2000). A avaliação *in silico* da toxicidade de moléculas inclui efeitos mutagênico, tumorigênico, irritante e sobre a reprodução.

2. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GERAL

Obtenção de tioidantoínas derivadas de aminoácidos.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar os compostos obtidos através da análise dos espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C .

Realizar o Estudo *in silico* dos compostos sintetizadas.

3. METODOLOGIA

3.1 SÍNTESE DAS TIOIDANTOÍNAS

3.1.1 Reagentes e Solventes

Os solventes ácido clorídrico, anidrido acético e acetato de etila de grau P.A. foram empregados sem qualquer tipo de tratamento.

Os aminoácidos empregados L-Alanina, L-Asparagina, L-Arginina, L-Fenilalanina, L-Glicina, L-Histidina, L-Leucina, L-Metionina, L-Prolina, L-Tirosina, L-Treonina, L-Triptofano e L-Valina foram utilizados em suas formas comerciais sem qualquer tipo de purificação.

Foram utilizadas placas de cromatografia em camada de sílica dopada com fluoresceína da marca Macherey-Naguel e resina celite 545 mex. da marca Cerrana.

3.1.2 Procedimento para a síntese das tioidantoínas (**5a-n**)

As tioidantoínas (**5a-n**) foram obtidas a partir da metodologia descrita por WANG, *et al.* (2006).

Em um balão de fundo redondo uma mistura de α -aminoácido (**3a-n**) (20 mmol) e tioureia (**4**) (60 mmol) foi aquecida em placa de aquecimento sob agitação magnética, utilizando banho de óleo, por 45 minutos a 180 °C. Posteriormente o sistema foi deixado em repouso para resfriamento até aproximadamente 100 °C quando 25 mL de água destilada foram adicionados. A mistura resultante foi reaquecida para dissolver todo sólido presente e em seguida deixada em repouso para resfriamento até temperatura ambiente e armazenada em geladeira por aproximadamente 3 horas. O produto cristalizado foi filtrado e lavado com água gelada.

3.1.3 Procedimento para a síntese das acetil-tioidantoínas (**6a-n**) e tioidantoínas (**5a-b, 5e e 5l**)

As acetil-tioidantoínas **6a-n** foram obtidas através de metodologia descrita por KOMATSU (1911), e posteriormente foram convertidas nas tioidantoínas (**5a-b, 5e e 5l**) através de reação em meio ácido.

À uma mistura de tiocianato de amônio (13,3 mmol) e de α -aminoácido correspondente (13,3 mmol) foi adicionada o anidrido acético (79,3 mmol). Então a mistura reacional foi disposta a aquecimento a 100°C com agitação magnética por 30 minutos. Após o término da reação, a mistura permaneceu em repouso até atingir temperatura ambiente, quando 20 mL de uma mistura de água destilada gelada e gelo foi adicionada. Posteriormente armazenou-se em geladeira por 24 horas. Após a filtração do precipitado formado, o produto bruto foi purificado por recristalização em água e seco em auto vácuo.

As acetil-tioidantoínas (**6a-n**) obtidas anteriormente foram convertidas em tioidantoínas por meio de reação com uma solução 5M de ácido clorídrico disposta em aquecimento por 60 minutos. Então, a mistura reacional permaneceu em repouso até temperatura ambiente e posteriormente, extraiu-se a mistura reacional com 3 porções de 50 mL de acetato de etila. As fases orgânicas foram reunidas e secas com MgSO₄ anidro e evaporadas à pressão reduzida fornecendo as tioidantoínas de interesse.

3.2 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

Os produtos obtidos foram caracterizados por pontos de fusão (pf), determinados em aparelho de placa quente marca Microquímica MQAPF 302. Os espectros de RMN foram obtidos num espectrometro Bruker Avance Modelo III operando a 400,13 MHz para ¹H e a 100,61 MHz para ¹³C utilizando uma sonda de banda larga de 5 mm. Espectros de RMN foram registrados utilizando DMSO-*d*₆ ou D₂O como solvente e TMS como padrão interno. Deslocamentos químicos (δ) foram referenciados para os sinais do TMS. A multiplicidade dos prótons nos espectros de RMN de ¹H são relatados como simpleto (s), duplete (d), duplo-duplete (dd), tripleto

(t), quarteto (q) e multiplete (m). As constantes de acoplamento (J) são relatadas em Hz.

3.3 ESTUDO *IN SILICO* DAS TIOIDANTOÍNAS

Os compostos foram submetidos a um estudo *in silico* através do cálculo da “regra dos cinco de Lipinski”, a qual fornece parâmetros relacionados à biodisponibilidade oral e topologia das novas moléculas, por meio de duas plataformas eletrônicas e de acesso gratuito:

- ***Molinspiration online property calculation toolkit***

Disponível em: <http://www.molinspiration.com>

- ***Osiris Property Explorer***

Disponível em: <http://www.organic-chemistry.org/prog/>

A porcentagem de absorção pôde ser calculada a partir do valor de PSA fornecido pela plataforma ***Molinspiration*** utilizando a equação:

$$\%ABS = 109 - 0,345 \times PSA$$

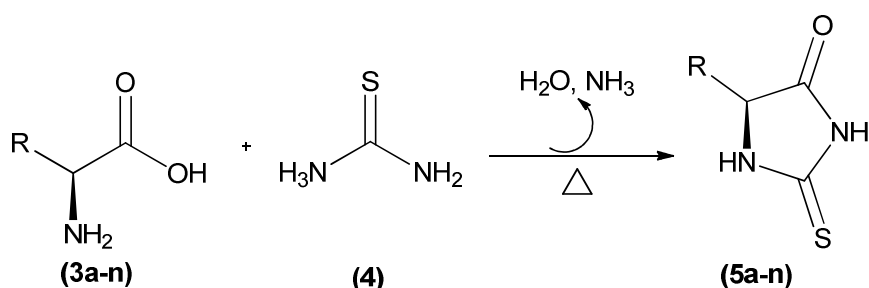
A avaliação *in silico* da toxicidade de moléculas que inclui efeitos mutagênicos, tumorigênicos, irritantes e sobre a reprodução foi realizada pela plataforma *Osiris*, onde os valores 1,0; 0,8 e 0,6, indicam que os fragmentos apresentam nenhum risco, médio risco e alto risco de toxicidade, respectivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SÍNTESE DAS TIOIDANTOÍNAS

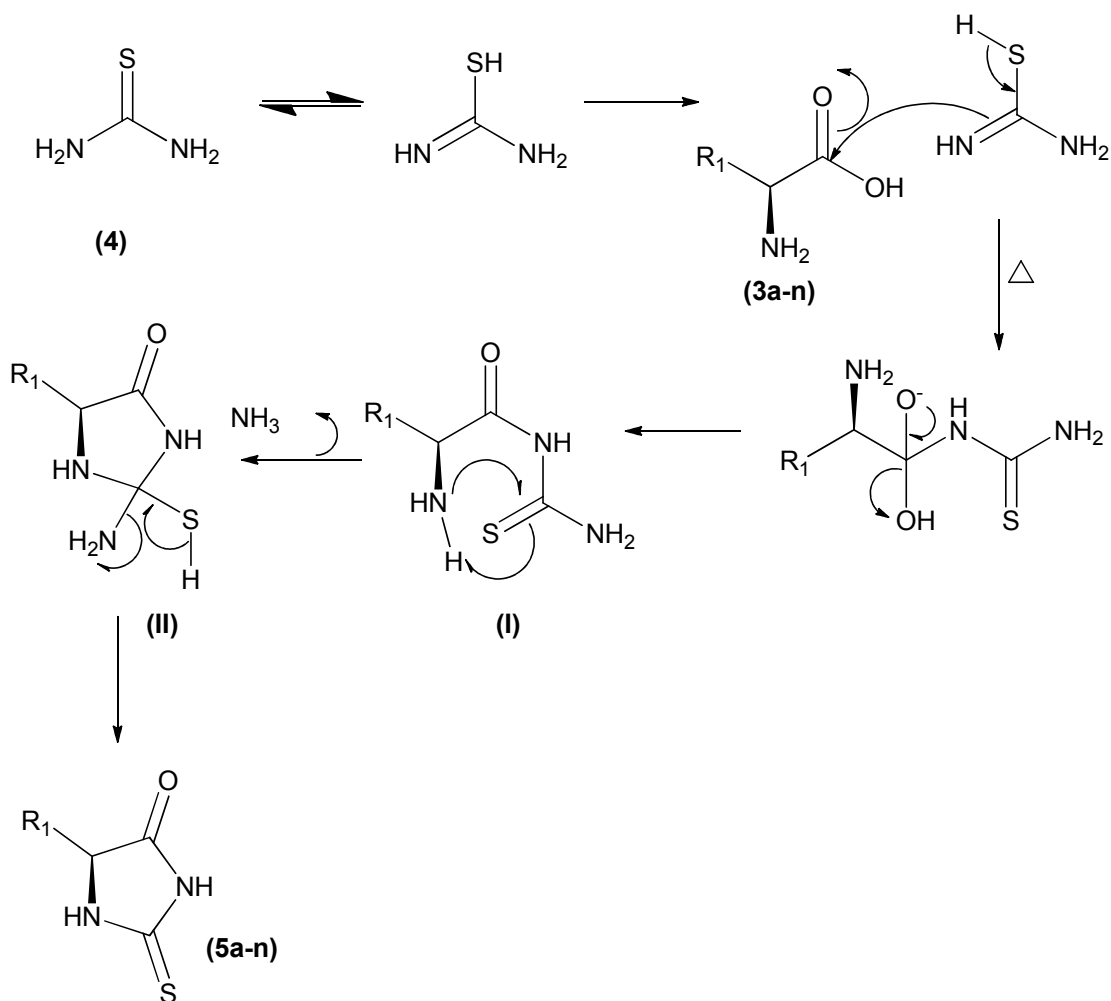
As tioidantoínas foram preparadas através de duas metodologias distintas.

A primeira metodologia utilizada, descrita por WANG *et al.*, (2006), baseou-se na reação de condensação direta entre α -aminoácidos e tioureia na ausência de solvente (Esquema 6). Todos os produtos foram isolados através de recristalização em água.



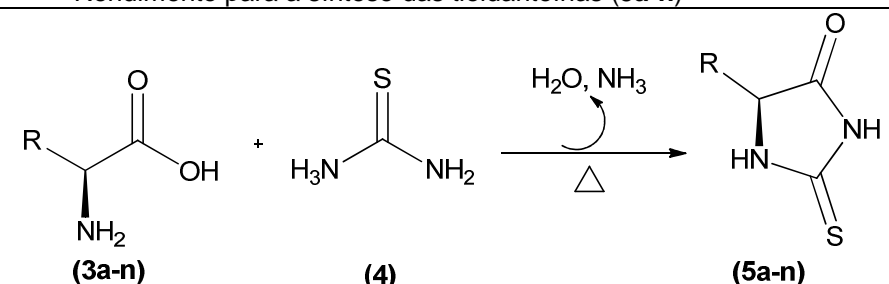
Esquema 6. Síntese das tioidantoínas (**5a-n**) a partir da reação de aminoácidos (**3a-n**) com tioureia.

O mecanismo proposto (Esquema 7), envolve o ataque de um dos nitrogênios da tioureia (**4**) à carbonila do aminoácido (**3a-n**) gerando uma amida (**I**) após a perda de uma molécula de água. Em seguida, o grupo α -amino da amida ataca a tiocarbonila intramolecular, formando o intermediário (**II**) que posteriormente se interconverte em uma tioidantoína (**5a-n**), com a evolução de uma molécula de amônia (WANG *et al.*, 2006).



Esquema 7. Mecanismo proposto para a síntese das tioidantoínas (5a-n). Adaptado de (WANG, *et al.*, 2006).

De modo geral observou-se que os aminoácidos com cadeias laterais não polares, tais como fenilalanina, leucina, metionina e valina reagiram com a tiourea para formar as correspondentes tioidantoínas, obtendo-se rendimentos bons a moderados como demonstrado na Tabela 1 (Entradas 1-14).

Tabela 1. Rendimento para a síntese das tioidantoínas (**5a-n**)


| Entrada | Aminoácido (3) | R | Tioidantoína (5a-n) Rendimento (%) |
|---------|---------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 1 | Alanina (a) | CH ₃ | * |
| 2 | Asparagina (b) | NH ₂ COCH ₂ | * |
| 3 | Arginina (c) | Guanidina(CH ₂) ₃ | * |
| 4 | Fenilalanina (d) | PhCH ₂ | 71 |
| 5 | Glicina (e) | H | * |
| 6 | Glutamina (f) | NH ₂ CO(CH ₂) ₂ | * |
| 7 | Histidina (g) | ImidazolCH ₂ | 35 |
| 8 | Leucina (h) | (Me) ₂ CHCH ₂ | 85 |
| 9 | Metionina (i) | MeS(CH ₂) ₂ | 72 |
| 10 | Prolina (j) | Pirrolidina | 37 |
| 11 | Tirosina (k) | <i>p</i> -OH-PhCH ₂ | 63 |
| 12 | Treonina (l) | CH ₃ CH | * |
| 13 | Triptofano (m) | 3-indolCH ₂ | 33 |
| 14 | Valina (n) | (Me) ₂ CH | 62 |

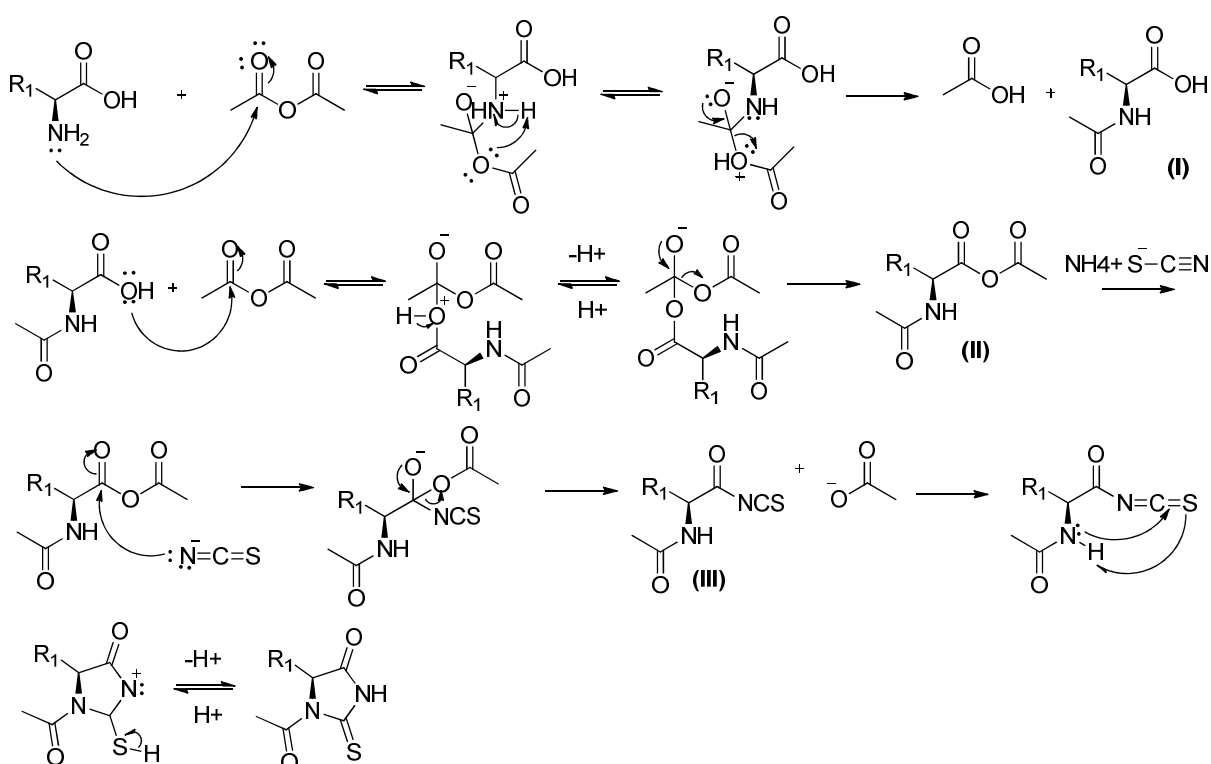
*produto não obtido

Notou-se que os derivados de aminoácidos com cadeias laterais que possuem anéis condensados tais como triptofano e prolina foram obtidos com os menores rendimentos 33% e 37%, respectivamente. Cabe ressaltar que derivados de aminoácidos com cadeias laterais menores, tais como alanina, glicina e derivados de aminoácidos com cadeias laterais polares (com exceção da histidina e tirosina) tais como arginina, asparagina, treonina e glutamina não foram obtidos sob essas condições de reação.

Com o intuito de se obter uma vasta série de compostos para avaliação de suas atividades, utilizamos outra metodologia para a obtenção das tioidantoínas a partir da reação com tiocianato de amônio na presença de anidrido acético (Esquema 9). Esta alternativa resulta em tioidantoínas acetiladas na posição **N**¹ do

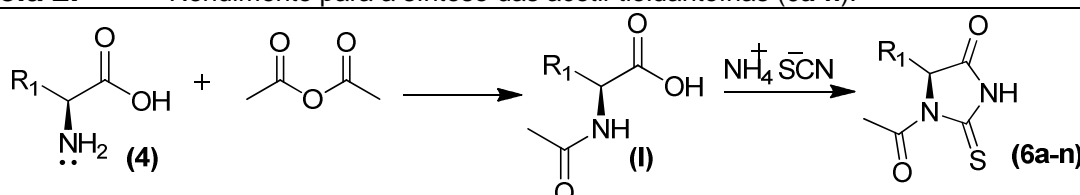
anel, que posteriormente podem ser hidrolisadas sob condições ácidas (KOMATZU, 1911).

O mecanismo proposto (Esquema 8), envolve o ataque do par de elétrons do nitrogênio do aminoácido (**3**) à carbonila do anidrido acético gerando um intermediário acetilado (**I**). Em seguida, os pares de elétrons da hidroxila do aminoácido ataca o grupo carbonila de outra molécula de anidrido acético formando o intermediário (**II**) que posteriormente ao reagir com o tiocianato de amônio leva a formação do intermediário (**III**) que por fim se interconverte a uma acetil tiodantoína.



Esquema 8. Mecanismo proposto para a síntese das tiodantoínas (**6a-n**) em condições ácidas.

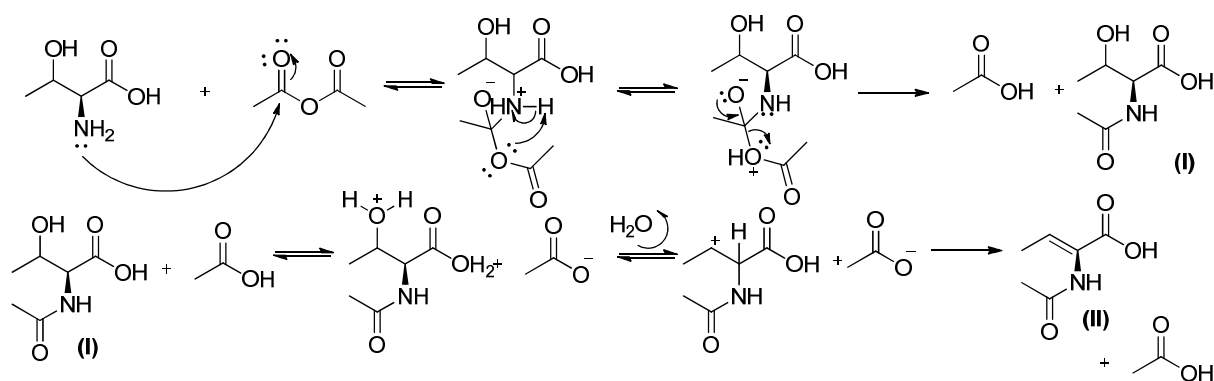
As acetil-tiodantoínas foram obtidas em bons rendimentos e não necessitaram de processos de purificação cromatográfica pois todos produtos foram isolados a partir de cristalização em água e, no caso das tiodantoínas desacetiladas por extração com acetato de etila (Tabela 2, entradas 1-14).

Tabela 2. Rendimento para a síntese das acetil-tioidantoínas (**6a-n**).


| Entrada | Aminoácido (3) | R | Tioidantoína (6a-n) |
|---------|---------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------|
| | | | Rendimento (%) |
| 1 | Alanina (a) | CH ₃ | 95 |
| 2 | Asparagina (b) | NH ₂ COCH ₂ | 51 |
| 3 | Arginina (c) | Guanidina(CH ₂) ₃ | 73 |
| 4 | Fenilalanina (d) | PhCH ₂ | 70 |
| 5 | Glicina (e) | H | 55 |
| 6 | Glutamina (f) | NH ₂ CO(CH ₂) ₂ | 43 |
| 7 | Histidina (g) | ImidazolCH ₂ | * |
| 8 | Leucina (h) | (Me) ₂ CHCH ₂ | 90 |
| 9 | Metionina (i) | MeS(CH ₂) ₂ | 85 |
| 10 | Prolina (j) | Pirrolidina | * |
| 11 | Tirosina (k) | <i>p</i> -OH-PhCH ₂ | * |
| 12 | Treonina (l) | CH ₃ CH | * |
| 13 | Triptofano (m) | 3-indolCH ₂ | 57 |
| 14 | Valina (n) | (Me) ₂ CH | 42 |

*produto não obtido

É interessante ressaltar que a tioidantoína **5l**, derivada da treonina (**3l**) resultou em um produto de eliminação, obtendo-se uma dupla ligação no C-5/C-6 (Esquema 10). Isto deve-se à condição reacional em meio ácido levando ao produto termodinâmico.

**Esquema 9.** Mecanismo proposto para a reação de eliminação de **5l**.

Justamente pela condição ácida reacional a hidroxila presente em **(I)** sofre eliminação resultando no intermediário **(II)**. Posterior a sua formação, **6I** sofre desacetilação nesse mesmo meio reacional levando à formação de **5I** em 56% de rendimento.

As demais acetil-tioidantoínas **6a**, **6b** e **6e**, foram desacetiladas resultando nas tioidantoínas correspondentes (Tabela 3, entradas 1-3) em rendimentos comparáveis às que foram sintetizadas pela metodologia reacional em uma única etapa. Já os derivados **6c** e **6f** não foram obtidos.

Tabela 3. Rendimento para a síntese das tioidantoínas (**5a-b** e **5e**).

CC(=O)N1C(=O)NC(=S)C1R1 >> N1C(=O)NC(=S)C1R1

(6a-n) HCl 5M → **(5a-n)**

| Entrada | Aminoácido (3) | R | Tioidantoína (5a-b, 5e) |
|----------|-------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------|
| | | | Rendimento (%) |
| 1 | Alanina (a) | CH ₃ | 92 |
| 2 | Asparagina (b) | NH ₂ COCH ₂ | 27 |
| 3 | Arginina (c) | Guanidina(CH ₂) ₃ | * |
| 4 | Glicina (e) | H | 52 |
| 5 | Glutamina (f) | NH ₂ CO(CH ₂) ₂ | * |

*produto não obtido

Com emprego de ambas metodologias foi possível se obter 12 derivados tioidantoínicos e 10 derivados tioidantoínicos acetilados onde suas estruturas estão representadas na Figura 4.

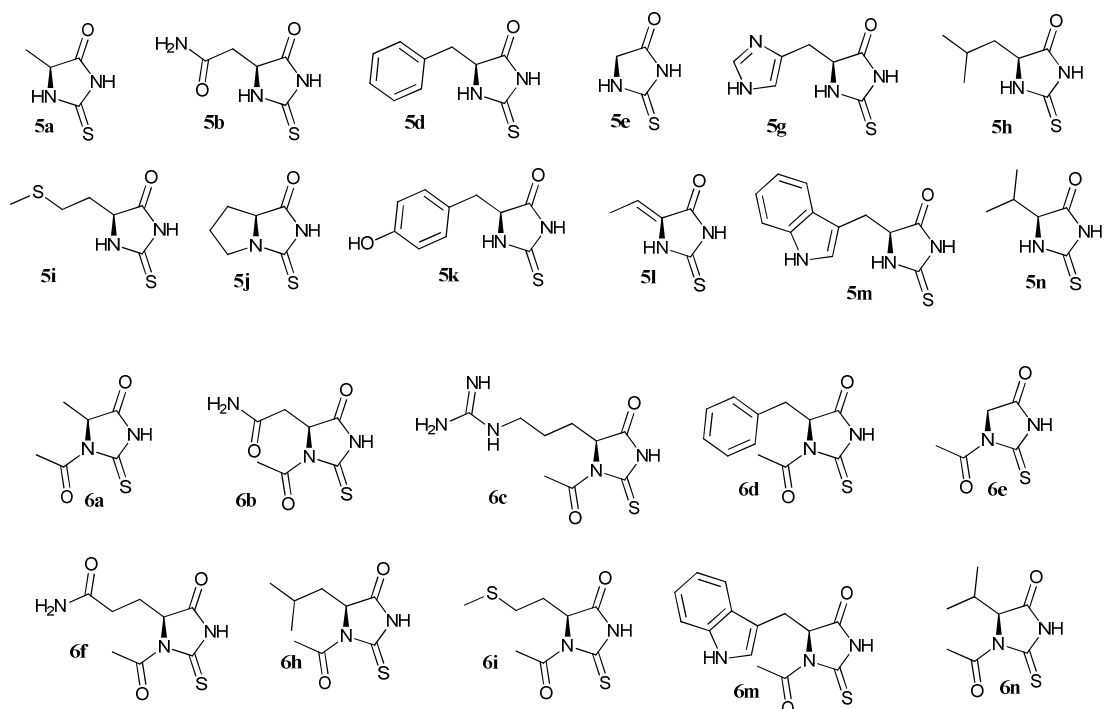


Figura 4. Estrutura para as tioantoinas e acetil tioantoinas sintetizadas.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS TIOANTOÍNAS

A confirmação da formação das tioantoinas **5a-n** foi realizada pela análise dos dados de RMN de ^1H cujos sinais entre δ_{H} 9,9 e δ_{H} 12,7 indicaram a presença dos dois grupos NH. Os sinais entre δ_{H} 4,1-4,8 ppm foram atribuídos aos hidrogênios H_{α} . Os espectros de RMN de ^{13}C apresentaram sinais entre δ_{C} 173-179 para C=O e δ_{C} 182-184 ppm para C=S característicos ao anel tioantoinico.

A título de exemplo podemos observar na Figura 5 o espectro de RMN de ^1H do composto **5e**, onde os sinais provenientes dos NH foram observados no deslocamento de δ_{H} 9,80 e 11,65 ppm como um singleto, assim como o sinal referente aos hidrogênios α -carbonila foram observados na região de δ_{H} 4,08 ppm como um duplete. Na Figura 6 está representado o espectro de RMN de ^{13}C , onde o sinal proveniente da ligação C=S foi observado na região de δ_{C} 183,83 ppm, o sinal referente a ligação C=O na região de δ_{C} 174,98 ppm, e para o carbono α -carbonílico na região de δ_{C} 50,74 ppm.

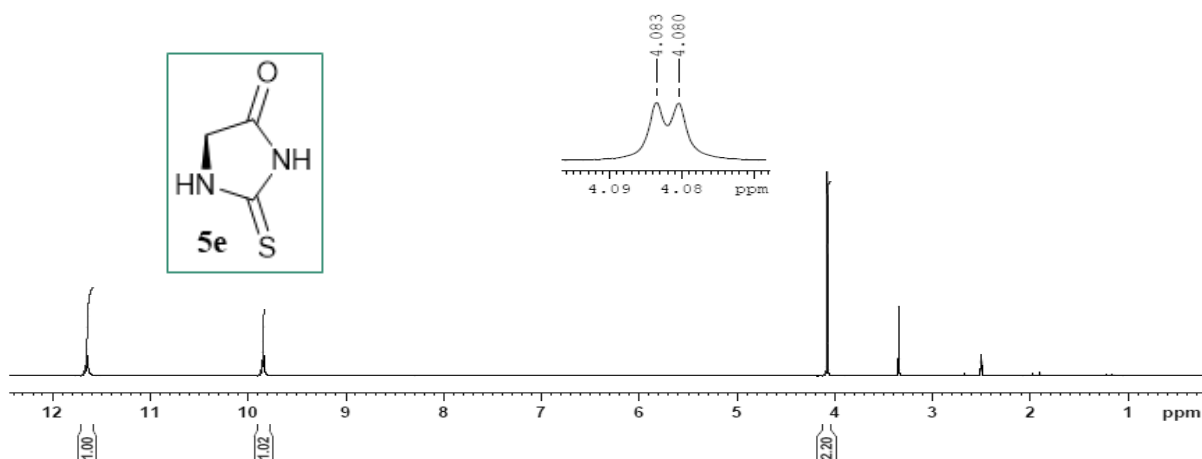


Figura 5. Espectro de RMN de ^1H 5e (400,13 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

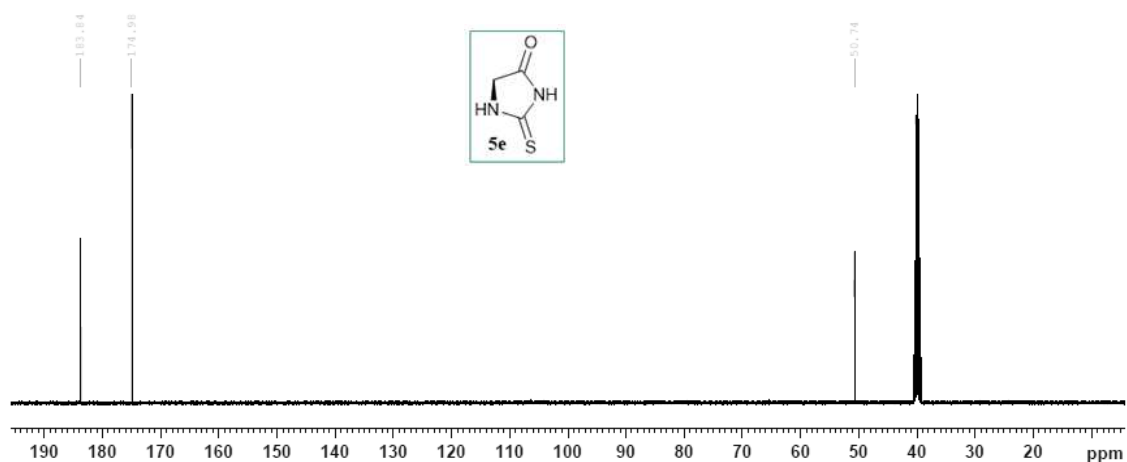


Figura 6. Espectro de RMN de ^{13}C 5e (100,61 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

A formação das acetil-tioidantoínas (**6a-n**) foi confirmada principalmente pela presença dos sinais dos hidrogênios metílicos em δ_{H} 2,70 ppm, além da ausência de um dos sinais referente ao grupo NH devido à sua substituição por um do grupo acetil (vide Apêndice 02). Todos os sinais dos derivados foram confrontados com os dados disponíveis na literatura, e no caso do derivado **6c**, inédito, sua caracterização foi realizada e comparada por semelhança de deslocamentos dos outros derivados já relatados na literatura.

A título de exemplo podemos observar na Figura 7 o espectro de RMN de ^1H do composto **6e**, onde os sinais provenientes do NH foi observado no deslocamento de δ_{H} 12,57 ppm como um singlete, assim como o sinal referente aos hidrogênios α -carbonila foram observados na região de δ_{H} 4,40 ppm como um duplete e os sinais dos hidrogênios metílicos observado na região de δ_{H} 2,68 ppm como um singlete. Na

Figura 8 está representado o espectro de RMN de ^{13}C , onde o sinal proveniente da ligação $\text{C}=\text{S}$ foi observado na região de δc 183,96 ppm, o sinal referente a ligação $\text{C}=\text{O}$ e para o carbono α -carbonílico do anel na região de δc 170,80 ppm e δc 52,64 ppm, respectivamente. E os sinais da ligação $\text{C}=\text{O}$ e do carbono metílico do grupo acetil em 169,76 e 27,05 ppm, respectivamente.

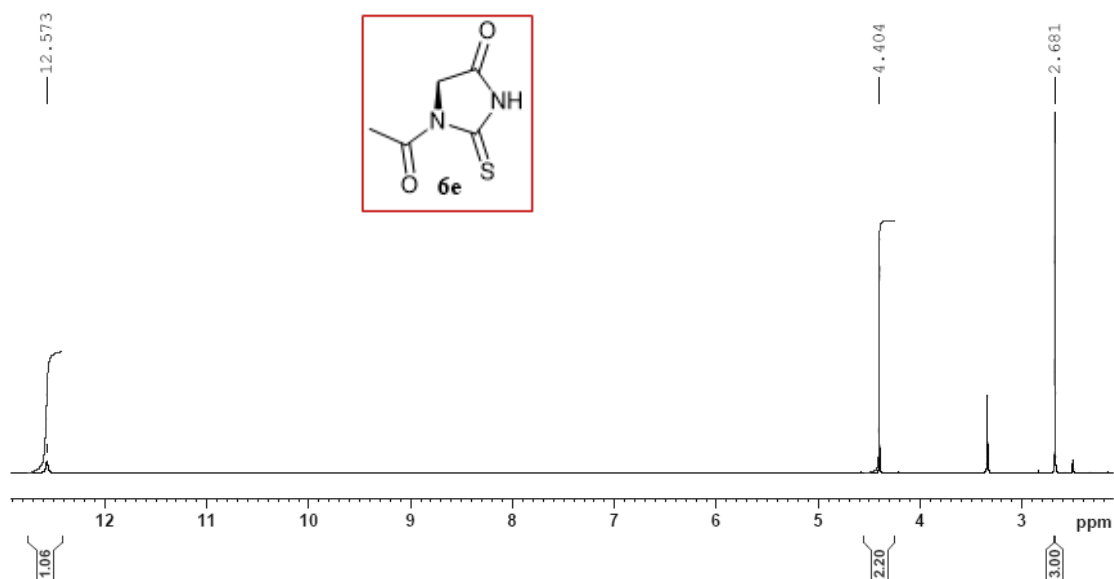


Figura 7. Espectro de RMN de ^1H de 6e (400,13 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

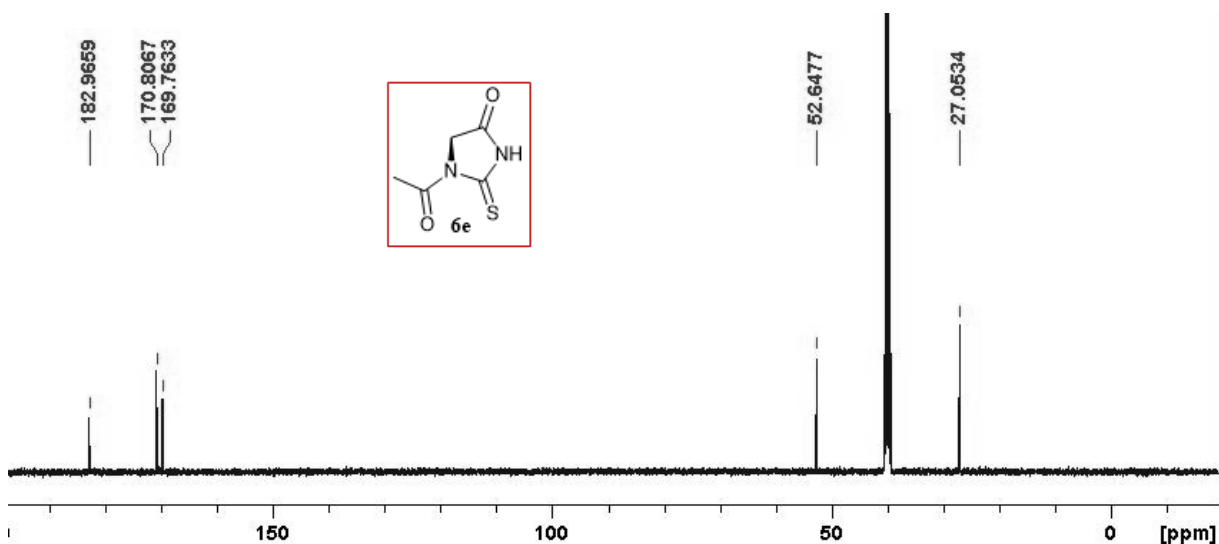


Figura 8. Espectro de RMN de ^{13}C de 6e (100,61 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

4.1 ESTUDOS *IN SILICO* DAS PROPRIEDADES DAS TIOIDANTOÍNAS

O estudo *in silico* foi realizado com o intuito de se obter uma análise preliminar sobre as propriedades e toxicidade dos compostos sintetizados.

Na Tabela 4 encontram-se os valores das regras de Lipinski e da área de superfície polar (PSA) obtidos através do programa *Molinspiration online property calculation toolkit* (<http://www.molinspiration.com>), da porcentagem de absorção (%ABS) calculada para as tioidantoínas (**5a-n**).

Tabela 4. Regras de Lipinski, porcentagem de absorção e área de superfície polar para **5a-n**.

| Aminoácido | R | Tioidantoína | Regras de Lipinsk | | | | | | |
|------------------|-------------------------------------|--------------|-------------------|------|------------------------------|-------------|-----|-------|-----------------|
| | | | ABS | PSA | MM (g.mol ⁻¹) | Millog P | nON | nOHNH | Nº violações |
| Alanina (a) | CH ₃ | 5a | 94,8 | 41,1 | 130,17 | -0,56 | 3 | 2 | 0 |
| Asparagina (b) | NH ₂ COCH ₂ | 5b | 79,9 | 84,2 | 173,20 | -0,32 | 5 | 4 | 0 |
| Fenilalanina (d) | PhCH ₂ | 5d | 94,8 | 41,1 | 206,27 | 0,91 | 3 | 2 | 0 |
| Glicina (e) | H | 5e | 94,8 | 41,1 | 116,14 | -0,89 | 3 | 2 | 0 |
| Histidina (g) | ImidazolCH ₂ | 5g | 84,9 | 69,8 | 196,24 | -0,51 | 5 | 3 | 0 |
| Leucina (h) | (Me) ₂ CHCH ₂ | 5h | 94,8 | 41,1 | 172,25 | 0,75 | 3 | 2 | 0 |
| Metionina (i) | MeS(CH ₂) ₂ | 5i | 94,8 | 41,1 | 190,29 | -0,10 | 3 | 2 | 0 |
| Prolina (j) | Pirrolidina | 5j | 97,8 | 32,2 | 156,21 | -0,25 | 3 | 1 | 0 |
| Tirosina (k) | p-OH-PhCH ₂ | 5k | 87,8 | 61,3 | 222,27 | 0,43 | 4 | 3 | 0 |
| Treonina (l) | CH ₃ CH | 5l | 92,2 | 48,6 | 142,18 | -0,14 | 3 | 2 | 0 |
| Triptofano (m) | 3-indolCH ₂ | 5m | 90,6 | 53,1 | 247,32 | 0,64 | 4 | 3 | 0 |
| Valina (n) | (Me) ₂ CH | 5n | 94,8 | 41,1 | 158,23 | 0,22 | 3 | 2 | 0 |

Pode-se observar através dos resultados das regras de Lipinski para (**5a-n**) que os compostos sintetizados não violaram nenhuma das regras. Os valores de lipofilicidade (miLogP) foram menores que 5, variando de -0,10 a 0,91. Observou-se que a massa molecular ($116,14 > MM < 247,32$), o número de grupos aceptores de ligação hidrogênio ($3 > nALH < 5$) e o número de grupos doadores de ligação de hidrogênio ($1 > nDLH < 4$) estão todos dentro dos valores estabelecidos pelas regras de Lipinski, sugerindo que não haveria problemas com a biodisponibilidade oral destes compostos.

Os compostos apresentaram valores de PSA inferiores a 140 Å² ($32,2 > PSA < 84,2$) o que indica uma boa permeabilidade do fármaco na membrana plasmática celular, com valores de porcentagem de absorção variando de 79,9 a 97,8 %.

Na Tabela 5, encontram-se os resultados do estudo *in silico* sobre os efeitos de toxicidade de (**5a-n**), obtidos através do programa *Osiris Property Explorer* (<http://www.organic-chemistry.org/prog/>), em que se classificam os efeitos mutagênicos, tumorigênicos, irritantes e sobre a reprodução como alto, médio ou baixo risco.

Tabela 5. Avaliação de risco de toxicidade das tioidantoínas (**5a-n**).

| Aminoácido | R | Tioidantoína | Avaliação risco de toxicidade | | | |
|------------------|-------------------------------------|--------------|-------------------------------|--------------|-----------|------------|
| | | | Mutagênico | Tumorigênico | Irritante | Reprodução |
| Alanina (a) | CH ₃ | 5a | Nenhum | Nenhum | Nenhum | Alto |
| Asparagina (b) | NH ₂ COCH ₂ | 5b | Nenhum | Nenhum | Nenhum | Alto |
| Fenilalanina (d) | PhCH ₂ | 5d | Nenhum | Nenhum | Nenhum | Alto |
| Glicina (e) | H | 5e | Nenhum | Nenhum | Nenhum | Alto |
| Histidina (g) | ImidazolCH ₂ | 5g | Nenhum | Nenhum | Nenhum | Alto |
| Leucina (h) | (Me) ₂ CHCH ₂ | 5h | Nenhum | Nenhum | Nenhum | Alto |
| Metionina (i) | MeS(CH ₂) ₂ | 5i | Nenhum | Nenhum | Nenhum | Alto |
| Prolina (j) | Pirrolidina | 5j | Nenhum | Nenhum | Nenhum | Alto |
| Tirosina (k) | <i>p</i> -OH-PhCH ₂ | 5k | Nenhum | Nenhum | Nenhum | Alto |
| Treonina (l) | CH ₃ CH | 5l | Nenhum | Nenhum | Nenhum | Alto |
| Triptofano (m) | 3-indolCH ₂ | 5m | Nenhum | Nenhum | Nenhum | Alto |
| Valina (n) | (Me) ₂ CH | 5n | Nenhum | Nenhum | Nenhum | Alto |

Pode-se observar que todos os compostos não apresentaram efeitos de toxicidade mutagênica, tumorigênica e irritante, somente valores altos de toxicidade sobre reprodução.

Na Tabela 6, encontram-se os valores das regras de Lipinski e da área de superfície polar (PSA) obtidos através do programa *Molinspiration online property calculation toolkit* (<http://www.molinspiration.com>), da porcentagem de absorção (%ABS) calculada para as tioidantoínas acetiladas (**6a-n**).

Tabela 6. Regras de Lipinski, porcentagem de absorção e PSA para **6a-n**

| Aminoácido | R | Tioidantoína | Regras de Lipinsk | | | | | | |
|------------------|---------------------------------------------------|--------------|-------------------|------|---------------------------|---------|-----|-------|--------------|
| | | | ABS | PSA | MM (g.mol ⁻¹) | milog P | nON | nOHNH | N° violações |
| Alanina (a) | CH ₃ | 6a | 91,9 | 49,4 | 172,21 | -0,95 | 4 | 1 | 0 |
| Asparagina (b) | NH ₂ COCH ₂ | 6b | 77,1 | 92,5 | 215,23 | -0,71 | 6 | 3 | 0 |
| Arginina (c) | Guanidina(CH ₂) ₃ | 6c | 70,7 | 111 | 257,32 | -1,53 | 7 | 5 | 0 |
| Fenilalanina (d) | PhCH ₂ | 6d | 91,9 | 49,4 | 248,31 | 0,87 | 4 | 1 | 0 |
| Glicina (e) | H | 6e | 91,9 | 49,4 | 158,18 | -1,28 | 4 | 1 | 0 |
| Glutamina (f) | NH ₂ CO(CH ₂) ₂ | 6f | 77,1 | 92,5 | 229,26 | -1,66 | 6 | 3 | 0 |
| Leucina (h) | (Me) ₂ CHCH ₂ | 6h | 91,9 | 49,4 | 214,29 | 0,72 | 4 | 1 | 0 |
| Metionina (i) | MeS(CH ₂) ₂ | 6i | 91,9 | 49,4 | 232,33 | -0,14 | 4 | 1 | 0 |
| Triptofano (m) | 3-indolCH ₂ | 6m | 86,5 | 65,2 | 287,34 | 1,02 | 5 | 2 | 0 |
| Valina (n) | (Me) ₂ CH | 6n | 91,9 | 49,4 | 200,26 | 0,19 | 4 | 1 | 0 |

Pode-se observar através dos resultados das regras de Lipinski para **(6a-n)** que os compostos sintetizados não violaram nenhuma das regras. Os valores de lipofilicidade (miLogP) foram menores que 5, variando de -0,14 a 0,87. Observou-se que a massa molecular ($158,18 > MM < 287,34$), o número de grupos aceptores de ligação hidrogênio ($4 > nALH < 7$) e o número de grupos doadores de ligação de hidrogênio ($1 > nDLH < 5$) estão todos dentro dos valores estabelecidos pelas regras de Lipinski, sugerindo que não haveriam problemas com a biodisponibilidade oral destes compostos.

Os compostos apresentaram valores de PSA inferiores a 140 \AA^2 ($49,4 > PSA < 92,5$) o que indica uma boa permeabilidade do fármaco na membrana plasmática celular, com valores de porcentagem de absorção variando de 70,7 a 91,9 %.

Na Tabela 7, encontram-se os resultados do estudo *in silico* sobre os efeitos de toxicidade de **(6a-n)**, obtidos através do programa *Osiris Property Explorer* (<http://www.organic-chemistry.org/prog/>), em que se classificam os efeitos mutagênicos, tumorigênicos, irritantes e sobre reprodução como alto, médio ou baixo risco.

Tabela 7. Avaliação de risco de toxicidade das tioidantoínas **(6a-n)**.

| Aminoácido | R | Tioidantoínas | Avaliação risco de toxicidade | | | |
|------------------|---------------------------------------------------|---------------|-------------------------------|--------------|-----------|------------|
| | | | Mutagênico | Tumorigênico | Irritante | Reprodução |
| Alanina (a) | CH ₃ | 6a | Nenhum | Nenhum | Nenhum | Alto |
| Asparagina (b) | NH ₂ COCH ₂ | 6b | Nenhum | Nenhum | Nenhum | Alto |
| Arginina (c) | Guanidina(CH ₂) ₃ | 6c | Nenhum | Nenhum | Nenhum | Alto |
| Fenilalanina (d) | PhCH ₂ | 6d | Nenhum | Nenhum | Nenhum | Alto |
| Glicina (e) | H | 6e | Nenhum | Nenhum | Nenhum | Alto |
| Glutamina (f) | NH ₂ CO(CH ₂) ₂ | 6f | Nenhum | Nenhum | Nenhum | Alto |
| Leucina (h) | (Me) ₂ CHCH ₂ | 6h | Nenhum | Nenhum | Nenhum | Alto |
| Metionina (i) | MeS(CH ₂) ₂ | 6i | Nenhum | Nenhum | Nenhum | Alto |
| Triptofano (m) | 3-indolCH ₂ | 6m | Nenhum | Nenhum | Nenhum | Alto |
| Valina (n) | (Me) ₂ CH | 6n | Nenhum | Nenhum | Nenhum | Alto |

Também se pode observar que todos os compostos não apresentaram efeitos de toxicidade mutagênica, tumorigênica e irritante, somente valores altos de toxicidade sobre reprodução. O que sugere que essa classe possui grupos farmacofóricos semelhantes aos dos fármacos comercializados e nos fornece a previsão de aplicabilidade destes compostos à estudos de atividade biológica, porém não exclui a necessidade da obtenção de dados experimentais que suportem esses resultados.

5. CONCLUSÃO

O estudo *in silico* das duas classes de tioidantoínas demonstrou que todos os compostos sintetizados apresentam propriedades farmacológicas desejáveis do ponto de vista da triagem de substâncias visando o desenvolvimento de novos medicamentos.

A metodologia de condensação direta da tioureia e aminoácidos proteinogênicos permitiu a obtenção eficiente de 8 tioidantoínas em bons rendimentos e alto grau de pureza, sendo purificados diretamente por recristalização. Os derivados de aminoácidos de cadeia curta ou hidrofílica por sua vez foram obtidos em um processo de duas etapas, envolvendo as tioidantoínas acetiladas como intermediários sintéticos. Em conjunto, as duas abordagens foram capazes de fornecer uma série de 12 tioidantoínas, além de outra série de 10 derivados acetilados para triagem de suas bioatividades. Dentre os compostos sintetizados, um deles (**6c**) é relatado aqui de forma inédita.

REFERÊNCIAS

BROWN, H. C.; KRISHNAMURTHY, S.; STOCKY, T. P. Selective Reductions. IXI. the rapid reaction of carboxylic acids with borane-tetrahydrofuran. A remarkably convenient procedure for the selective conversion of carboxylic acids to the corresponding alcohols in the presence of other functional groups. **J. Org. Chem.** v. 38, p. 2786-2792, 1973.

EDWARD, J. T. Thiohydantoins. **Chem. Org. Sulfur. Comp. Eng.** v. 2, p. 287, 1966.

ERTL, P.; ROHDE, B.; SELZER, P. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. **J. Med. Chem.** v. 43, p. 3714, 2000.

KLASON, P.; **Chem. Ztg.** v. 14, p. 543, 1890.

KOMATSU, S.; **Mem. Coll. Sci. Eng. Kyoto Imp. Univ.** v.3, p. 1, 1911.

LIN, M.J.; SUN, C.M. Microwave-assisted traceless synthesis of thiohydantoin **Tetrahedron Letters.** v. 44, p. 8739, 2003.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv. Drug Deliv. Ver.** v.23, p. 3, 2001.

MAERCKER, A. The Wittig Reaction. **Organic Reactions.** v. 14:3, p. 270-490, 2011.

MARTÍNEZ-FRÍAS, M. L. The thalidomide experience: review of its effects 50 years later. **Medicina Clínica.** v. 139 (1), p. 25-32, 2011.

MENEGATTI, R.; MANSSOUR, C. A.; BARREIRO, E. J. A importância da síntese de fármacos. **Cadernos temáticos de Química Nova na Escola.** v. 3, p.16-22, 2011.

NICOLAU, K. C. Organic synthesis: the art and Science of replicating the molecules of living nature and creating others like them in the laboratory. **Proc. R. Soc.** v. 470 p. 1-17, 2014.

RIDDELL, F. G.; ROBINSON, M. J. T. J. H. van't Hoff and J. A. Le Bel –their historical context, **Tetrahedron**, v.30, p. 2001-2007, 1974.

SELVARAJU, M.; SUN, C-M. Unprecedented One-Pot Chemocontrolled Entry to Thioxoimidazolidinones and Aminoimidazolones: Synthesis of Kinase Inhibitor Leucettamine B. **ACS Comb. Sci.** v. 17, p. 182, 2015.

WANG, Z. D.; SHEIKH, S. O.; ZHANG, Y. A simple synthesis of 2-thiohydantoin. **Molecules.** v.11, p. 739, 2006.

WARE, E.; The Chemistry of hydantoins. **Chem. Rev.** v. 46, p. 403, 1950.

ZIEF, M.; EDSALL, J. T. Studies in the physical chemistry of amino acids, peptides and related substances. IX. The dissociation constants of some amino acid derivatives. **J. Am. Chem. Soc.** v. 59, p. 2245, 1937.

CAPÍTULO II

Avaliação das atividades biológicas de tioidantoínas e estudo de suas interações com a enzima urease por RMN.

1. INTRODUÇÃO

1.1 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE TIOIDANTOÍNAS

Como citado anteriormente os fármacos de origem sintética representam significativa parcela do mercado farmacêutico, constatando-se que 62% deles são estruturas heterocíclicas, dentre os quais 95% apresentam-se nitrogenados. Adicionalmente, 28% dos fármacos de estrutura heterocíclica apresentam átomos de enxofre e 18% apresentam átomos de oxigênio. Os valores acima expostos assinalam a importância da química dos heterociclos, demonstrando que muitas vezes pode ocorrer a presença de mais de um heteroátomo no mesmo sistema (MENEGATTI *et al.*, 2001).

Tioidantoínas são compostos de estrutura heterocíclica relatadas na literatura por sua ampla gama de atividades biológicas, citemos alguns exemplos a seguir.

Uma série de heterocíclicos híbridos 3-(3-alkuil-2,6-diaril-piperidina-4-ilideno)-2-tioxo-4-imidazolidina (**7**) foram sintetizados por AHMED e colaboradores, e avaliados quanto à sua atividade antimicrobiana e antifúngica contra *Staphylococcus aureus*, β -*Hemolytic streptococcus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus flavus* e *Candida albicans*, em concentrações inibitórias mínimas de 50-100 $\mu\text{g/mL}$.

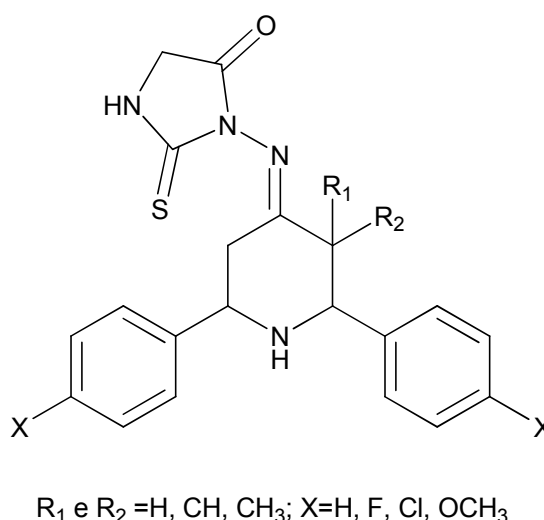


Figura 9. Estrutura para 3-(3-alkuil-2,6-diaril-piperidina-4-ilideno)-2-tioxo-4-imidazolidina.

Um estudo relatado por ROMINE e colaboradores, propõe a síntese do derivado tioidantóinico **(8)**. O composto demonstrou atividade inibitória contra o vírus HCV (Hepatite C) com valor de IC_{50} de 20 μ M.

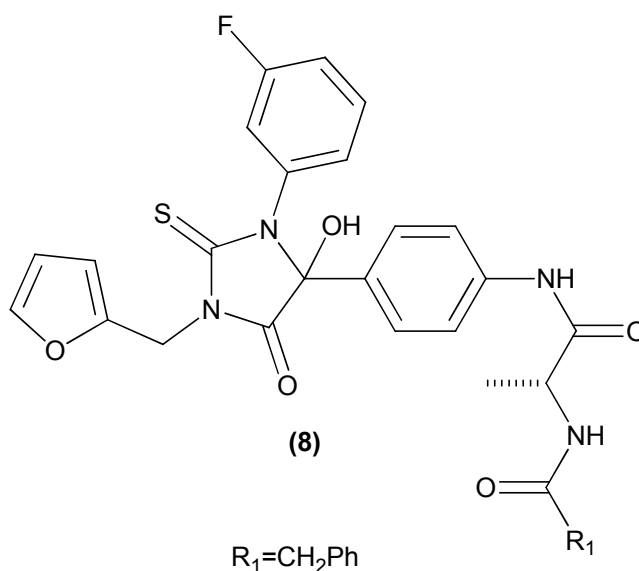


Figura 10. Estrutura para o derivado tioidantóinico **(8)**.

Uma nova série de compostos 2-tioidantóinicos **(9a-b)** apresentaram atividade anticancerígena e se mostraram potentes inibidores da enzima IDH1 (isocitrato desidrogenase) mutante com K_i baixas com valores de até 420 nM. Os autores ainda relatam que estes compostos podem diminuir a concentração celular de D-2-hidroxioglutarato, reduzir os níveis de metilação das histonas, e suprimir a proliferação de células cancerosas (WU *et al.*, 2015).

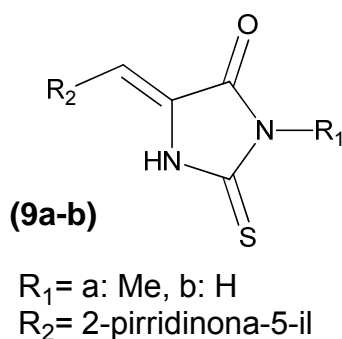


Figura 11. Estrutura para derivado tioidantóinico **(9a-b)**

Tioidantóinas foram testadas sequencialmente em três modelos animais para avaliar os perfis de eficácia e segurança de elevação de HDL (High Density

Lipoprotein). O composto **(10)** mostrou-se o mais promissor da série, causando uma elevação da dose dependente na fração de HDL, em doses de 10 mg/kg/dia em ratos. E aumento de 85% de HDL em uma dose máxima de 100 mg/kg/dia em relação ao modelo controle (ELOKDAH *et al.*, 2004).

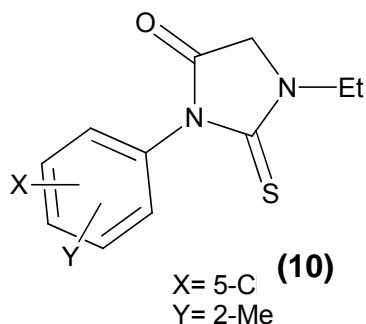


Figura 12. Estrutura para o derivado tiohidantoinico **(10)**

Desta forma o apelo da química medicinal pela busca de novos fármacos mais eficazes para tratamentos de doenças juntamente com o histórico funcional das tiohidantoinas relatado na literatura, nos instigou a avaliar essa classe de compostos frente aos seus potenciais antioxidante, leishmanicida e antiureolítico.

1.2 ANTIOXIDANTES

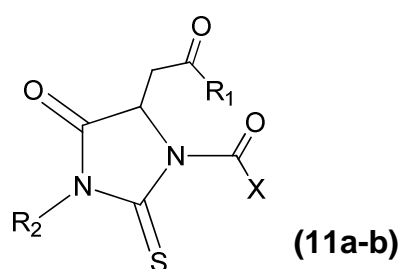
As descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo têm motivado cada vez mais o estudo dos antioxidantes. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. O excesso de radicais livres no organismo apresenta efeitos prejudiciais, estando relacionados com várias patologias, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome), podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (HALLIWEEL *et al.*, 1995).

Os antioxidantes combatem o excesso de radicais livres no organismo, existindo uma correlação entre a atividade antioxidante de substâncias polares e capacidade de inibir ou retardar o aparecimento de células cancerígenas, além de retardar o envelhecimento das células em geral (HO *et al.*, 1994). Os antioxidantes

podem ser produzidos pelo organismo ou absorvidos pela dieta, como por exemplo, o α -tocoferol (vitamina-E), β -caroteno (para o-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos (PIETTA, 2000; HALLIWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992).

De fato, a maior parte dos antioxidantes sintéticos ou de origem natural possui grupos hidroxil-fenólicos nas suas estruturas e as propriedades antioxidantes são parcialmente concedidas pela capacidade desses compostos capturarem radicais livres. Outros compostos heterocíclicos como, por exemplo, as tioidantoínas que possuem grupamentos amida, amina ou outras funções orgânicas, são relatadas na literatura não somente por serem compostos biologicamente ativos, mas por possuírem atividade antioxidante.

Como exemplo, NEDJARKOLLI *et al.* (2014), avaliaram a atividade antioxidante de tioidantoínas (**11a-b**), que apresentaram valores de IC_{50} de 4,9 e 6,18 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, que são muito próximos aos padrões quercetina e ácido ascórbico com IC_{50} de 6,9 e 3,6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 13).



11a: X= NH₂, R₁=C₆H₅, R₂= C₂H₆
 11b: X= CH₂CN, R₁= C₆H₅, R₂= C₂H₆

Figura 13. Estrutura para os derivados tioidantoínicos (**11a-b**)

Outro interesse ligado aos antioxidantes é a sua aplicação na indústria, para a proteção de cosméticos e alimentos (FAURÉ *et al.*, 1984). É interessante ressaltar que fármacos que também possuem atividade antioxidante, podem auxiliar no combate a decomposição oxidativa das células, ao mesmo tempo que exerce seu efeito biológico.

1.3 LEISHMANIOSE

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes a família *Trypanosomatidae*. De modo geral,

essas enfermidades se dividem em leishmanioses tegumentares, que atacam a pele e as mucosas, e viscerais (ou calazar), que atacam os órgãos internos. O protozoário, ou parasito, é transmitido ao homem (e também a outras espécies de mamíferos) por insetos vetores ou transmissores, conhecidos como flebotomíneos. A espécie *Lutzomyia flaviscutellata*, é o principal vetor da *Leishmania amazonensis*. O protozoário *L. amazonensis* é uma espécie de significância epidemiológica no Brasil, e causador da leishmaniose cutânea difusa (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2013).

Para todas as formas de leishmaniose, o tratamento de primeira linha se faz por meio de fármacos à base de antimoniais pentavalentes. Outros medicamentos, comumente utilizados, como segunda escolha são Anfotericina B e a Pentamidina (Figura 14). Todavia, esses fármacos causam muitos efeitos adversos, e além de alto custo e toxicidade, o tratamento é prolongado com duração de pelo menos 20 dias de administração parenteral (SUNDAR & CHAKRAVARTY, 2014).

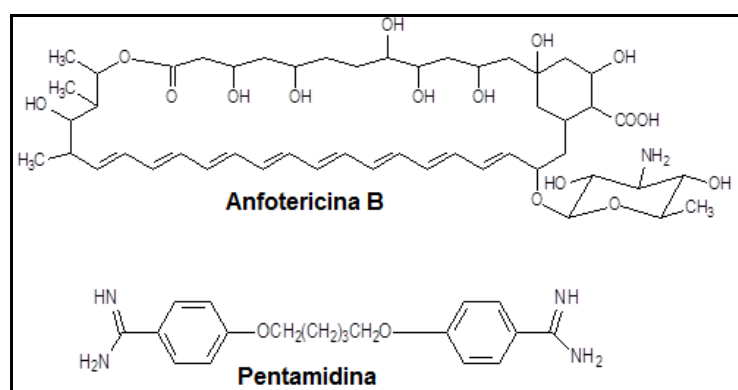


Figura 14. Estruturas moleculares dos fármacos Anfotericina B e Pentamidina.

Tioidantoínas foram relatadas na literatura em 2009 por PORWAL *et al.*, por sua atividade leishmanicida, onde os autores relatam a síntese de uma série de pentamidinas-aplisinopsinas híbridas no qual o composto **(12)** que possuiu em sua estrutura um anel tioidantoínico se mostrou o mais promissor, com valores de inibição de 88,2% no estágio promastigota do parasita (na concentração de 10 µg/mL) e IC₅₀ de 2,00 µM (Figura 15).

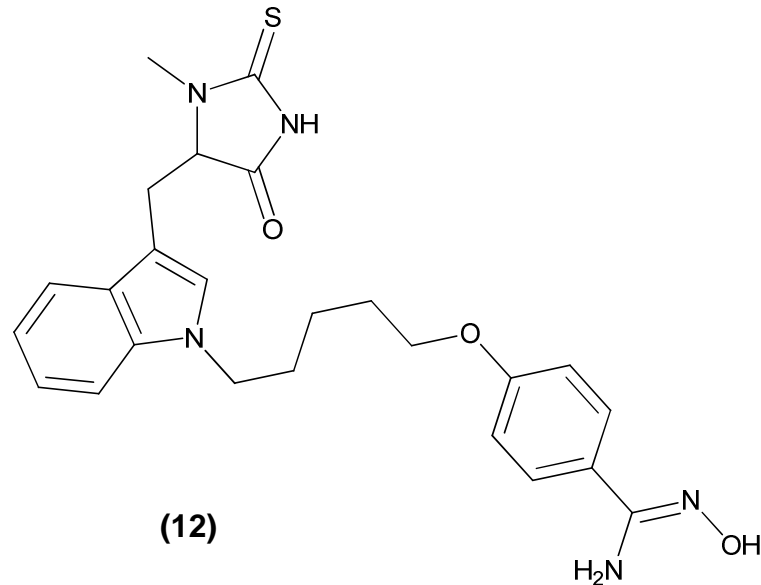
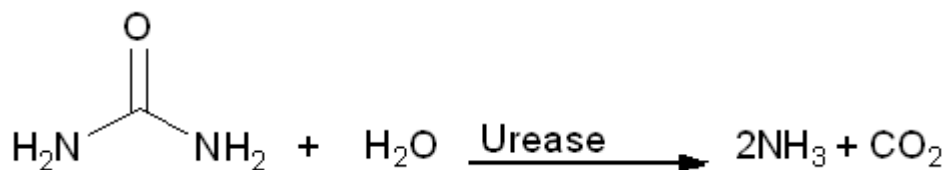


Figura 15. Estrutura para o composto tioidantoinico (12)

1.4 ATIVIDADE ANTIUREOLÍTICA

A urease é uma enzima heteropolímera pertencente à família de amidoidrolases e fosfotriestrases. As enzimas urease catalisam a hidrólise da ureia resultando em amônia e dióxido de carbono (Esquema 6). Estas reações provocam um aumento substancial do pH do meio, o que pode causar efeitos adversos da atividade da urease atuante na agricultura, saúde animal ou na saúde humana.



Esquema 10. Representação esquemática da reação de hidrólise enzimática da ureia

A urease *Canavalia ensiformis* (*Jack Bean* ou Feijão-de-porco) foi a primeira enzima a ser cristalizada comprovando sua natureza proteica (SUMNER *et al.*, 1926). A partir de sua cristalização, pode-se observar que o sítio ativo da urease *Canavalia ensiformis* possui um centro de metal, isto é, dois átomos de níquel (II) (Figura 16).

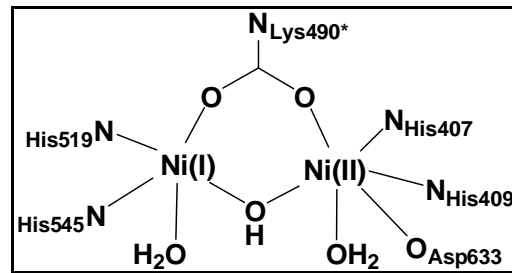


Figura 16. Representação da estrutura do sítio ativo da urease (Adaptado de BENINI *et al.*, 1999)

As ureases se distribuem amplamente em uma variedade de bactérias, fungos, algas e plantas. O papel das ureases em plantas é atribuído, principalmente, ao reaproveitamento de nitrogênio a partir da ureia proveniente de algumas rotas metabólicas.

A ureia é o fertilizante nitrogenado mais empregado no Brasil, correspondendo a aproximadamente 60% do uso total (YAMADA E ABDALLA, 2007). Os fertilizantes desempenham um papel fundamental na produção de alimentos, garantindo alta produtividade e qualidade dos produtos agrícolas, além de auxiliar na diminuição das perdas de nitrogênio das culturas que se devem principalmente pela hidrólise da ureia catalisada pela enzima urease.

Desta forma, os inibidores de urease são conhecidos por auxiliar no aumento da eficiência do uso de nitrogênio da ureia, uma vez que, seu uso faz com que sua hidrólise em NH_3 possa ser retardada, reduzindo a concentração de NH_4^+ no solo e conseqüentemente, o potencial de volatilização de NH_3 . Além do mais, a redução da taxa de hidrólise permite maior tempo para a incorporação do nitrogênio no solo para o cultivo das culturas (JUNEJO *et al.*, 2011).

Os estudos direcionados à identificação de inibidores de ureases de plantas revelam que as substâncias mais promissoras são estruturalmente similares à ureia, o substrato natural dessa enzima (BENINI, 1999; VAREL, 1997; FONT *et al.*, 2008), dentre os quais, destaca-se o *N*-(*n*-butil)triamidatofosfórico (NBPT) (Figura 17).

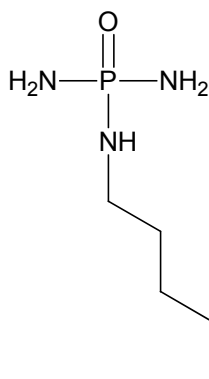


Figura 17. Estrutura do inibidor de urease *N*-(*n*-butil)triamidatofosfórico (NBPT).

O NBPT é o único inibidor de urease (de interesse agrícola) utilizado em formulações a base de ureia sendo comercializado pela Agrotain® com sede nos Estados Unidos da América. Por ser um produto importado, acaba onerando muito os preços dos fertilizantes para os agricultores brasileiros. Além disso, depois de adicionado à ureia, o NBPT tende a perder eficiência com o tempo de armazenamento (HENDRICKSON e DOUGLASS, 1993). A eficiência do NBPT também tende a ser menor em solos ácidos e a altas temperaturas, condições em que as ureases apresentam maior atividade catalítica (CANTARELLA, 2008). Assim, o desenvolvimento de novos inibidores é um campo de investigação de grande relevância.

Derivados de tioureia têm atraído a atenção de vários grupos de pesquisa. Além de sua importância para a farmacologia no tratamento de microrganismos ureolíticos patogênicos (KOGEN *et al.*, 1999), vários estudos têm descrito tioureias com propriedades úteis para a agricultura, tais como fertilizantes (GIOACCHINI *et al.*, 2002) e como reguladores de crescimento de plantas (YONOVA *et al.*, 2009).

ASLAM *et al.*, (2011) relatam a atividade inibitória de uma série de tioureias **(13)** frente à urease *C. Ensiformis* onde os compostos mais potentes demonstraram $k_i = 0,09-127 \mu\text{M}$.

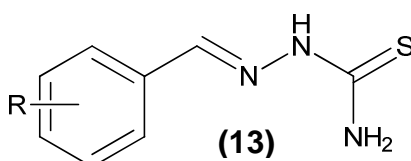


Figura 18. Estrutura para a tioureia **(13)**.

Outro trabalho recentemente publicado por nosso grupo de pesquisa (BRITO et al., 2015), relata a síntese e avaliação de mais de oitenta benzoiltioureas sintetizadas, que revelaram alta capacidade inibitória contra urease de *Canavalia ensiformis*, sugerindo o potencial desta classe de compostos como inibidores de urease para aplicação como fertilizantes. Os compostos (**14a-f**) se mostraram mais promissores da série com percentual de inibição entre 51,7-73,9% mais alto do que o padrão NBPT (inibição de 40%) utilizado em amostras em solo.

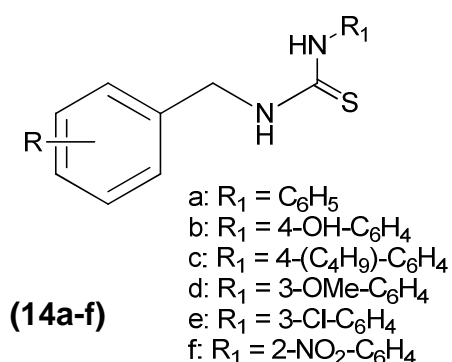


Figura 19. Estrutura de benzoiltioureas (**14a-f**).

Estudos de *Docking* molecular para os compostos com as enzimas urease de *C. ensiformis* (vegetal) e urease de *Helicobacter pylori* (microbiana) relatam que os locais de ligação das duas estruturas de urease indicam semelhança e ambas partilham o mesmo modo de ligação (ARSLAN *et al.*, 2009). Desta maneira, deve ser enfatizado que compostos com atividade inibitória contra urease de *C. ensiformis* em ensaios *in vitro* são considerados como sendo promissores inibidores de ureases microbianas uma vez que esta enzima é altamente conservada evolutivamente e apresenta grande homologia estrutural entre ureases de bactérias, fungos e plantas.

Neste trabalho nós relatamos a avaliação de 17 tioidantoínas com potencial inibidor de ureases e utilizamos de ferramentas como STD e DOSY para o estudo de interações ligante-enzima dos compostos na presença e ausência de enzimas

1.5 ESTUDO DE INTERAÇÕES DE LIGANTES COM PROTEÍNAS POR RMN

Várias técnicas de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) são capazes de co-atuar na identificação de compostos bioativos e na sua otimização, através da comparação de parâmetros espectroscópicos dos compostos na presença e ausência de enzimas (PENG *et al*, 2004). Esta abordagem, baseada na detecção do ligante, torna irrelevante o tamanho da enzima e requer concentrações mínimas desta última (frequentemente $\leq 1\mu\text{M}$). Isto reduz, portanto, a exigência da expressão proteica e purificação.

Experimentos de RMN tais como STD (Saturation Transfer Difference) e DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) são ferramentas poderosas para o estudo de interações ligante-proteínas em através dos sinais de RMN do ligante. Tais abordagens, permitem avaliar séries de compostos bem como mapear os grupos ou átomos específicos do ligante envolvidos na interação com a proteína (PETERS e MEYER, 2003).

Adicionalmente, a caracterização de constante de associação e parâmetros cinéticos também são possíveis, e processos de interações competitivas e efeitos alostéricos também podem ser identificados.

Estas informações auxiliam o planejamento racional de novas gerações de compostos e permite aprimorar o entendimento do mecanismo catalítico, da arquitetura e da dinâmica do sítio ativo das enzimas.

A investigação do mecanismo da atividade inibitória em nível molecular utilizando técnicas de RMN é necessária para compreender como se dá a interação entre os inibidores e a urease, além de fornecer dados qualitativos e quantitativos que permitirão mapear as interações envolvidas no processo de inibição. Os dados obtidos poderão ser utilizados para calcular constantes de associação e dissociação.

1.5.1 Diferença de Transferência de Saturação (STD)

A técnica de RMN denominada STD emergiu como uma das mais populares para o estudo de interações ligante-proteína (CABRITA *et al.*, 2011). Sua principal vantagem deve-se ao fato de estar focado na detecção dos sinais do ligante dispensando assim a necessidade de se utilizar proteínas recombinantes isotopicamente enriquecidas, por exemplo, ^{15}N e ^{13}C . Além disso, por ser uma técnica unidimensional (1D) o STD pode ser realizado em espectrometros de RMN com campos intermediários (300 a 500MHz) rotineiramente disponíveis em Instituições de pesquisa

O experimento de STD baseia-se no equilíbrio químico de associação/dissociação entre um ligante e um receptor, como por exemplo uma proteína (Figura 20a) descrito pela sua constante de dissociação (K_D). Caso os spins da proteína sejam saturados seletivamente por uma radiofrequencia, parte desta saturação pode ser transferida para os spins do ligante durante o período em que ocorre a complexação ente ele e a proteína. Como consequencia deste processo há a atenuação dos sinais do ligante que pode ser melhor observada através da subtração de um espectro adquirido sem a saturação da proteína (*Off-ressonance*) de um espectro onde a proteína é saturada (*on resonance*). O espectro denominado STD consiste precisamente no espectro resultante (diferença) entre estes dois experimentos (Figura 20b).

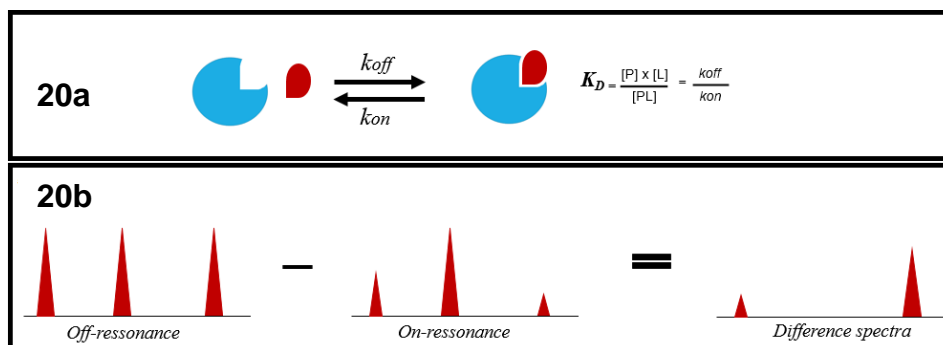


Figura 20. 20a: Equilíbrio químico de associação/dissociação (K_D). 20b: Princípios de um experimento de STD (Adaptado de CABRITA *et al.*, 2011).

1.5.2 Difusion Ordered Spectroscopy (DOSY)

Difusão Molecular, é um dos diversos tipos de “fenômenos de transporte” que ocorrem devido ao movimento browniano que é descrito como o movimento aleatório de uma partícula sem a necessidade de agentes externos, ou seja, um processo espontâneo que foi reportado inicialmente por Robert Brown em meados do século XIX (BROWN, 1866).

Em 1983, BERG realata que a difusão ocorre devido as colisões entre moléculas em líquidos e gases, e se deve pela própria energia térmica do sistema (BERG, 1983).

A difusão molecular pode ser determinada através dos coeficientes de difusão (**D**) pela equação de Stokes-Einsten, que fornece a dependência do coeficiente de difusão de uma partícula esférica em solução, com o seu raio hidrodinâmico **r**, com a viscosidade **η** do solvente e com a temperatura **T** da solução, onde **k** é a constante de Boltzman (SALINAS, 2005).

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_s}$$

Isto fornece informações importantes sobre organização molecular e estrutura de fases. Há várias maneiras de medir os coeficientes de difusão em líquidos, destacando-se as técnicas de ressonância magnética nuclear, como por exemplo o DOSY.

Medidas de difusão por RMN são feitas desde 1950 quando Hahn desenvolveu a sequência de pulsos de “eco de spin”, ou Spin-Eco. Basicamente a técnica envolve a monitoração das amplitudes dos ecos-spin na presença de um gradiente linear de campo magnético com a aplicação de dois pulsos seletivos de 90° e 180° durante um tempo τ , a fim de se medir a difusão molecular. Nesta sequência a perfeita refocalização do vetor magnetização só ocorre se cada spin nuclear se mantiver sob ação de um campo magnético homogêneo durante um tempo τ (Figura 21) (SOUZA, 2002).

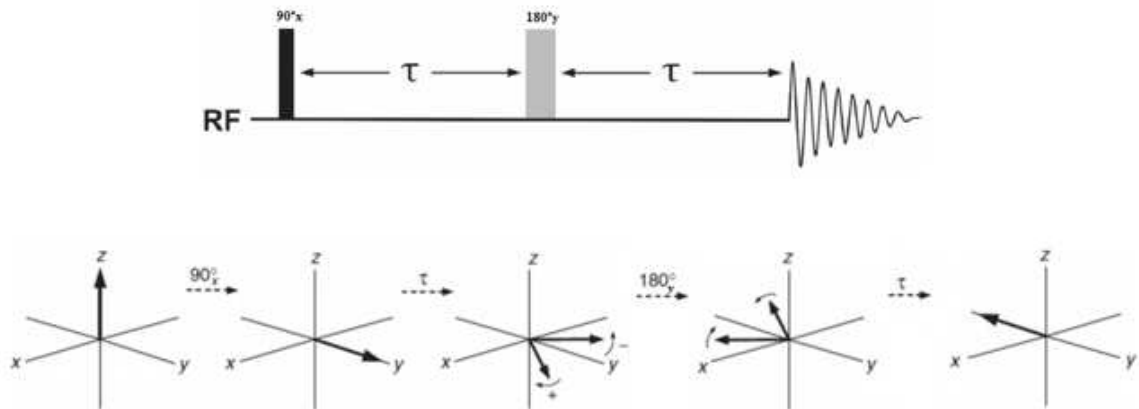


Figura 21. Sequência de pulsos spin-eco (adaptado de HANH, 1950).

Em 1992, Morris e Johnson desenvolveram uma técnica analítica, o DOSY, baseada na metodologia de ecos spin, que permite discriminar e caracterizar os diversos componentes de uma mistura. Em um espectro de DOSY, os deslocamentos químicos são apresentados em uma dimensão e os coeficientes de difusão molecular em outra (Figura 22).

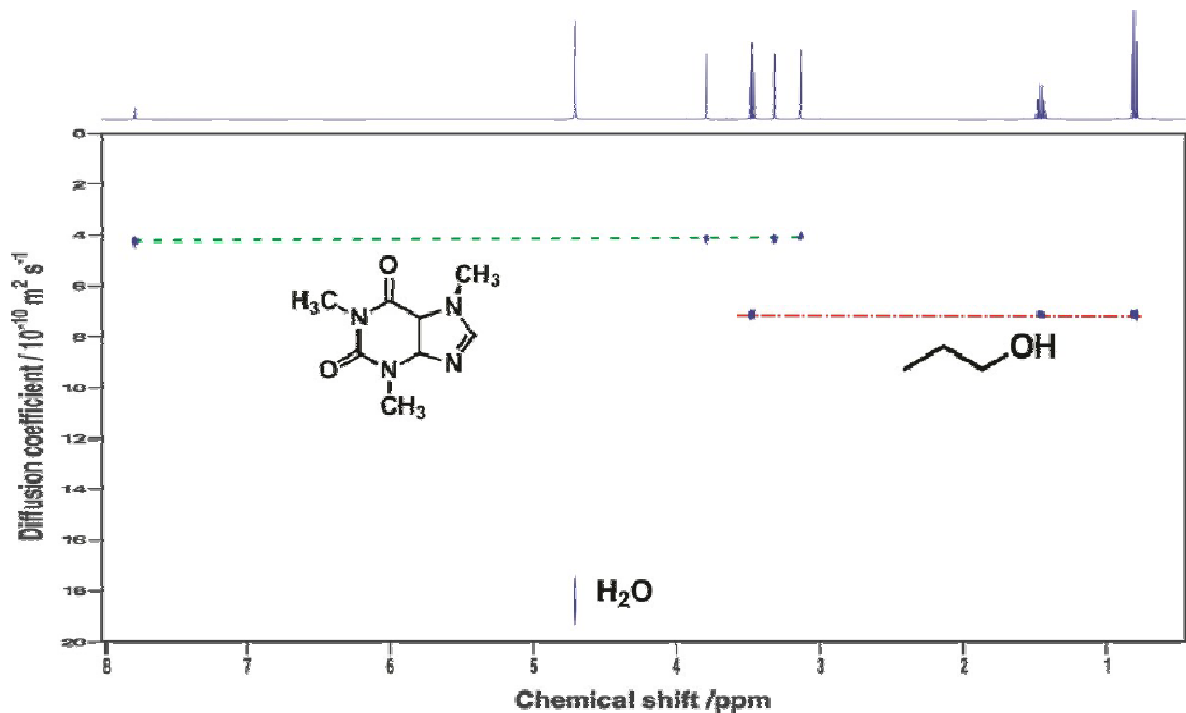


Figura 22. Espectro de DOSY para uma mistura de cafeína, n-propanol e água.

Um experimento DOSY pode medir a difusão de qualquer substância que tenha núcleos ativos em RMN, podendo ser aplicada para moléculas orgânicas ou inorgânicas e consegue distinguir através dos valores de difusão misturas

complexas. Porém apresenta algumas limitações tais como baixa sensibilidade devido a sobreposição de sinais de RMN de ^1H que podem diminuir a resolução da dimensão da difusão.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação da atividade antioxidante, leishmanicida e antiureolítica de tioidantoínas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudo cinético da atividade antioxidante *in vitro* frente ao radical DPPH•.

Avaliação da atividade antileishmanicida *in vitro* sob formas promastigota de *L. amazonensis*.

Avaliação da capacidade inibitória das tioidantoínas sintetizadas em testes *in vitro* envolvendo urease de *Canavalia ensiformis*.

Investigação das interações dos compostos que apresentarem potencial inibitório com a urease de *Canavalia ensiformis* utilizando técnicas de RMN.

3. METODOLOGIA

3.1 ESTUDO CINÉTICO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante dos compostos foi determinada por meio da capacidade sequestrante do radical livre DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazil) seguindo metodologia adaptada de KULISIC *et al.*, (2004).

Uma alíquota de 0,5 mL da solução dos compostos foi colocada em cubetas de ensaio contendo 1 mL de solução de tampão acetato de sódio 100 M (pH 5,5), 1,0 mL de metanol e 0,5 mL da solução metanólica do radical DPPH 250 µM.

Uma cubeta contendo 1,5 mL de metanol, 1,0 mL de tampão e 0,5 mL de DPPH 250 µM foi utilizado como controle. O branco das amostras foi determinado usando 1,5 mL de metanol e 1,0 mL de tampão. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

Os compostos foram avaliados em diferentes concentrações e o controle BHT utilizado na concentração final de 100 e 50 µM.

O decréscimo na absorbância em 517 nm foi determinado em espectrofotômetro (UV Cary 60, versão 2) em ciclos de 1 minuto por até 2 horas de reação para todas as amostras e padrão.

Os dados de absorbância foram obtidos através do software próprio do aparelho e expressados graficamente utilizando-se Microsoft Excel (2016), o desvio padrão médio também foi realizado pelo mesmo software.

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) foi determinada segundo a fórmula de MENSOR *et al.*, (2001).

$$\%AA = 100 - \left\{ \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}) \times 100}{\text{Abs controle}} \right\}$$

Todas as análises bem como o estudo cinético da capacidade de atividade antioxidante dos compostos foram realizadas nos Laboratórios de Química Orgânica e Físico-Química situado no campus da Universidade Tecnológica Federal do Paraná na cidade de Apucarana-PR sob supervisão da Prof.^a Dra. Lilian T. Dusman Tonin.

3.2 ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. amazonensis*

Foram utilizadas formas promastigotas de *L. Amazonensis* (MHOM/BR/1989/166MJO) mantidas em meio de cultura 199 (GIBCO Invitrogen®) suplementado com 10% de soro bovino fetal-SBF (GIBCO invitrogen®), 10 mM de tampão biológico Hepes (AMRESCO®), 1% urina humana, 1% L-glutamina (Synth®), penicilina com estreptomicina (10U/ml-10µg/mL, GIBCO Invitrogen®) e 10% bicabornato de sódio (Synth®). O cultivo celular foi realizado em estufa do tipo B.O.D. a 25°C, em frasco de cultura 25cm (SANTOS *et al.*, 2011).

As culturas das formas promastigota (1.10^4) de Leishmania foram inoculadas em placas de 24 poços (com meio 199, suplementado com 10% de soro bovino fetal) com diferentes concentrações do composto (05, 5,0 e 50 µM), e incubadas por setenta e duas horas a 25°C em estufa de CO₂ onde a densidade celular para cada concentração foi determinada através contagem microscópica em placas de Neubauer. Foram utilizados meio de cultura 199 como controle positivo, DMSO (dimetilsulfóxido) 1%, como controle de diluente dos compostos e Anfotericina B (1 µM) como controle negativo (SANTOS *et al.*, 2011).

Foram utilizados análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Bonferroni, para dados paramétricos, e teste de Mann-Whitney, dados não-paramétricos) para determinar as diferenças existentes entre os grupos experimentais. Estas análises foram realizadas pelo programa software estatístico (Graph-Pad Software, Inc., EUA, 500,288). As diferenças significativas foram aceitas pois $p < 0,05$.

As análises foram realizadas no laboratório de Protozoologia Experimental do Departamento de Ciências Patológicas no Centro de Ciências Biológicas (CCB), situado no Campus da Universidade Estadual de Londrina (UEL) com autorização dos docentes responsáveis Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli e Prof. Dra. Ivete Conchon Costa.

3.3 ESTUDO *IN VITRO* DE INIBIÇÃO DA UREASE *Canavalia ensiformis*

A identificação do potencial das tioidantoínas como inibidores da urease foi realizada seguindo o método indofenol (WEATHERBURN, 1967). Cada tioidantoína a uma concentração de 500 μM foi incubada em uma reação de meio tamponado com fosfato 20mM (pH 7,4) e suplementado com EDTA 1 mM, ureia 10 mM e 12,5 mU de *Canavalia ensiformis* Tipo III urease (Sigma).

As reações foram mantidas a 25°C durante 10 min, seguido pela adição de um volume de 0,5 de 1% m/v de fenol em 5 ppm de nitroprussiato de sódio (NPS) e um volume de 0,7 de 0,5% m/v de NaOH em 0,1% v/v de hipoclorito de sódio a interromper a atividade da enzima. As reações foram então incubadas a 50°C por 5 min antes da medição da absorvância a determinar a 630 nm para determinação da quantidade de amônio (NH_4^+) formado. A hidroxureia (HU) foi utilizada como referência de inibidor da urease. A inibição da urease foi determinada em termos de porcentagem de NH_4^+ formado em reações contendo tioidantoínas em relação ao total de atividade da urease em reações isentas de inibidor.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software ANOVA onde os valores representam a média \pm desvio padrão de quatro repetições de testes realizado em triplicata. Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Scott Knott ($P < 0,05$).

Todas as análises foram realizadas na Universidade Federal de Minas Gerais sob supervisão do Prof. Ângelo de Fátima (ICEx) e Profa. Luzia V. Modolo (IB).

3.4 AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES LIGANTE-ENZIMA DOS COMPOSTOS ATRAVÉS DE TÉCNICAS AVANÇADAS DE RMN

3.4.1 Preparação das Amostras

As amostras foram preparadas utilizando urease de *Canavalia ensiformis* (UCE) adquirida da Sigma-Aldrich®. Uma solução de estoque de UCE a 0,044 mM foi preparada em tampão PBS (fosfato de potássio 20,00 mM, a pH 7,4) em D_2O . Para ambos os ligantes **5n** e **6a**, foram preparadas soluções estoque de 20,00 mM

em MeOD- d_4 e a partir desta, soluções em diferentes concentrações, 4,00; 3,20; 2,40; 1,60 e 0,80 mM (diluída em tampão PBS) foram utilizadas nos experimentos.

3.4.2 Experimentos de STD e DOSY

Os espectros de RMN foram adquiridos em um espectrometro Bruker Avance Modelo III operando a 400,13 MHz para ^1H , utilizando uma sonda de 5 mm de detecção direta com z-gradientes a 25°C usando programação padrão de pulsos da Bruker, *stdiffesgp* para experimentos de STD e *ledpgp2* para experimentos de DOSY.

Parâmetros de aquisição e processamento espectral para os experimentos de STD foram realizados a partir da metodologia adaptada descrita por CABRITA *et al.* (2011), e para os experimentos de DOSY os parâmetros de aquisição foram mantidos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante dos compostos foi determinada por meio da capacidade sequestrante do radical livre DPPH (Figura 23).

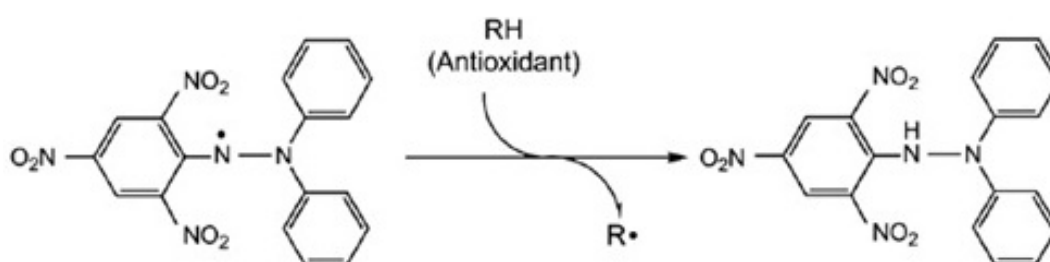


Figura 23. Reação entre a molécula de DPPH e um antioxidante para formar DPPH reduzido.

Esse radical orgânico estável é muitas vezes preferido na análise de sequestro de radicais livres em função da sua rapidez e simplicidade (KULISC *et al.*, 2004).

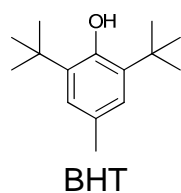
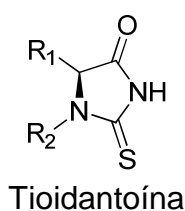
Esse método é baseado na redução de soluções alcoólicas de DPPH• em 517 nm na presença de um antioxidante doador de hidrogênio. YAMAGUCHI *et al.*, (1998) sugeriram que a lipofilicidade e hidrofiliicidade dos antioxidantes não afetam as reações com o DPPH, o que nos permite avaliar toda nossa classe de compostos sem maiores problemas.

Foi realizada a avaliação da atividade antioxidante das 22 tioidantoínas sintetizadas utilizando o método de sequestro de radicais livres DPPH, utilizando o BHT (2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol) como padrão para fins de comparação.

Na Tabela 8 estão expressos os valores da atividade antioxidante em IC₅₀ calculados graficamente em função de sua porcentagem de atividade antioxidante e a concentração utilizada.

Tabela 8. Valores de atividade antioxidante em IC₅₀ para os compostos avaliados.

| Tioidantoín a | R ₁ | R ₂ | MM (g/mol) | IC ₅₀ (mM) | IC ₅₀ (µg. mL ⁻¹) |
|------------------|---------------------------------------------------|--------------------|---------------|-----------------------|------------------------------------------|
| 5a | CH ₃ | H | 130,17 | 4,86 ± 0,07 | 632,16 ± 0,07 |
| 5b | NH ₂ COCH ₂ | H | 173,19 | 1,21 ± 0,03 | 210,01 ± 0,03 |
| 5d | PhCH ₂ | H | 206,26 | 1,43 ± 0,04 | 296,17 ± 0,04 |
| 5e | H | H | 116,14 | 1,88 ± 0,05 | 215,90 ± 0,05 |
| 5g | ImidazolCH ₂ | H | 196,23 | 0,83 ± 0,04 | 163,67 ± 0,04 |
| 5h | (Me) ₂ CHCH ₂ | H | 176,27 | 1,82 ± 0,07 | 313,03 ± 0,07 |
| 5i | MeS(CH ₂) ₂ | H | 176,27 | 1,83 ± 0,03 | 322,76 ± 0,03 |
| 5j | Pirrolidina | H | 156,00 | 3,52 ± 0,04 | 548,98 ± 0,04 |
| 5k | <i>p</i> -OH-PhCH ₂ | H | 222,26 | 1,92 ± 0,05 | 427,75 ± 0,05 |
| 5l | CH ₃ CH | H | 202,23 | 6,35 ± 0,02 | 1285,37 ± 0,02 |
| 5m | 3-indolCH ₂ | H | 245,30 | 5,24 ± 0,02 | 1617,50 ± 0,05 |
| 5n | (Me) ₂ CH | H | 152,23 | 2,32 ± 0,05 | 354,56 ± 0,07 |
| 6a | CH ₃ | CH ₃ CO | 172,20 | 23,40 ± 0,04 | 4030,53 ± 0,04 |
| 6b | NH ₂ COCH ₂ | CH ₃ CO | 215,23 | 1,02 ± 0,03 | 220,57 ± 0,03 |
| 6c | Guanidina(CH ₂) ₃ | CH ₃ CO | 257,32 | 4,84 ± 0,04 | 1246,77 ± 0,04 |
| 6d | PhCH ₂ | CH ₃ CO | 248,30 | 4,09 ± 0,05 | 1016,29 ± 0,05 |
| 6e | H | CH ₃ CO | 158,18 | 1,70 ± 0,07 | 268,86 ± 0,07 |
| 6f | NH ₂ CO(CH ₂) ₂ | CH ₃ CO | 229,26 | 3,64 ± 0,03 | 835,98 ± 0,03 |
| 6h | (Me) ₂ CHCH ₂ | CH ₃ CO | 214,28 | 5,89 ± 0,03 | 1262,15 ± 0,03 |
| 6i | MeS(CH ₂) ₂ | CH ₃ CO | 232,32 | 4,11 ± 0,05 | 956,18 ± 0,05 |
| 6m | 3-indolCH ₂ | CH ₃ CO | 287,34 | 5,87 ± 0,05 | 1687,95 ± 0,05 |
| 6n | (Me) ₂ CH | CH ₃ CO | 158,22 | 9,59 ± 0,03 | 1921,24 ± 0,03 |
| BHT | * | * | 220,35 | 0,45 ± 0,02 | 100,00 ± 0,02 |



De acordo com os dados na Tabela 9, os derivados testados demonstraram em geral, reduzir o radical DPPH. Os derivados **5a-n** apresentaram valores de IC₅₀ variando de 0,83 mM a 5,24 mM, com uma atividade de sequestro dos radicais livres moderada ou baixa, com exceção do derivado **5g** que apresentou IC₅₀ de 0,83 mM próximo ao padrão utilizado BHT com IC₅₀ de 0,45 mM.

Os derivados **6a-n**, substituídos com um grupo acetil na posição **N1** do anel tioidantoínico apresentaram valores de IC₅₀ variando entre 1,02 mM a 9,59 mM, com uma atividade de sequestro dos radicais livres baixa ou moderada.

Seis compostos, **5b**, **5d**, **5g**, **5h**, **6b** e **6e**, se demonstraram mais ativos dentre a série avaliada com IC₅₀ variando de 0,83 a 1,82 mM. É interessante

ressaltar que quatro destes derivados possuem cadeia lateral aromática (**5g** e **5d**) ou grupamentos amina (**5b** e **6b**) que podem contribuir para a estabilização do radical.

Para contribuir com a análise atividade antioxidante, um estudo cinético foi realizado com os derivados, utilizando diferentes concentrações dos compostos e acompanhamento por um período de até 120 minutos. Entretanto, existem substâncias antioxidantes que reagem de forma particular com o DPPH• implicando em uma cinética diferenciada. Podemos citar o BHT que é um dos compostos que reagem lentamente com o radical e por isso foi utilizado como padrão no estudo da análise cinética da atividade antioxidante (Figura 24).

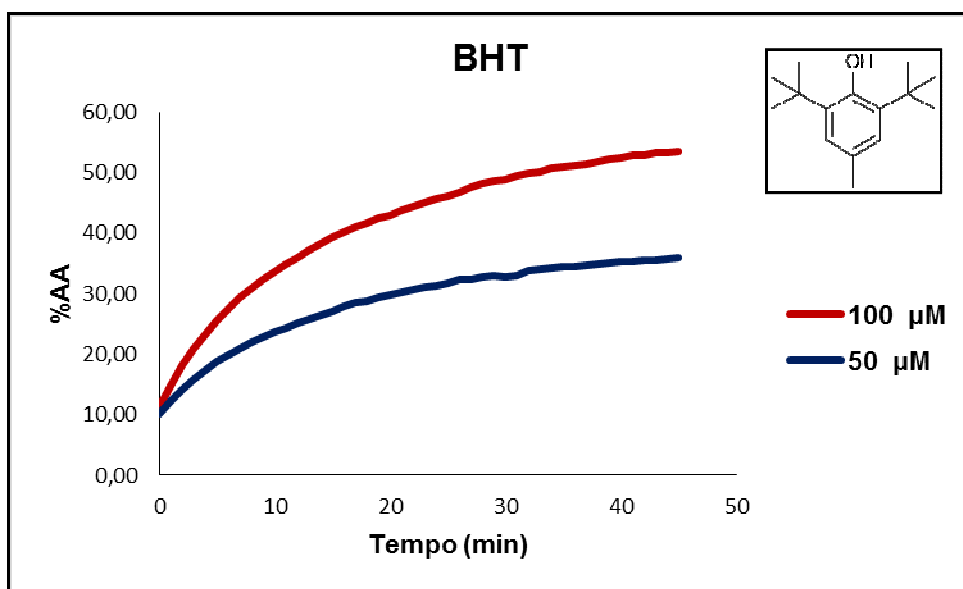


Figura 24. Cinética de reação para o padrão utilizado BHT nas concentrações de 100 e 50 µM no período de 45 min.

Estão representados graficamente nas Figuras 24 a 26, a cinética de reação de três dos seis derivados mais ativos da série.

O derivado **5e** apresentou cinética de reação lenta, pois no período de 75 min ainda possuía porcentagem de atividade antioxidante ligeiramente crescente em todas as concentrações avaliadas (Figura 25).

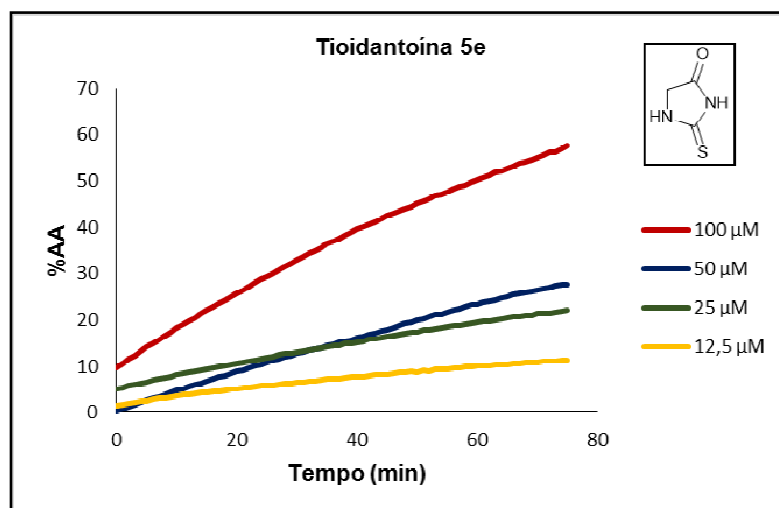


Figura 25. Cinética de reação para **5e** nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 μM no período de 75 min.

O derivado **5l** apresentou cinética de reação intermediária pois nos primeiros minutos de reação já atingiu sua porcentagem máxima de atividade antioxidante e se manteve constante durante o período de 60 minutos em todas as concentrações avaliadas (Figura 26).

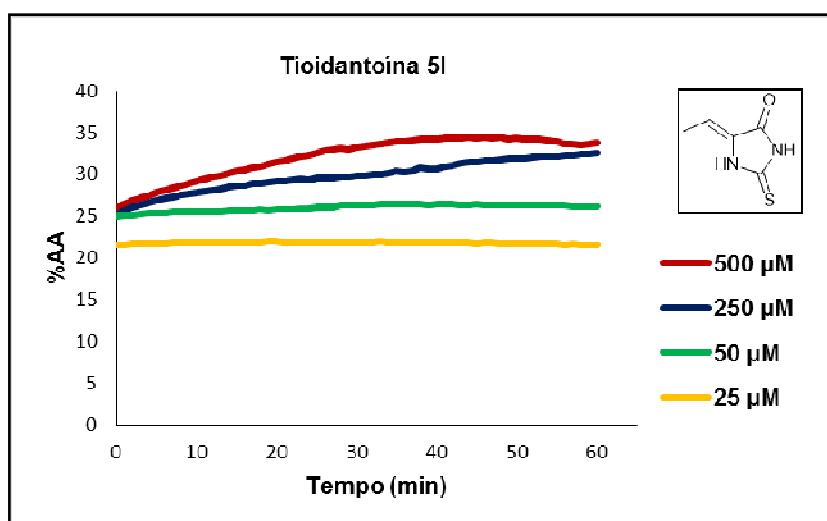


Figura 26. Cinética de reação para **5l** nas concentrações de 500, 250, 50 e 25 μM no período de 60 min.

O derivado **6e** apresentou cinética de reação rápida pois com 10 minutos de reação começou a apresentar valores constantes de atividade antioxidante e assim perdurou até o fim do período de 60 minutos avaliado (Figura 27).

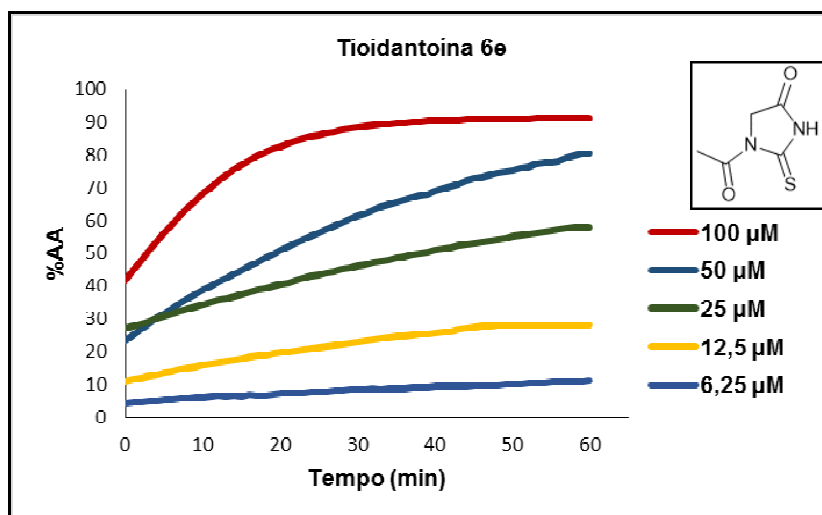


Figura 27. Cinética de reação para **6e** nas concentrações de 500, 250, 50 e 25 µM no período de 60 min.

É interessante ressaltar que dentre os compostos **5e** e **6e**, é notável que o produto acetilado em um tempo de aproximadamente 20 minutos começou a atingir valores de atividade antioxidante constantes e, em 60 minutos, já não apresentava mais variância assemelhando-se ao comportamento do padrão BHT utilizado. Nesse mesmo momento, o composto desacetilado com um tempo de aproximadamente 75 minutos, ainda apresentava comportamento crescente da atividade antioxidante. Cabe ressaltar que o composto **6e** possui um grupo acetila, onde o grupo metila disponível pode contribuir significativamente para a estabilização do radical DPPH.

Os compostos **5a**, **5d-e**, **5j-k**, **6a**, **6d**, **6f**, e **6h-i** apresentaram cinética de reação lenta comparado ao padrão BHT, ambos no período de 60 minutos ainda apresentavam % de atividade antioxidante crescente.

Os compostos **5l**, **5m** e **5n** apresentaram cinética de reação intermediária quando comparados ao padrão BHT, pois com 30 minutos de reação já começaram a apresentar valores de % de atividade antioxidante constante.

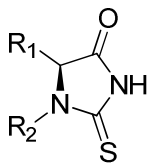
Já os compostos **5b**, **5g**, **5h-i**, **6b-c**, **6e**, e **6m-n** apresentaram cinética de reação rápida quando comparados ao padrão BHT, onde todos no período de 10 a 15 minutos começaram a atingir valores constantes de % de atividade antioxidante (para consultar todos os gráficos de cinética dos compostos separadamente, vide apêndice 04).

4.2 ATIVIDADE LEISHMANICIDA

Para a avaliação do efeito leishmanicida das tioidantoínas sobre formas promastigota de *L. amazonensis*, os derivados foram utilizados nas concentrações de 0,5, 5,0 e 50 μM durante o período de 24 e 48 horas.

Nas Tabelas 09 e 10 encontram-se os valores de inibição das formas promastigota de *L. amazonensis*.

Tabela 9. Valores de inibição frente às formas promastigota de *L. amazonensis* em 24 horas.

| | Entrada | Tioidantoína | R ₁ | R ₂ | Inibição promastigota (%) | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------|--------------|--------------------------------------|--------------------|---------------------------|-----------------|------------------|
| | | | | | 24h | | |
| | | | | | 0,5 μM | 5 μM | 50 μM |
|  | 1 | 5a | CH ₃ | H | 74,35 | 74,36 | 94,87* |
| | 2 | 5b | NH ₂ COCH ₂ | H | 43,59 | 78,20 | 97,43 |
| | 3 | 5d | PhCH ₂ | H | 61,54 | 62,82 | 56,41 |
| | 4 | 5e | H | H | 31,58 | 34,21 | 57,89 |
| | 5 | 5g | ImidazolCH ₂ | H | 53,85 | 58,97 | 58,97 |
| | 6 | 5h | (Me ₂ CHCH ₂) | H | 76,92 | 70,51 | 66,66 |
| | 7 | 5j | CH ₃ CH | H | 48,72 | 2,56 | 64,10 |
| | 8 | 5k | <i>p</i> -OH-PhCH ₂ | H | 79,48 | 79,49 | 94,87* |
| | 9 | 6e | (Me) ₂ CH | CH ₃ CO | 96,15 | 92,31 | 89,74* |
| | 10 | Anfotericina | - | - | 100 | 100 | 100 |

Diferença estatística entre o controle e composto analisado: * $p < 0.0001$.

Observou-se que para todas as concentrações utilizadas, os compostos apresentaram uma inibição de 2,56 a 97,43% na proliferação dos parasitos quando comparado ao controle não tratado, após 24 horas dos tratamentos.

Os derivados **5a-b**, **5e**, **5g** e **5k** apresentaram inibição crescente conforme o aumento da concentração demonstrando comportamento dose-dependente (entradas 1-2, 4, 5 e 8). Já para os derivados **5h** e **6e** observou-se a redução da porcentagem de inibição conforme o aumento da concentração demonstrando não ser dose-dependente (entrada 6 e 9). O derivado **5d** apresentou inibição crescente até a concentração de 5 μM e em 50 μM decaiu (entrada 3). O derivado **5j** apresentou comportamento incoerente pois em 0,5 μM sua inibição foi de 48,72%, em 5 μM houve um déficit para 2,56 %, e em 50 μM houve um aumento para 64,10

(Tabela, 9, entrada 7). Comportamento que não foi observado para **5j** em 48 horas (vide Tabela 10, entrada 7).

Tabela 10. Valores de inibição frente às formas promastigota de *L. amazonensis* em 48 horas.

| | Entrada | Tioidantoína | R ₁ | R ₂ | Inibição promastigota (%) 48 h | | |
|--|----------|--------------|--------------------------------------|--------------------|--------------------------------|----------|----------|
| | | | | | 0,5 µM | 5 µM | 50 µM |
| | | | | | | | |
| | 1 | 5a | CH ₃ | H | 84,61*** | 84,61*** | 94,87** |
| | 2 | 5b | NH ₂ COCH ₂ | H | 84,61** | 84,61** | 93,59** |
| | 3 | 5d | PhCH ₂ | H | 89,74** | 89,74** | 88,46** |
| | 4 | 5e | H | H | 55,25* | 39,47*** | 68,42 |
| | 5 | 5g | ImidazolCH ₂ | H | 79,48*** | 89,73** | 89,74** |
| | 6 | 5h | (Me ₂ CHCH ₂) | H | 84,61* | 78,20** | 91,02** |
| | 7 | 5j | Pirrolidina | H | 69,23*** | 69,23*** | 81,20*** |
| | 8 | 5k | <i>p</i> -OH-PhCH ₂ | H | 94,87** | 94,87** | 89,74** |
| | 9 | 6e | (Me) ₂ CH | CH ₃ CO | 100,0** | 93,59** | 97,43** |

Diferença estatística entre o controle e composto analisado: *p<0.0001, **p<0.0003 e ***p<0.0005.

Observou-se que para todas as concentrações utilizadas os tratamentos com os compostos em 48 horas foram capazes de inibir a proliferação de *L. amazonensis* em 39,47 a 100% em comparação ao controle (*p<0.0001, **p<0.0003 e e ***p<0.0005).

Os derivados **5a-b**, **5g** e **5j** apresentaram inibição crescente conforme o aumento da concentração demonstrando comportamento dose-dependente (entradas 1-2, 5 e 7). Já para os derivados **5d** e **5k** observou-se a redução da porcentagem de inibição conforme o aumento da concentração demonstrando não ser dose-dependente (entradas 5 e 8). O derivado **5e**, **5h** e **6e** apresentaram comportamento oscilante pois em 0,5 µM as inibições variaram de 55,25 a 100%, em 5 µM houve um decréscimo, e em 50 µM houve um aumento (entradas 4, 6 e 9). Os comportamentos de inibição também foram determinados graficamente, vide apêndice 05).

Todos os nove compostos avaliados demonstraram capacidade de inibir o crescimento das formas promastigota de *L. amazonensis*.

Cabe ressaltar que a acetilação do composto **5e** influenciou na atividade leishmanicida, o composto acetilado **6e** demonstrou maior potencial na inibição das formas promastigota (Tabela 09 e 10, entradas 4 e 9).

Derivados com cadeias laterais maiores, não demonstraram ter efeito superior aos com cadeias menores. Assim como cadeias laterais possuindo grupamentos aromáticos também mostraram comportamento semelhante às demais.

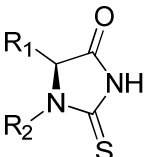
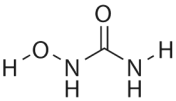
Este estudo preliminar direto sobre formas promastigota de *L. amazonensis* comprova o potencial das tioidantoínas como possíveis agentes antileishmania. Além disso, esses resultados preliminares nos instigam a possibilidade de investigar mecanismos de ação, viabilidade celular e atividade leishmanicida sobre formas amastigotas intracelulares.

4.3 ATIVIDADE INIBITÓRIA FRENTE À UREASE *C. Ensiformis*

Foi realizada uma triagem *in vitro* com dezessete tioidantoínas na presença da urease do tipo *Canavalia ensiformis* a fim de se investigar o potencial destes compostos como inibidores da atividade ureolítica dessa enzima. Hidroxiureia (**HU**) foi utilizada como referência de inibidor de urease para fins de comparação.

Dos dezessete compostos testados na concentração final de 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em reações contendo ureia a 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, dezesseis inibiram a atividade da urease em diferentes extensões (Tabela 11).

Tabela 11. Atividade inibitória das tioidantoínas sintetizadas frente à urease *C. ensiformis*

| | Tioidantoína | R ₁ | R ₂ | Inibição da urease (%) |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|---------------------------------------------------|--------------------|------------------------|
|  Tioidantoína | 5a | CH ₃ | H | 14,8 ± 18,8 b |
| | 5b | NH ₂ COCH ₂ | H | 25,90 ± 3,40 b |
| | 5d | PhCH ₂ | H | 22,8 ± 8,80 b |
| | 5e | H | H | 27,2 ± 1,90 b |
| | 5g | ImidazolCH ₂ | H | 30,2 ± 6,40 b |
| | 5h | (Me) ₂ CHCH ₂ | H | 27,4 ± 11,6 b |
| | 5i | MeS(CH ₂) ₂ | H | 42,5 ± 16,5 a |
| | 5j | Pirrolidina | H | 19,1 ± 5,90 b |
| | 5k | <i>p</i> -OH-PhCH ₂ | H | 27,2 ± 14,6 b |
| | 5l | CH ₃ CH | H | 48,4 ± 14,3 a |
|  Hidroxiureia | 5m | 3-indolCH ₂ | H | 36,4 ± 23,1 a |
| | 5n | (Me) ₂ CH | H | 55,2 ± 5,20 a |
| | 6a | CH ₃ | CH ₃ CO | 3,60 ± 2,00 b |
| | 6b | NH ₂ COCH ₂ | CH ₃ CO | 0 |
| | 6c | Guanidina(CH ₂) ₃ | CH ₃ CO | 7,40 ± 12,6 b |
| | 6e | H | CH ₃ CO | 13,0 ± 3,70 b |
| | 6f | NH ₂ CO(CH ₂) ₂ | CH ₃ CO | 13,1 ± 15,9 b |
| | HU | - | - | 39,1 ± 9,10 a |

^{a,b} Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Scott Knott ($P < 0,05$).

Letras *a* indicam a semelhança dos compostos testados com o padrão utilizado hidroxiureia, observados para os derivados **5i**, e **5l-n**. O padrão hidróxiureia foi utilizado nesta análise *in vitro* uma vez que o padrão NBPT é utilizado apenas em análises em solo.

Os compostos **5i**, **5l**, **5m** e **5n** foram os mais ativos apresentando porcentagens de inibição da enzima próximas ou superiores a 39% que é o valor obtido para a **HU**, cabe ressaltar que o composto **5l** é o derivado da treonina que foi o produto obtido por eliminação. Dois dos compostos avaliados, **6c** e **6a**, apresentaram resultados de inibição não satisfatórios e inferiores a 10% (Figura 28).

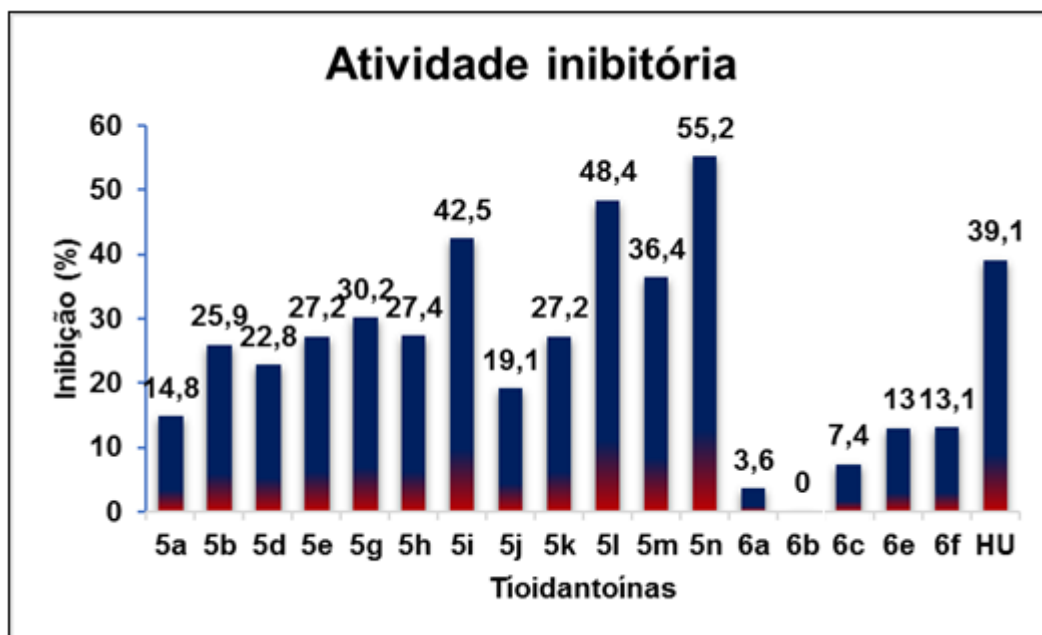


Figura 28. Efeito inibitório de tioidantoínas frente à urease *C. ensiformis*. HU (hidroxiureia, como padrão).

É interessante ressaltar que a acetilação dos compostos influenciou significativamente os resultados de inibição. Comparando-se os compostos **5a** e **6a**, **5e** e **6e** observou-se uma redução de aproximadamente 24% e 48% respectivamente, da inibição da atividade da urease quando se inseriu o grupo acetil na estrutura da molécula. Além de que os compostos acetilados **6b** e **6f** ou apresentaram resultado de inibição inferior a 14% no caso de **6f**, ou nenhuma inibição da atividade da urease (**6b**).

Compostos contendo de cadeias laterais alifáticas ou aromáticas não parecem apresentar diferenças quanto a porcentagem de inibição da atividade da urease uma vez que todos os compostos testados obtiveram resultados de inibição ente 13 e 30%, com exceção dos quatro compostos mais ativos e quatro menos ativos já anteriormente citados.

4.4 AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES LIGANTE-PROTEÍNA DOS COMPOSTOS ATRAVÉS DE TÉCNICAS DE RMN

4.4.1 Saturation Transfer Difference (STD)

Com intuito de verificar a potenciabilidade do método para a avaliação da interação entre tioidantóinas e a urease, realizamos o experimento de STD com o ligante mais ativo, **5n** (inibição de 55,2%) com uma razão de concentração ligante-enzima, L/E= 100. O experimento de STD foi realizado conforme metodologia adaptada, descrita por CABRITA *et al* (2011).

O espectro de STD obtido para a mistura de urease *Canavalia ensiformis* (**UCE**) e o ligante **5n**, bem como o espectro de referência para a mistura em estudo são mostrados na Figura 29 (razão L/E=100) .

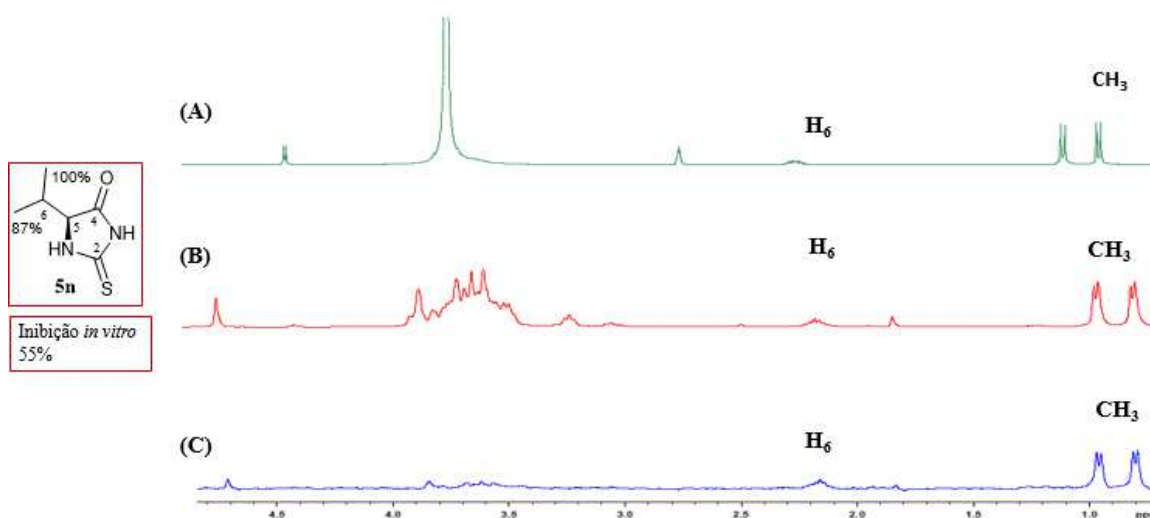


Figura 29. STD-RMN de **5n** com **UCE**, L/E = 100: **(A)** Espectro de STD utilizado como referência de **5n** com **UCE**; **(B)** Espectro de STD da solução de **5n** (4 mM) com **UCE** (0,04 mM).

A interpretação deste experimento é direta; no espectro STD, os dupletos intensos em δ 0,95 e 0,80 ppm (espectro **B**) referentes as duas metilas diastereotópicas são facilmente observáveis, o que indica que este é um ligante ativo que interage com a enzima.

O efeito STD pôde ser melhor analisado pelo cálculo do mapa de epítomos que nos informa sobre a porcentagem do efeito STD levando em consideração os fatores de amplificação (A_{STD}), uma vez que os sinais provenientes dos grupos

metila do ligante se mostraram bem definidos. A porcentagem do efeito STD é obtida multiplicando-se a razão do fator de amplificação relativo de um determinado próton pela intensidade inicial deste mesmo próton no espectro de RMN de ^1H adquirido inicialmente (I_{STD}/I_0) pela razão da concentração molar referente ao ligante [L] em excesso em relação à enzima [E]:

$$A_{\text{STD}} = \left(\frac{I_{\text{STD}}}{I_0} \right) \times \left(\frac{[\text{L}]}{[\text{E}]} \right)$$

O cálculo para este próton pré-definido é utilizado como referência de 100% para comparação com os demais. Para o composto **5n**, o sinal proveniente da metila na região de δ 0,95 ppm obteve o efeito STD de 87,81%, comparado ao sinal da metila utilizada como referência 100% na região de δ 0,80 ppm.

É interessante ressaltar que os hidrogênios metílicos presentes no **C7** e **C8** são diasterotópicos. Assim seus deslocamentos químicos no espectro demonstraram-se diferentes.

4.4.2 Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY)

O estudo da difusão molecular em soluções fornece diversas propriedades físicas moleculares tais como informações sobre agregação ou complexação de componentes de uma mistura. Os experimentos de DOSY nos dão a informação da difusão das moléculas em soluções, isto nos fornece dados quantitativos, onde se pode observar, por exemplo, que uma vez que tenhamos um ligante em seu estado livre, mais rápido será o seu deslocamento em solução e, por consequência, maior será sua difusão.

A fim de se estudar este comportamento de difusão dos derivados, experimentos foram realizados na presença e na ausência de **UCE**.

As Figuras 30 e 31 representam os espectros 2D de DOSY do composto **5n** na presença e ausência da solução de urease UCE, respectivamente.

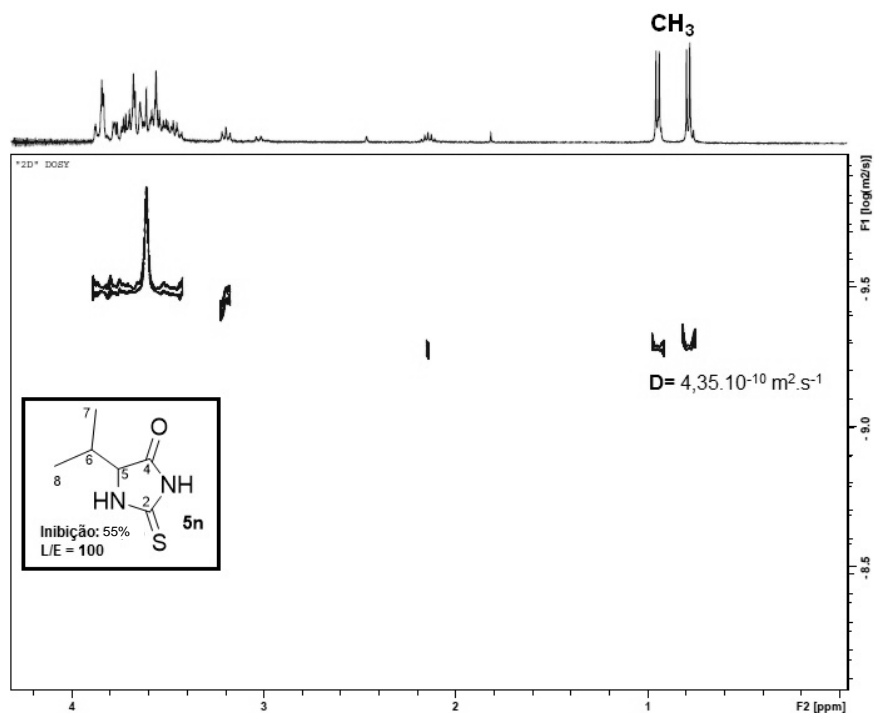


Figura 30. Espectro 2D de DOSY do composto **5n** (4,0 mM) com UCE (44,44 μM), L/E= 100 onde D = difusão média.

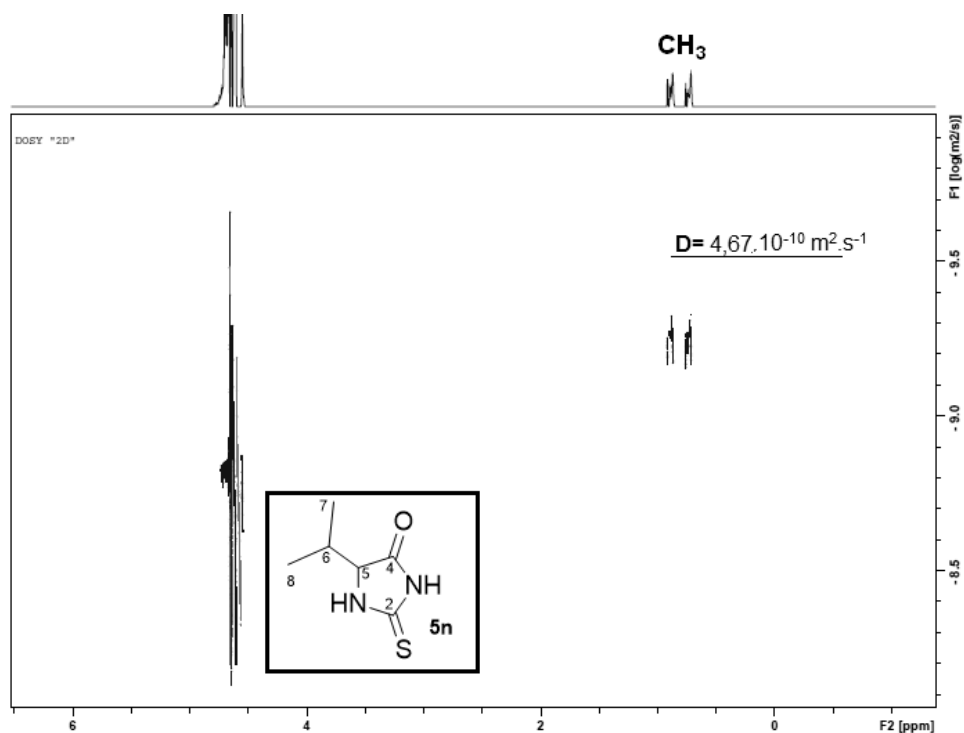


Figura 31. Espectro Pseudo-2D de DOSY do composto **5n** (20,00 mM) onde D = difusão média.

É possível verificar que o composto **5n** em presença de UCE (razão L/E= 100) demonstrou coeficiente de difusão menor ($4,35 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), quando comparado à ausência de solução de **UCE** ($4,67 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), sendo este comportamento esperado para um sistema ligante/receptor em equilíbrio dinâmico. A difusão dos compostos foram avaliadas também em função da razão de concentração molar ligante-enzima, conforme representado graficamente na Figura 32. Podemos observar que conforme a diminuição da concentração do ligante, o coeficiente de difusão apresentou comportamento decrescente, pois a proporção do ligante complexado aumentava (para demais espectros DOSY de **5n** em suas diferentes razões L/E, vide Apêndices 04).

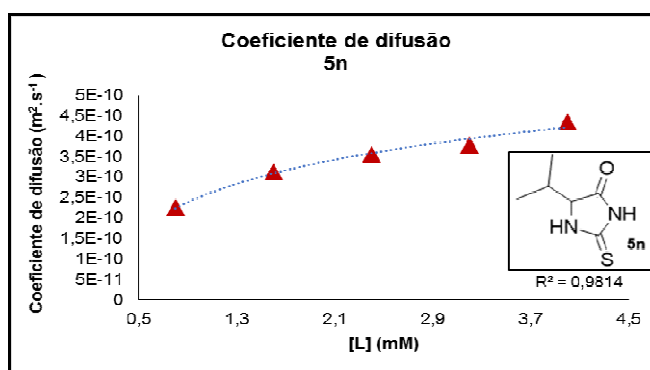


Figura 32. Coeficiente de difusão ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) de **5n** em função da concentração do ligante [L] (mM).

Este comportamento também foi observado para o composto **6a** (Figura 33 e 34). É possível verificar que o composto **6a** em presença de UCE (razão L/E= 100) demonstrou coeficiente de difusão menor ($3,70 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) para os sinais das metilas avaliados, quando comparado à ausência de solução de **UCE** ($4,07 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$).

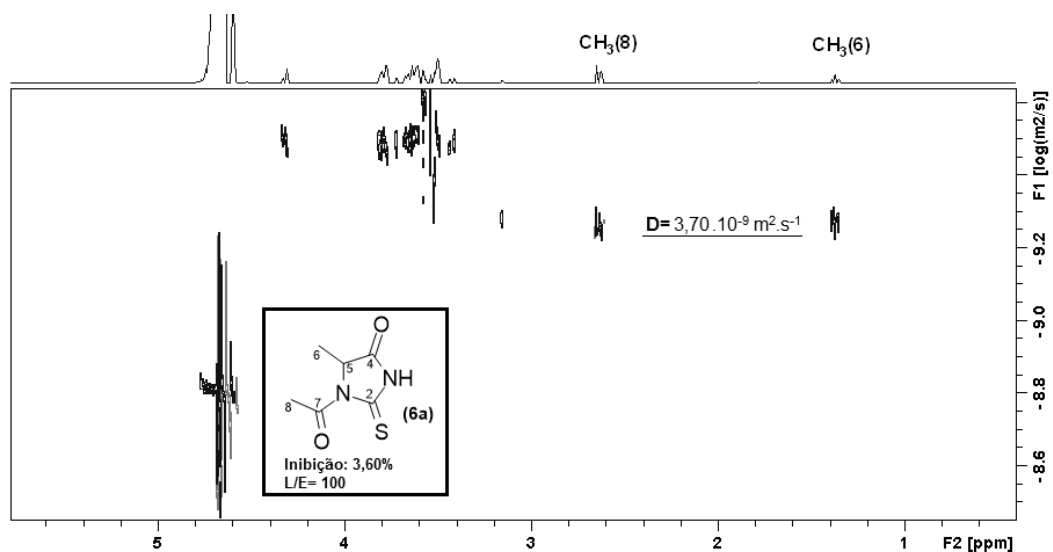


Figura 33. Espectro Pseudo-2D de DOSY do composto **6a** (4,0 mM) com **UCE** (44,44 μ M), L/E= 100, onde D= difusão média.

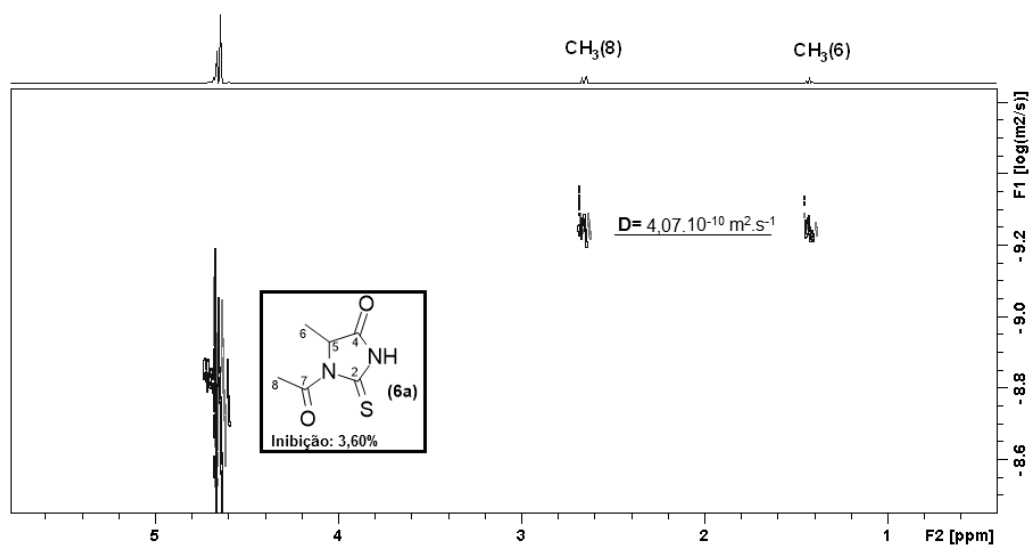


Figura 34. Espectro Pseudo-2D de DOSY do composto **6a** (20,00 mM), onde D= difusão média.

A difusão dos derivados foram avaliadas também em função da razão de concentração molar ligante-enzima, conforme representado graficamente na Figura 35.

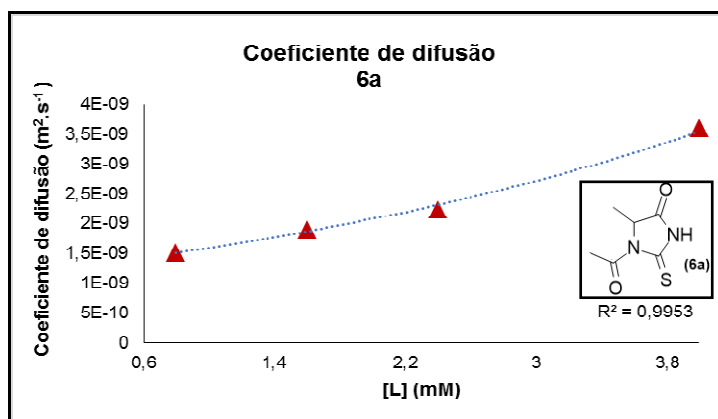


Figura 35. Coeficiente de difusão ($m^2 \cdot s^{-1}$) de **6a** em função da concentração do ligante [L] (mM).

Podemos observar que conforme o aumento da concentração do ligante o coeficiente de difusão também aumentou pois a proporção do ligante em seu estado livre é maior (para consultar demais espectros STD de **6a** em suas diferentes razões L/E, consultar Apêndice 03).

O uso das técnicas de RMN STD e DOSY forneceu dados qualitativos preliminares da interação entre os inibidores testados e a urease de *C. ensiformis*, demonstrando que o regime de troca química para o equilíbrio entre os ligantes testados e a urease se encontram dentro da faixa de tempo analítica tanto do STD como do DOSY.

Estes resultados sugerem, portanto, que ambas as técnicas podem ser exploradas para a obtenção de parâmetros cinéticos para este sistema, tal como a constante de dissociação (K_D) para ser confrontados com os dados cinéticos provenientes de ensaios bioquímicos.

5. CONCLUSÃO

O estudo da atividade antioxidante demonstrou o potencial das tioidantoínas derivadas de aminoácidos como inibidores de radicais livres, que apresentaram cinética e níveis de inibição semelhantes ao padrão BHT, onde o derivado da histidina (**5g**), se destacou como o composto mais ativo. Os resultados não mostraram uma relação clara entre as estruturas da série de tioidantoínas acetiladas e as tioidantoínas desacetiladas e seus respectivos níveis de atividade antioxidante.

A avaliação da atividade *in vitro* das tioidantoínas sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* comprovou o seu potencial como agentes leishmanicidas demonstrando porcentagens de inibição de até 100% após 48 horas de tratamento, semelhante ao padrão Anfotericina B. Juntamente com o seu potencial antioxidante, as tioidantoínas podem ser consideradas uma classe promissora para o desenvolvimento de novos agentes para o tratamento da leishmaniose.

O estudo de inibição da urease de *C. ensiformis in vitro*, mostrou que 4 tioidantoínas testadas apresentam um alto valor de inibição, possuindo, portanto, grande potencial para aplicação em uso como fertilizantes na agricultura.

O uso das técnicas de RMN STD e DOSY forneceu dados qualitativos preliminares da interação entre os inibidores testados e a urease de *C. ensiformis*, demonstrando que o regime de troca química para o equilíbrio entre os ligantes testados e a urease se encontram dentro da faixa de tempo analítica tanto do STD como do DOSY. Assim o STD e DOSY apresentam potencial para se mostrarem como ferramentas auxiliares ou eventualmente como alternativas aos métodos convencionais de determinação de parâmetros cinéticos tais como a constante de dissociação (K_D).

REFERÊNCIAS

AHMED, M. SH.; MOUSSA, Z. Synthesis, characterization and derivatization of some novel types of mono- and bis-imidazolidineiminothiones and imidazolidineiminodithiones with antitumor, antiviral, antibacterial and antifungal activities – part I. **Eur. J. Med. Chem.** v. 44, p. 4315-4334, 2009.

ARSLAN, H.; DURAN, N; BOREKCI, G.; OZER, C. K.; AKBAY, C. Antimicrobial activity of some thiourea derivatives and their nickel and copper complexes. **Molecules.** v. 14, p. 519, 2009.

ASLAM, M. A. S.; MAHMOOD, S-UL.; SHAHID, M.; SAEED, A.; IQBAL, J. Synthesis, biological assay *in vitro* and molecular docking studies of new Schiff base derivatives as potential urease inhibitors. **Eur. J. Med. Chem.** v. 46, p. 5473, 2011.

BENINI, S.; RYPNIEWSKI, W.R.; WILSON, K.S.; MILETTI, S.; CIURLI, S.; MANGANI, S. A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels. **Structure.** v. 7, n. 2, p. 205, 1999.

BERG, H. C. Random Walks in Biology. Princeton University Press, Nova Jersey, 1523 pg, 1983.

BRITO, T. O.; SOUZA, A. X.; MOTA, Y. C. C.; MORAIS, V. S. S.; SOUZA, L. T.; FÁTIMA, A.; MACEDO Jr., F. C.; MODOLO, L. V. Design, syntheses and evaluation of benzoylthioureas as urease inhibitors of agricultural interest. **RSC Advances.** v. 5, p. 44507, 2015.

BROWN, R. The miscellaneous botanical works of Robert Brown: Volume 1. (Editado por John J. Bennett). Ed. R. Hardwicke, Londres, 1866.

CABRITA, E. J.; VIEGAS, A.; MANSO, J.; NOBREGA, F. L. Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A simple and fast method for ligand screening and characterization of protein binding. **J. Chem. Education.** v. 88, p. 990, 2011.

CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P.C.O.; CONTIN, T.L.M.; DIAS, F.L.F.; ROSSETO, R.; MARCELINO, R.; COIMBRA, R.B.; QUAGGIO, J.A. Ammonia volatilisation from urease inhibitor-treated urea applied to sugarcane trash blanket. **Scientia Agricola**. v. 65, n. 4, p. 397, 2008.

ELOKDAH, H.; SULKOWSKI, T. S.; ABOU-GHARBIA, M.; BUTERA, J. A.; CHAI, S.-Y.; MCFARLANE, J. R.; MCKEAN, M.-L.; BABIAK, J. L.; ADELMAN, S. J.; QUINET, E.M. Design, synthesis, and biological evaluation of thio-containing compounds with sérum HDL-cholesterol-elevating properties. **J. Med. Chem.** v. 47, p. 681-695, 2004.

FAURÉ, M.; LESSI, E.; TORRES, R.; VIDELA, C. A.; Antioxidant Activities of Lignans and Flavonoids. **Phytochemistry**, v. 29, p. 3773, 1984.

FONT, M.; DOMÍNGUES, M.J.; SANMARTÍN, C.; PALOP, J.A.; SAN-FRANSCISCO, S.; URRUTIA, O.; HOUDUSSE, F.; GARCÍA-MINA, J.M. Structural Characteristics of Phosphoramidate Derivatives as Urease Inhibitors. Requirements for Activity. **J. Agric. Food Chem.** v. 56, p. 8451, 2008.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. DOENÇA DE CHAGAS. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/leishmaniose>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

GIOACCHINI, P.; NASTRI, A.; MARZADORI, C.; GIOVANNINI, C.; ANTISARI, L.V. Influence of urease and nitrification inhibitors on N losses from soils fertilized with urea. **Bio. and Fert. of Soils**. v. 36, p. 129, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E.; Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 119, p. 598, 1992.

HAHN, E. L. Spin echoes. **Physical Review**. v. 80 (4), p. 580-594, 1950.

HENDRIKSON, L. L.; DOUGLASS, E. A. Metabolism of the urease inhibitor N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (NBPT) in soils. **Soil Bio. and Biochem.** v. 25, p. 1613, 1993.

HO, C. T.; FERRARO, T.; CHEN, Q.; HOSEN, R. T.; HUANG, M. T. Phytochemicals in Teas and Rosemary and their Cancer-Preventive Properties. in: Food Phytochemicals for Cancer Prevention II. **Em Food Phytochemicals for Cancer Prevention II**; HO, C. T.; OSAWA, T.; HUANG, M. T.; HOSEN, R. T., eds.; American Chemical Society: Washington DC, p. 4, 1994.

JUNEJO, N.; KHANIF, M. Y.; HANFI, M. M.; YUNUS, W. M. Z. W.; DHAREJO, K. A.; Role of inhibitors and biodegradable material in mitigation of nitrogen losses from fertilized lands. **Afri. J. of Biotec.** v. 10, n. 18, p. 3504, 2011.

KOGEN, H.; TAGO, K.; ARAI, M.; MINAMI, E.; MASUDA, K.; AKIYAMA, T. A highly stereoselective synthesis of plaunotol and its thiourea derivatives as potent antibacterial agents against *Helicobacter pylori*. **Bioor. Med. Chem. Lett.** v. 9, p. 1347, 1999.

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v.85, p. 633-640, 2004.

MENEGATTI, R.; MANSSOUR, C. A.; BARREIRO, E. J. A importância da síntese de fármacos. **Cadernos temáticos de Química Nova na Escola.** v. 3, p.16-22, 2011.

MENSOR L.L.; MENEZES F.S.; LEITÃO G.G.; REIS A.S.; DOS SANTOS T.C.; COUBE C.S.; LEITÃO S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother Res.** v. 15, p. 127, 2001.

MORRIS, K. F.; JOHNSON, C. S. Diffusion-ordered two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. **J. Am. Chem. Soc.** v. 114(8), p- 3139-3141, 1992.

NEDJARKOLLI, B.; AICHOUCHE, S.; BOUZROURA.; SALHI, L.; BELKEBIR, A.; AIT-YAHIA, O.; BOUDJLIDA, A.; BOUGUERRA, S. Antioxidant and anti tumoral activities of hydrazylpyrrolidine 2, 5 dione substituted and 2-thioxo imidazolidine 4-one. **Int. J. Pharm. Chem. Biol. Sci.** v. 4(3), p. 447, 2014.

PENG, X., WU, Y., FAN, J., TIAN, M. & HAN, K. "Colorimetric and Ratiometric Fluorescence Sensing of Fluoride: Tuning Selectivity in Proton Transfer. **J. Org. Chem.** v.70, p. 10524, 2004.

PETERS & MEYER, B. NMR techniques for screening and identifying ligand binding to receptor proteins. **Angew. Chemie Int.** v.42, p. 864, 2003.

PIETTA, P.; Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p.1035, 2000.

PORWAL, S.; CHAUHAN, S. S.; CHAUHAN, P. M. S.; SHAKYA, N.; VERMA, A.; GUPTA, S. Discovery of Novel Antileishmanial Agents in an Attempt to Synthesize Pentamidine-Apysinopsin Hybrid Molecule. **J. Med. Chem.** v. 52, p. 5793, 2009.

ROMINE, J.L.; MARTIN, S.W.; SNYDER, L.B.; SERRANO-WU, M.; DESHPANDE, M.; WHITEHOUSE, D.; LEMM, J.; O'BOYLE, D.R.; GAO, M.; COLONNO, R. Iminothiazolidinones as inhibitors of HCV replication. **World Patent Application WO-2004/014852**, 19 de fevereiro de 2004.

SALINAS, S. R.A. Einstein e a teoria do movimento browniano. **Rev. Bras. Ens. Fís.** v. 27 (2), p. 263-269, 2006.

SANTOS, A. O.; NAKAMURA, T. N.; FILHO, B. P. D.; JUNIOR, V. F. V.; NAKAMURA, C. V. Copaiba Oil: An Alternative to Development of New Drugs against Leishmaniasis. **Hindawi Publishing Corporation**, p. 1, 2011.

SOUZA, A. A. Aplicação da espectroscopia de ressonância magnética nuclear para estudos de difusão molecular em líquidos: A técnica DOSY. **Química Nova.** v. 25 (6), p. 1022-1026, 2002.

SUMNER, J.B. The Isolation and Crystallization of the Enzyme Urease. **J. Biol. Chem.** v. 69, p. 435, 1926.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert Opin Pharmacother.** v.16, p. 1, 2014.

VAREL, V.H. Use of urease inhibitors to control nitrogen loss from livestock waste. **Bioresource Technology.** v. 62, p. 11, 1997.

WEATHERBURN, M.W. Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia. **Analytical Chemistry.** v. 39, p. 971, 1967.

WU, F.; JIANG, H.; ZHENG, B.; KOGISO, M.; YAO, Y.; ZHOU, C.; LI, X.-N.; SONG, Y. Inhibition of câncer-associated mutante isocitrate dehydrogenases by 2-thiohydantoin compounds. **J. Med. Chem.** v. 58, p. 6899-6908, 2015.

YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S. Uso de inibidor da urease para aumentar a eficiência da ureia. **Informações Agronômicas.** v. 117, p. 1, 2007.

YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAOKA, J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Biosci Biotechnol Biochem.** v. 61(6), p. 1201, 1998.

YONOVA P.; GATEVA S.; MINCHEVA N.; JOVCHEV G.; STERGIOUS M.; KAPCHINATOTEVA, V. Improvement of tolerance to paraquat in barley (*hordeum vulgare* L.) By a synthetic thiourea compound: effects on growth and biochemical responses, acad. **M. Popov inst. Plant physiol., Bulgarian Acad. Sci.** v. 35(3-4), p. 162, 2009.

APÊNDICES

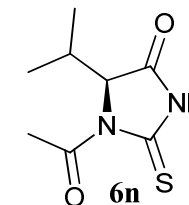
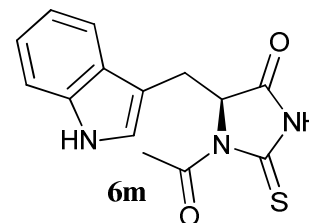
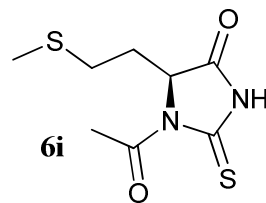
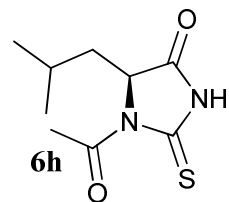
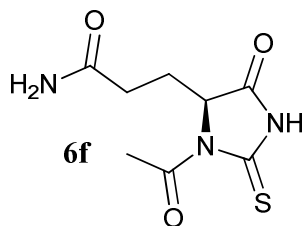
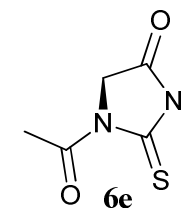
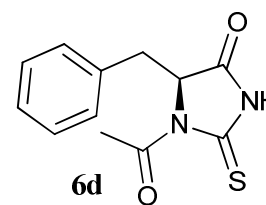
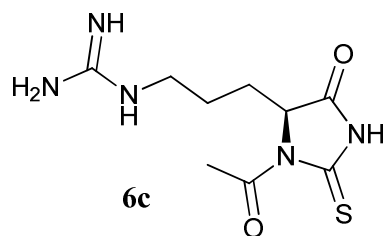
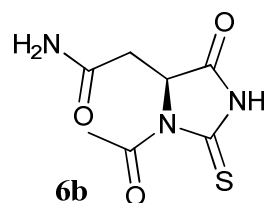
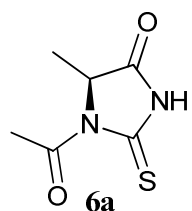
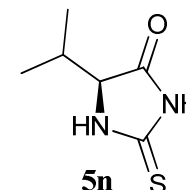
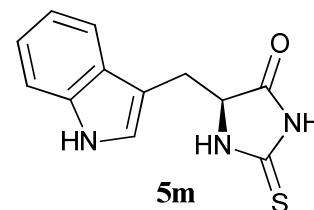
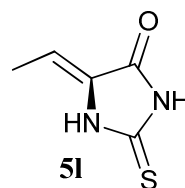
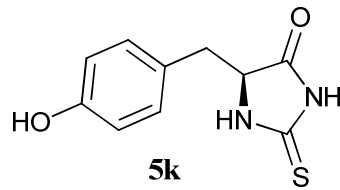
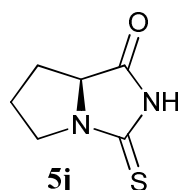
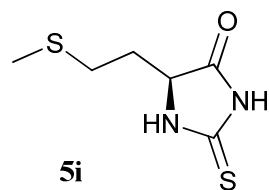
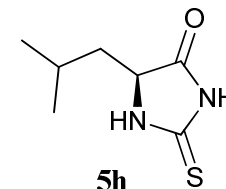
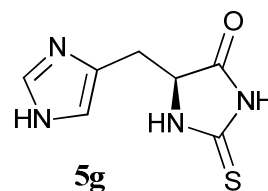
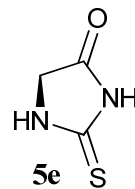
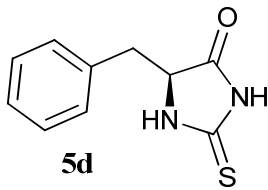
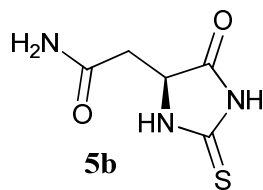
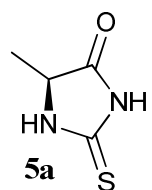
Síntese de tioidantoínas, estudo de suas atividades biológicas e interações com proteínas por RMN

Priscila Goes Camargo de Carvalho

1. Estrutura das tioidantoínas
2. Cópias dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C
3. Cópias dos espectros de STD e DOSY e gráficos
4. Cópias dos gráficos de cinética antioxidante
5. Cópias dos gráficos de atividade leishmanicida

APÊNDICE 1

Estrutura das tioidantoinas



APÊNDICE 2

Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos.

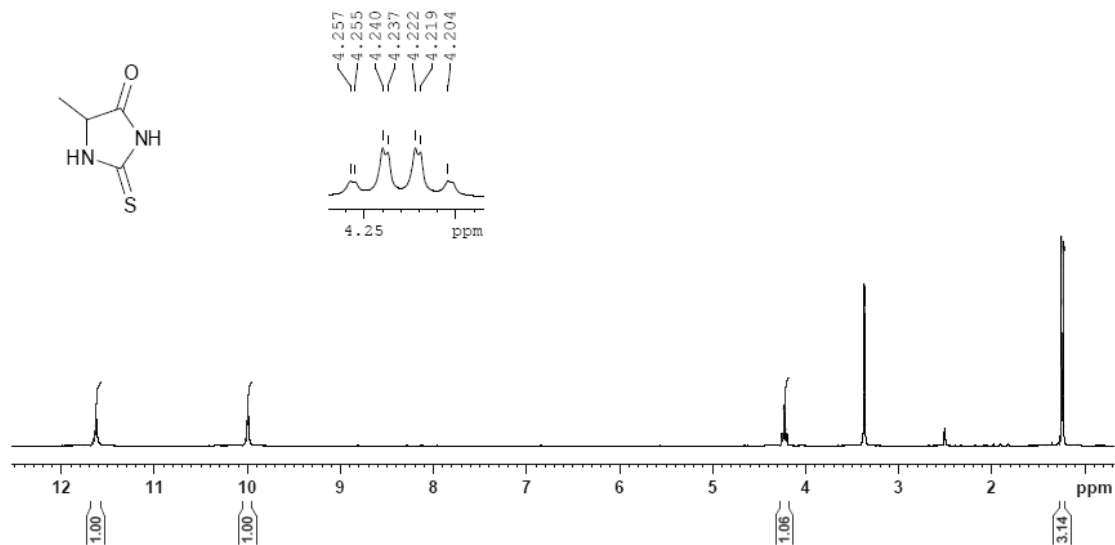


Figura 36. Espectro de RMN de ^1H de 5a (400,13 MHz) em DMSO- d_6 .

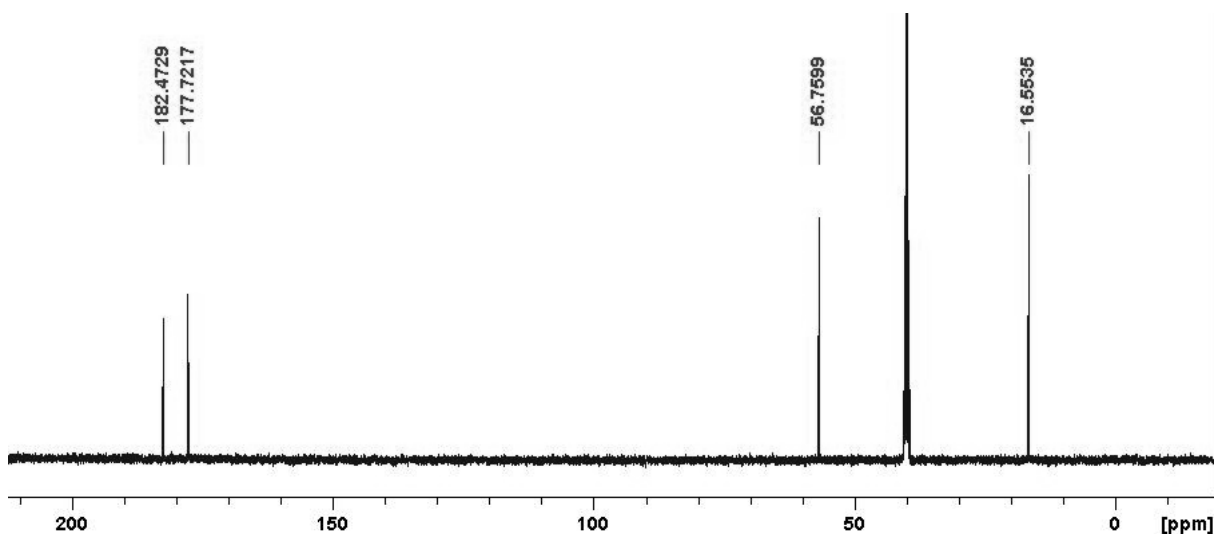


Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C de 5a (100,61 MHz) em DMSO- d_6 .

5-metil-2-tioxoimidazolidin-4-ona (5a). Rendimento 72,64 mg (92%); sólido branco; pf 158–160°C; RMN de ^1H (400,13 MHz, DMSO- d_6) δ 1,24 (d, J = 7,16 Hz, 3H), 4,22 (dd, J = 0,86-6,97 Hz, 1H), 9,99 (s, 1H), 11,62 (s, 1H); RMN de ^{13}C (100,61 MHz, DMSO- d_6) δ 16,55 (CH₃), 56,76 (CH), 177,72 (C=O), 182,47 (C=S).

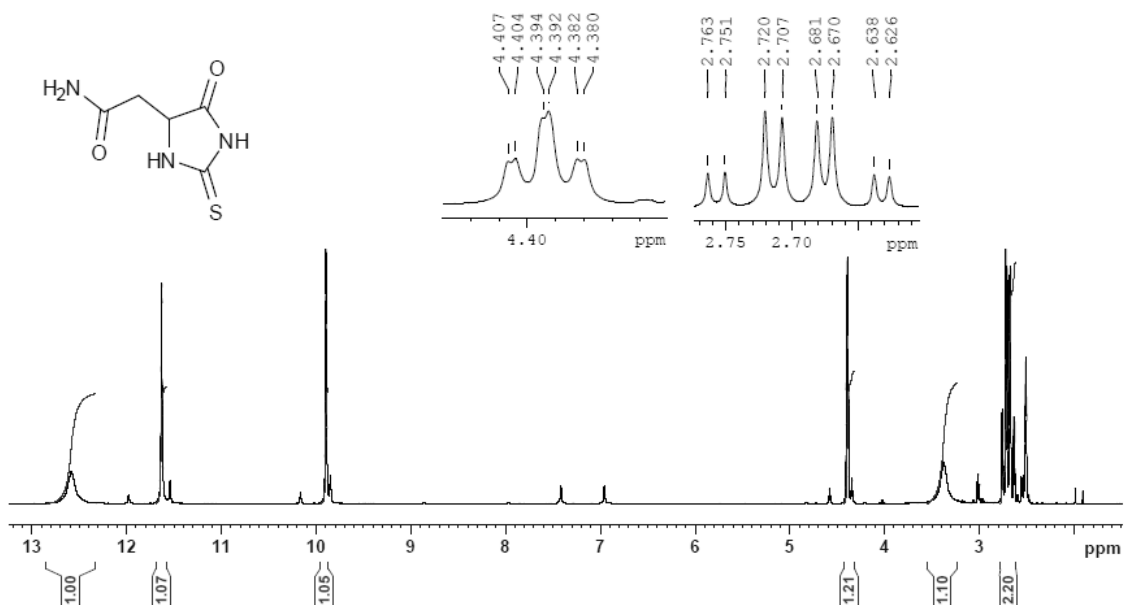


Figura 38. Espectro de RMN de ¹H 5b (400,13 MHz) em DMSO-*d*₆.

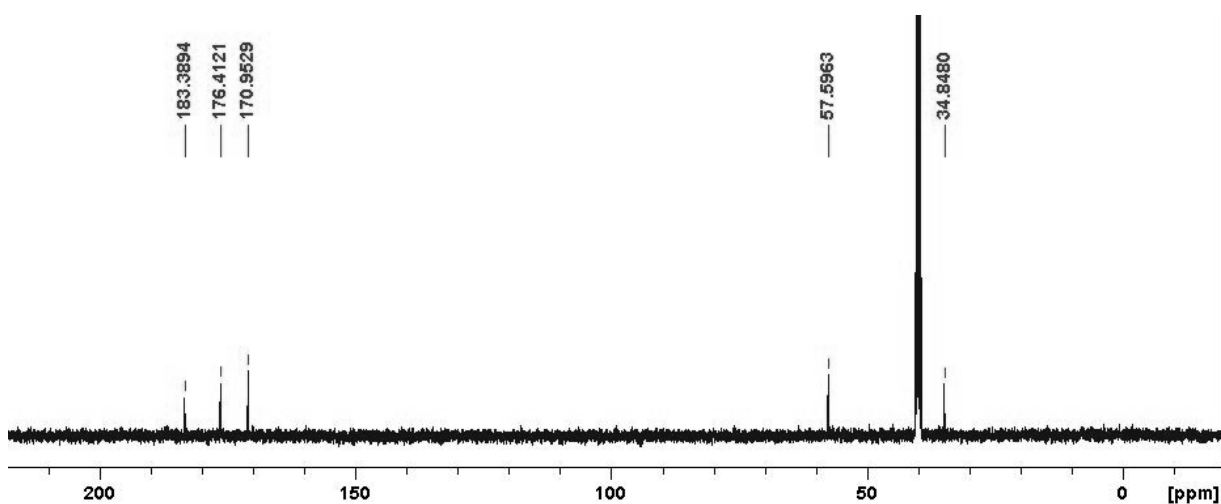


Figura 39. Espectro de RMN de ¹³C de 5b (100,61 MHz) em DMSO-*d*₆.

2-(5-oxo-2-tioximidazolidin-4-il)acetamida (5b). Rendimento 25,54 mg (27%); sólido branco; pf 215–215°C; RMN de ¹H (400,13 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2,69 (ddd, J₁= 5,13-17,23 J₂= 4,60-17,30 Hz, 2H), 3,37 (br, 1H), 4,39 (dd, J= 0,96-4,87 Hz, 1H), 9,89 (s, 1H), 11,63 (s, 1H), 12,59 (br, 1H); RMN de ¹³C (100,61 MHz, DMSO-*d*₆) δ 34,84 (CH₂), 57,59 (CH), 170,95 (C=O), 176,41 (C=O), 183,39 (C=S).

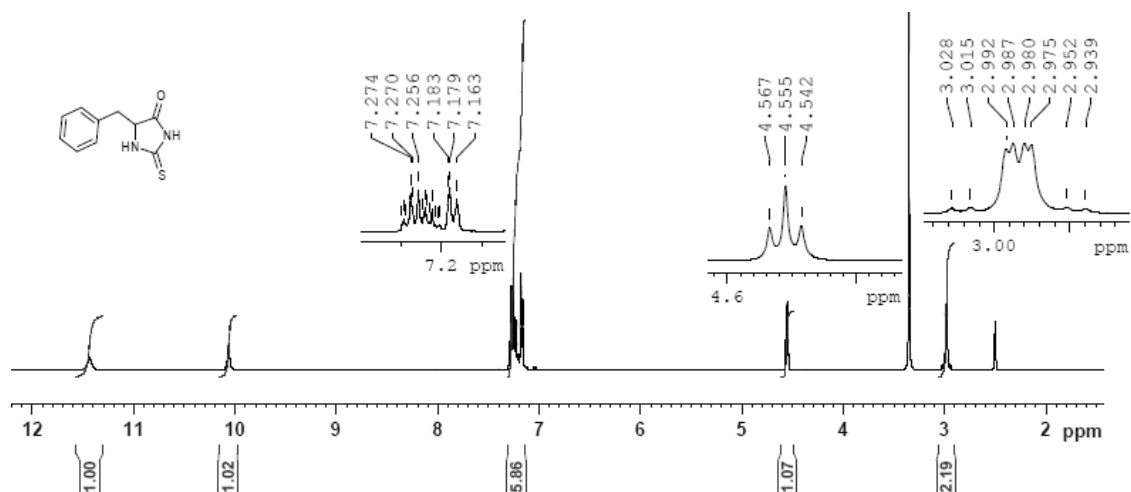


Figura 40. Espectro de RMN de ¹H de 5d (400,13 MHz) em DMSO-*d*₆.

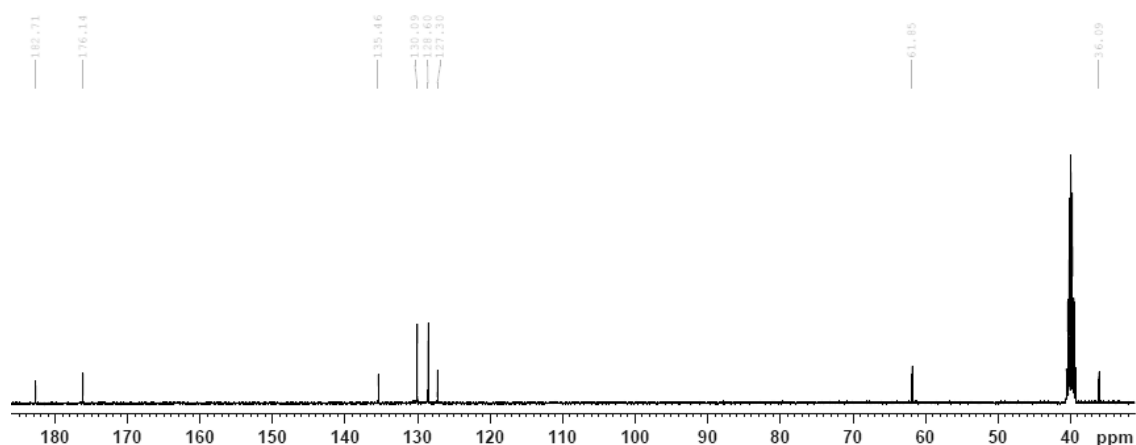


Figura 41. Espectro de RMN de ¹³C de 5d (100,61 MHz) em DMSO-*d*₆.

5-benzil-2-tioxoimidazolidin-4-ona (5d). Rendimento 290,91 mg (71%); sólido amarelo; pf 165–167°C; RMN de ¹H (400,13 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2,98 (dd, J = 4,94-14,36 Hz, 2H), 4,55 (t, J = 4,94 Hz, 1H), 7,16-7,29 (m, 5H), 10,06 (s, 1H), 11,43 (s, 1H); RMN de ¹³C (100,61 MHz, DMSO-*d*₆) δ 36,09 (CH₂), 61,84 (CH), 127,29 (CH), 128,59 (CH), 130,08 (CH), 135,46 (C), 176,14 (C=O), 182,71 (C=S).

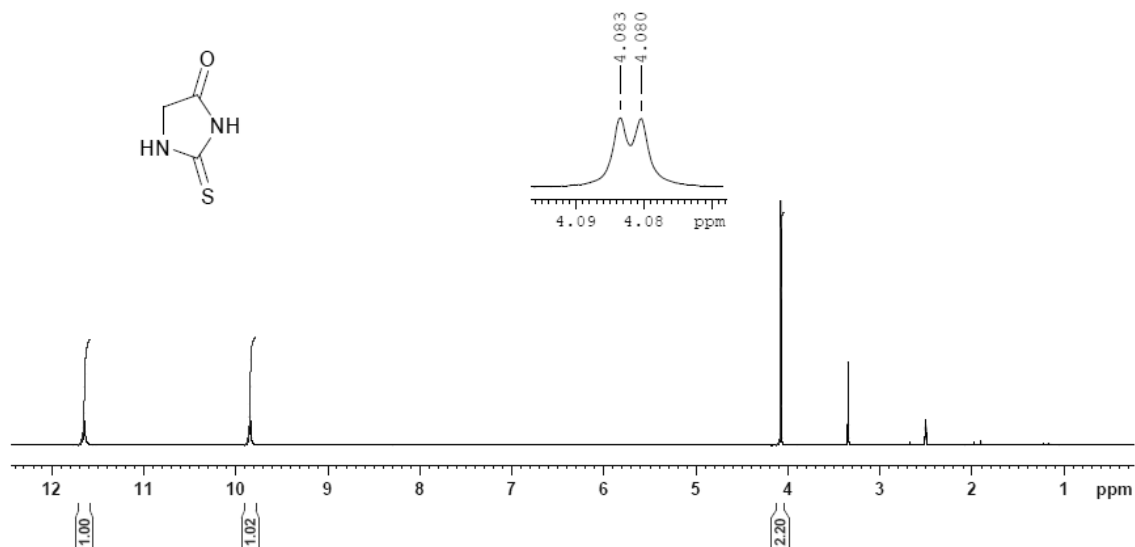


Figura 42. Espectro de RMN de ^1H 5e (400,13 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

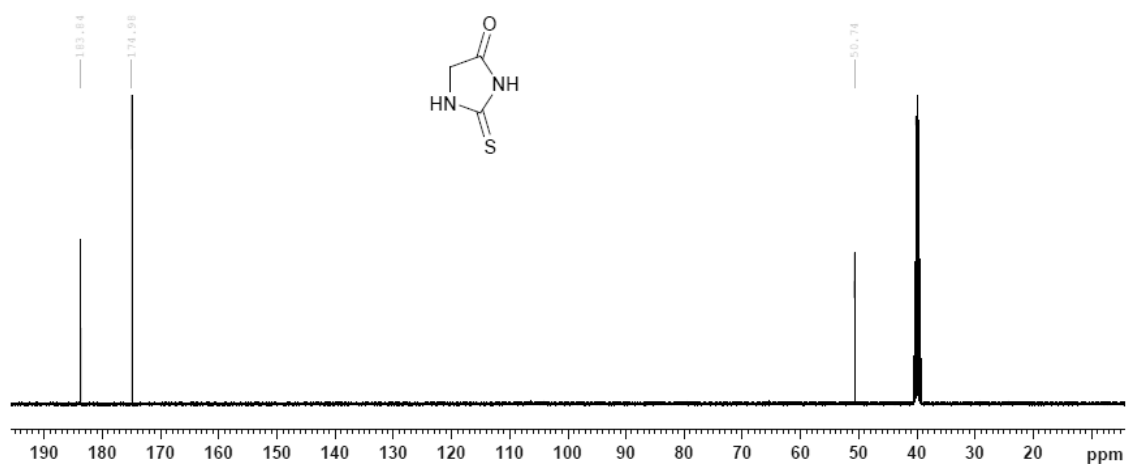


Figura 43. Espectro de RMN de ^{13}C 5e (100,61 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

2-tioxoimidazolidin-4-ona (3e). Rendimento 66,11 mg (52%); sólido branco; pf 204-206°C; RMN de ^1H (400,13 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 4,08 (d, 2H), 9,84 (s, 1H), 11,64 (s, 1H); RMN de ^{13}C (100,61 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 50,80 (CH_2), 175,10 ($\text{C}=\text{O}$), 183,90 ($\text{C}=\text{S}$).

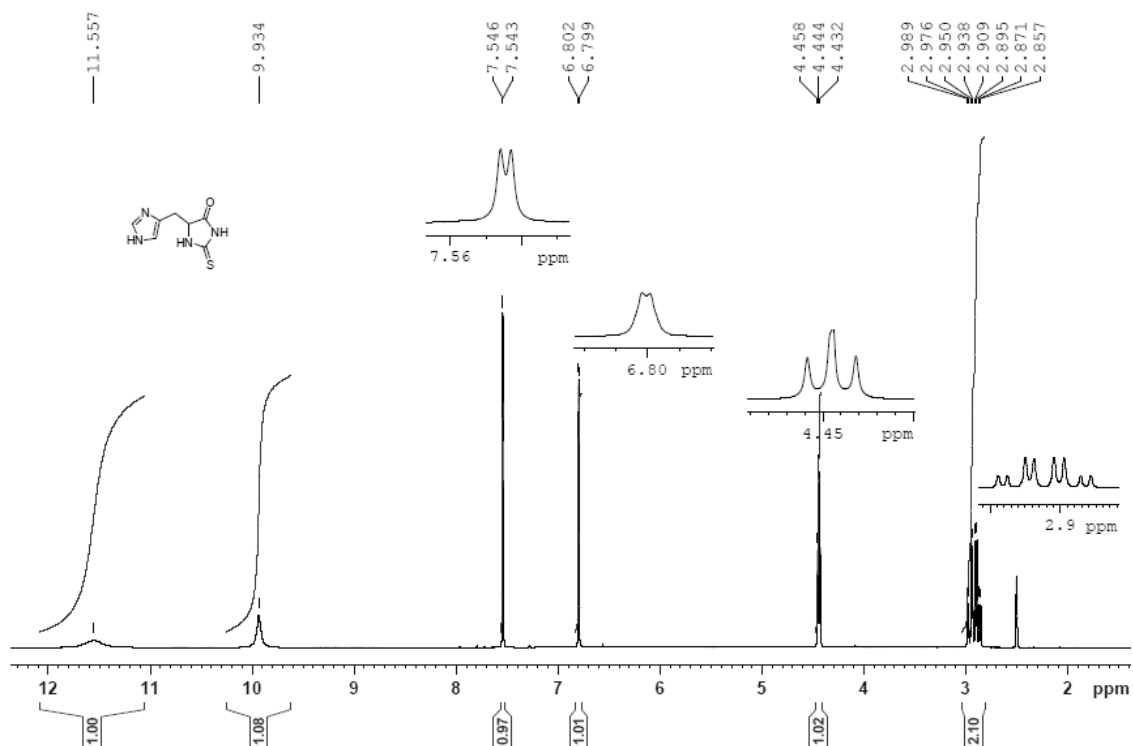


Figura 44. Espectro de RMN de ^1H 5g (400,13 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

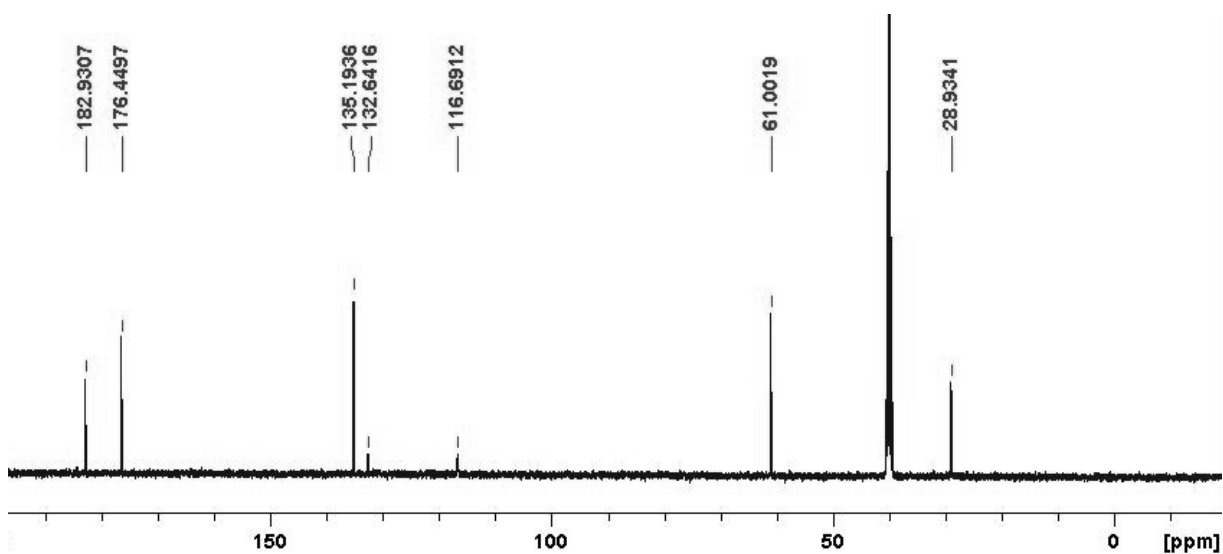


Figura 45. Espectro de RMN de ^{13}C 5g (100,61 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

5-((1H-imidazol-4-yl)metil)-2-tioxoimidazolidin-4-ona (5g). Rendimento 67,85 mg (35%); sólido amarelo; pf 224–228°C; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 2,92 (ddd, $J_1 = 4,84\text{-}15,38$, $J_2 = 5,70\text{-}15,38$ Hz, 2H), 4,44 (t, $J = 5,72$ Hz, 1H), 6,80 (d, $J = 0,96$ Hz, 1H), 7,54 (d, $J = 1,12$ Hz, 1H), 9,93 (s, 1H), 11,56 (br, 1H); RMN de ^{13}C (100,61 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 28,93 (CH_2), 61,00 (CH), 116,69 (CH), 132,64 (CH), 135,19 (C) 176,45 (C=O), 184,36 (C=S).

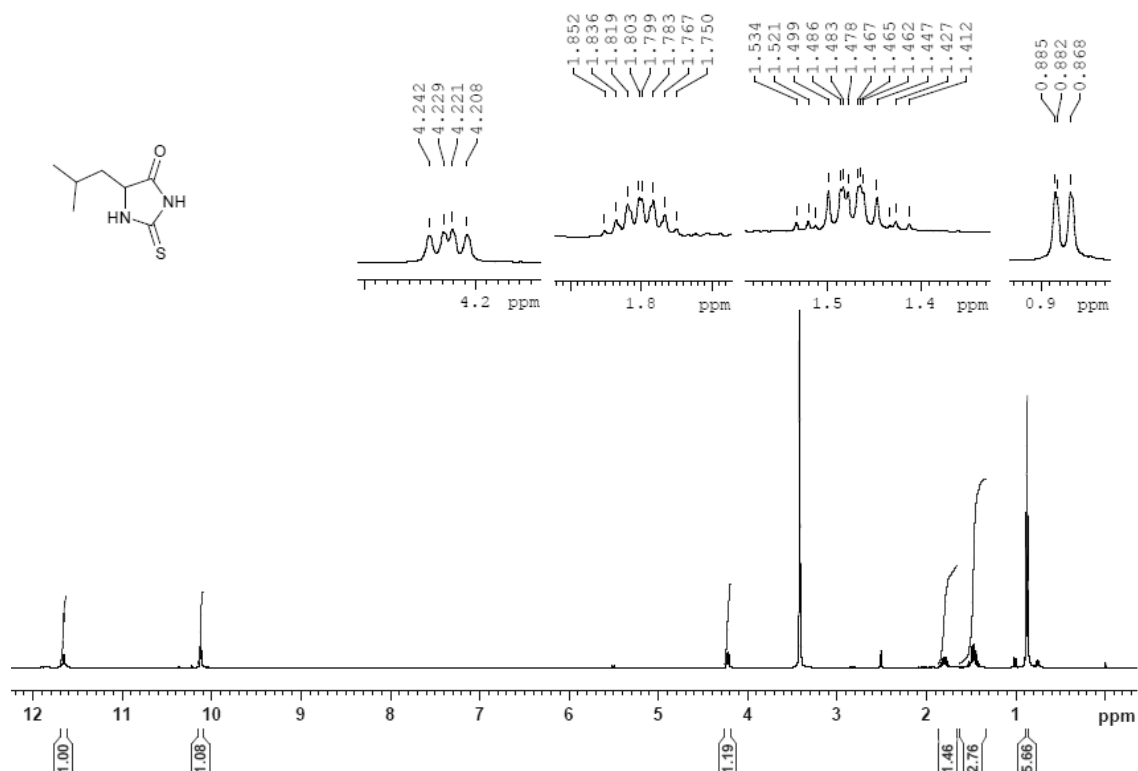


Figura 46. Espectro de RMN de ^1H 5h (400,13 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

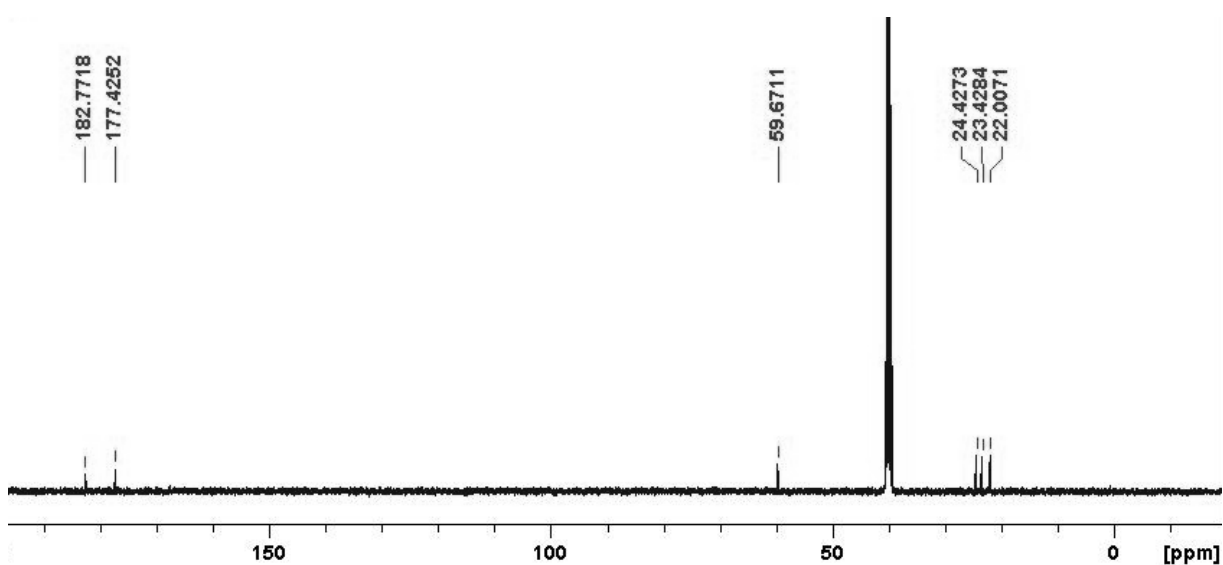


Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C 5h (100,61 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

5-isobutil-2-tioxiimidazolidin-4-ona (5h). Rendimento 292,26 mg (85%); sólido amarelo; pf 165–170°C; RMN de ^1H (400,13 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 0,88 (d, J = 6,71 Hz, 6H), 1,44-1,49 (m, 2H), 1,76-1,83 (m, 1H), 4,22 (dd, J = 5,17-8,33 Hz, 1H), 10,12 (s, 1H), 11,66 (s, 1H); RMN de ^{13}C (100,61 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 22,00 (CH_3), 23,42 (CH_3), 24,43 (CH), 59,67 (CH), 177,43 (C=O), 182,42 (C=S).

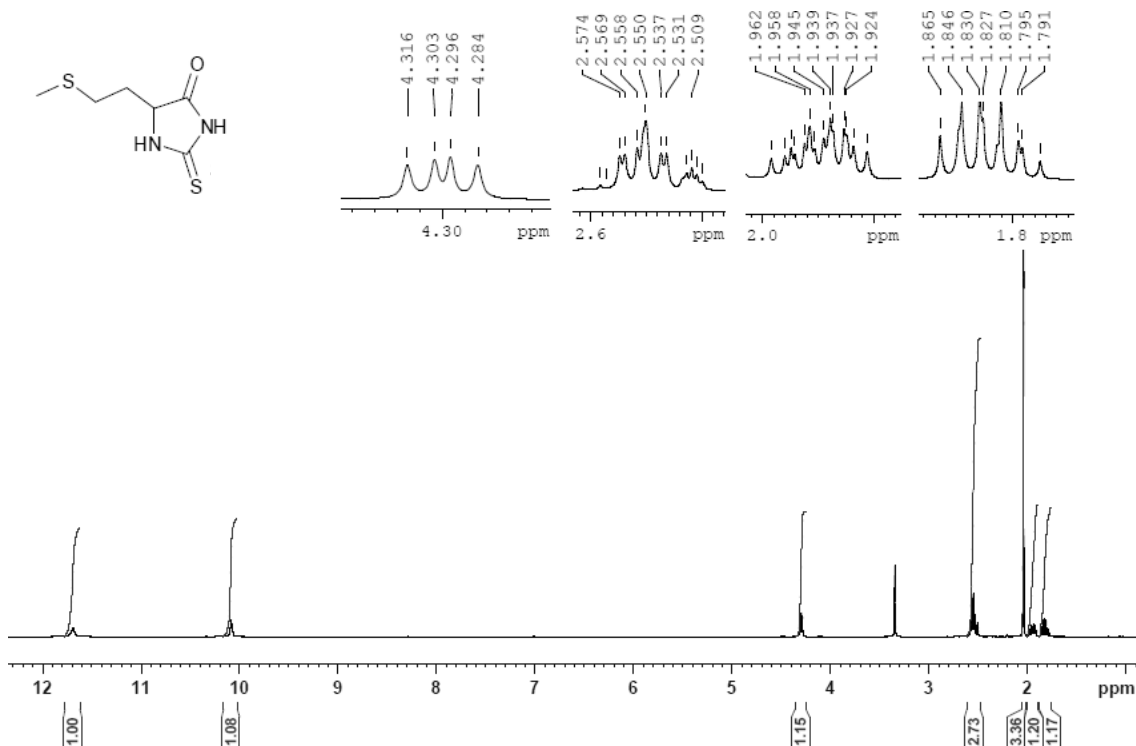


Figura 48. Espectro de RMN de ^1H 5i (400,13 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

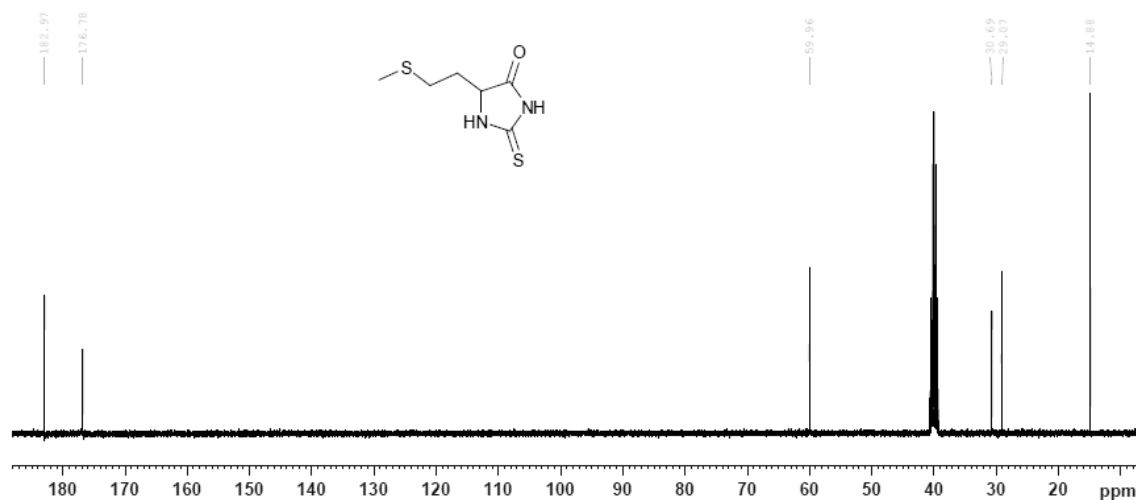


Figura 49. Espectro de RMN de ^{13}C 5i (100,61 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

5-(2-(metiltio)etil)-2-tioxoimidazolidin-4-ona (5i).

Rendimento 252,67 mg (72%); sólido amarelo; pf 139–145°C; RMN de ^1H (400,13 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1,77-1,88 (m, 1H), 1,90-1,99 (m, 1H), 2,04 (s, 3H), 2,49-2,59 (m, 2H), 4,30 (dd, J = 4,89-7,75 Hz, 1H), 10,08 (br, 1H), 11,69 (s, 1H); RMN de ^{13}C (100,61 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 14,91 (CH_3), 29,08 (CH_2), 30,71 (CH_2), 60,00 (CH), 176,79 (C=O), 182,98 (C=S).

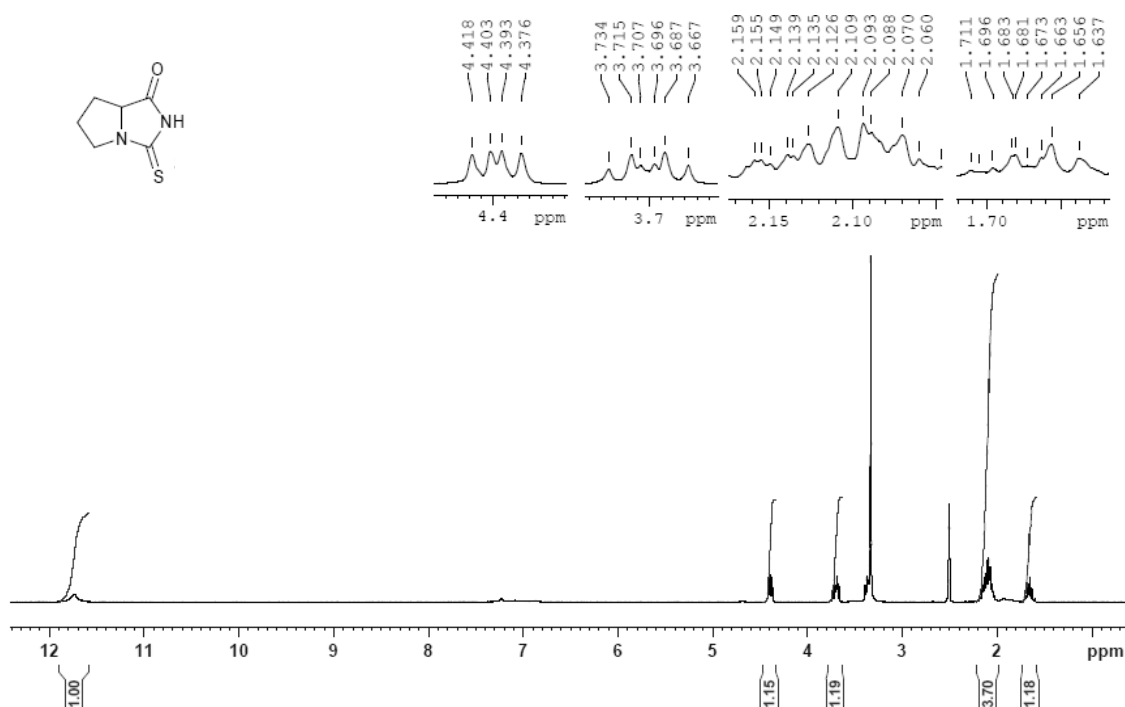


Figura 50. Espectro de RMN de ^1H 5j (400,13 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

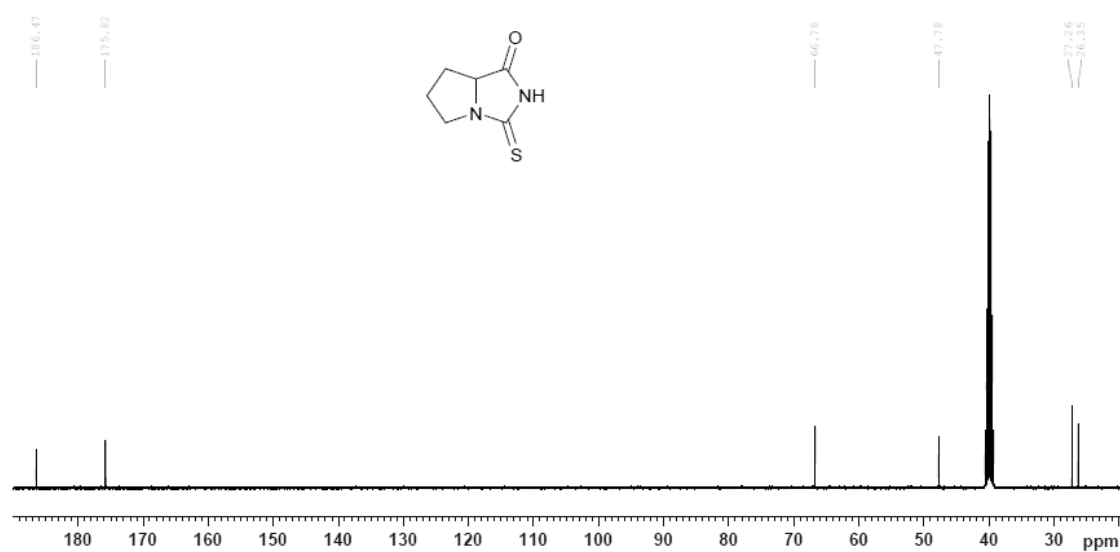


Figura 51. Espectro de RMN de ^{13}C de 5j (100,61 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

3-tioxohexaidro-1H-pirrolidina[1,2-c]imidazol-1-ona (5j).

Rendimento 114,57 mg (37%); sólido amarelo; pf 153–155°C; RMN de ^1H (400,13 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1,60-1,71 (m, 1H), 2,03-2,18 (m, 4H), 3,66-3,73 (m, 1H), 4,39 (dd, J = 6,19-10,06 Hz, 1H), 11,73 (br, 1H); RMN de ^{13}C (100,61 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 26,35 (CH_2), 27,26 (CH_2), 47,78 (CH_2), 66,78 (CH), 175,82 (C=O), 186,47 (C=S).

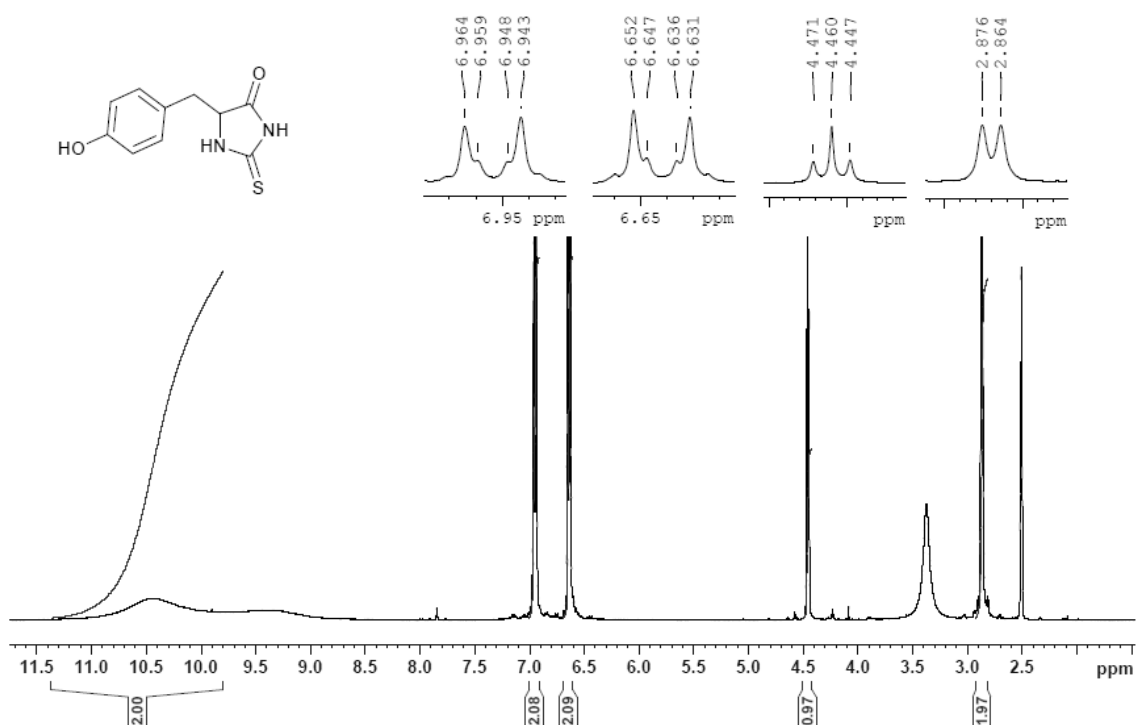


Figura 52. Espectro de RMN de ^1H de 5k(400,13 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

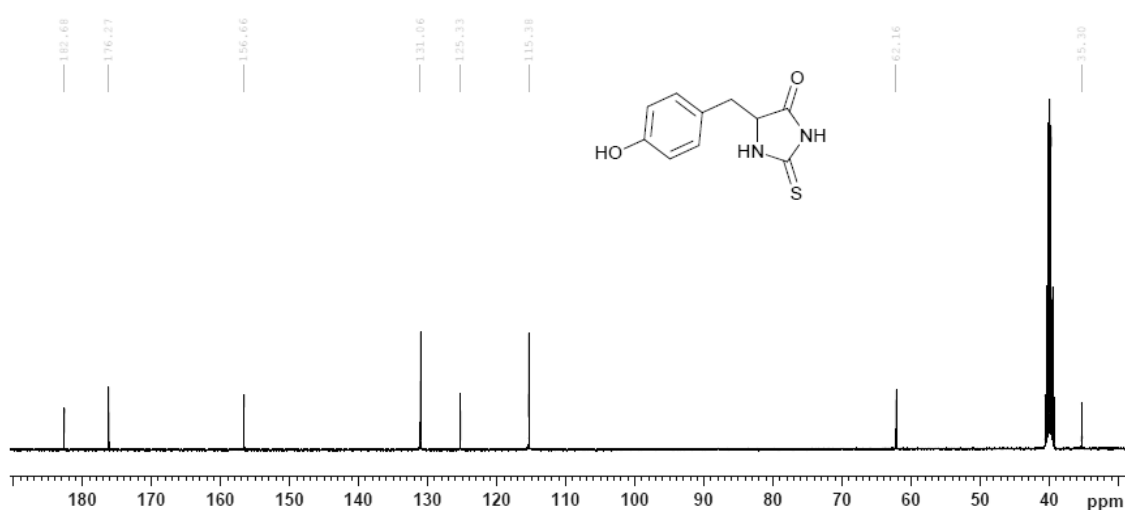


Figura 53. Espectro de RMN de ^{13}C de 5k (100,61 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

5-(4-hidroxibenzil)-2-tioimidazolidin-4-ona (5k).

Rendimento 282,20 mg (63%); sólido amarelo; pf 197–202°C; RMN de ^1H (400,13 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 2,87 (d, J = 4,77 Hz, 2H), 4,46 (t, J = 4,71 Hz, 1H), 6,64 (dd, J = 2,00-6,54 Hz, 2H), 6,95 (dd, J = 2,00-6,60 Hz, 2H), 10,43 (br, 2H); RMN de ^{13}C (100,61 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 35,30 (CH_2), 62,15 (CH), 115,38 (CH), 125,32 (CH), 131,05 (C), 156,66 (C-O), 176,26 (C=O), 182,68 (C=S).

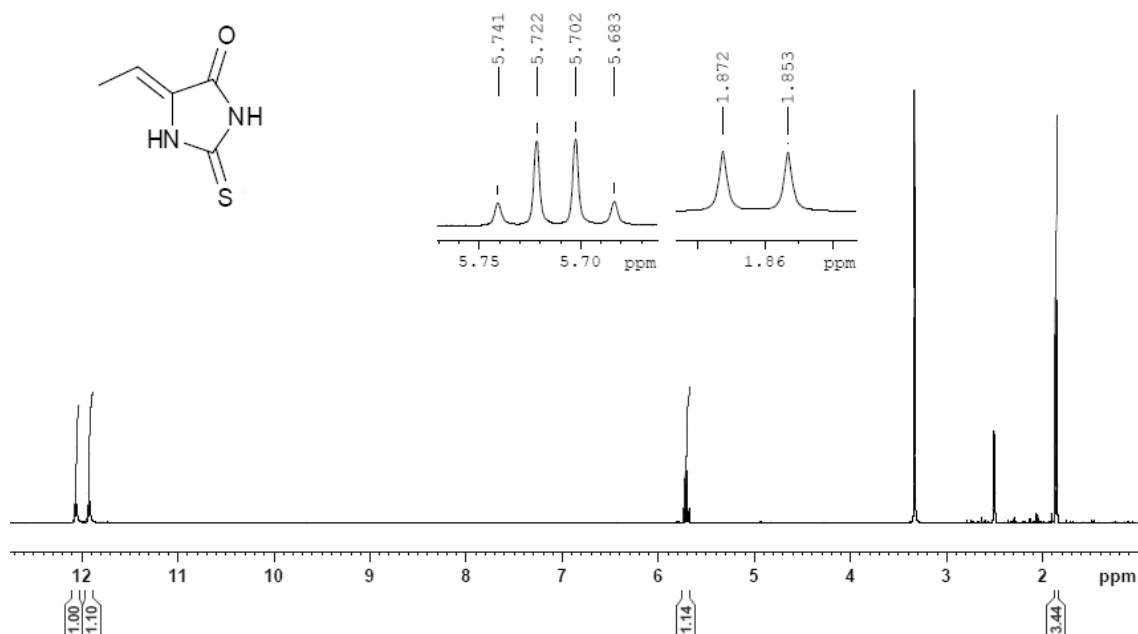


Figura 54. Espectro de RMN de ^1H de 5I (400,13 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

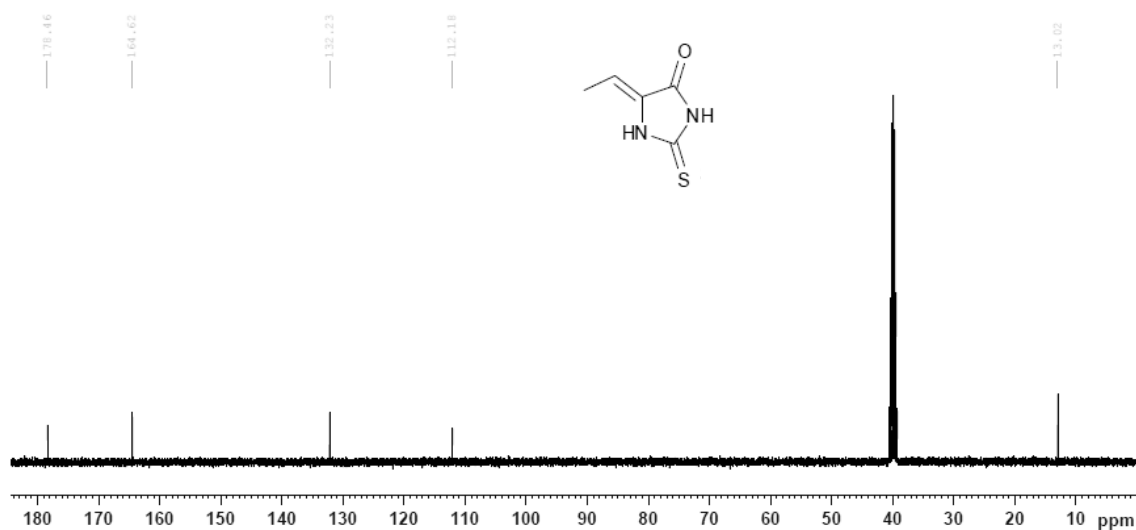


Figura 55. Espectro de RMN de ^{13}C de 5I (100,61 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

(Z)-5-etilideno-2-tioimidazolidin-4-ona (5I). Rendimento 105,06 mg (56%); sólido amarelo; pf 252–255°C; RMN de ^1H (400,13 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1,86 (d, $J=7,68$ Hz, 3H), 5,71 (q, $J=7,68$ Hz, 1H), 11,92 (s, 1H), 12,06 (s, 1H); RMN de ^{13}C (100,61 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 13,01 (CH_3), 112,18 (CH), 132,23 (C), 164,62 (C=O), 178,45 (C=S).

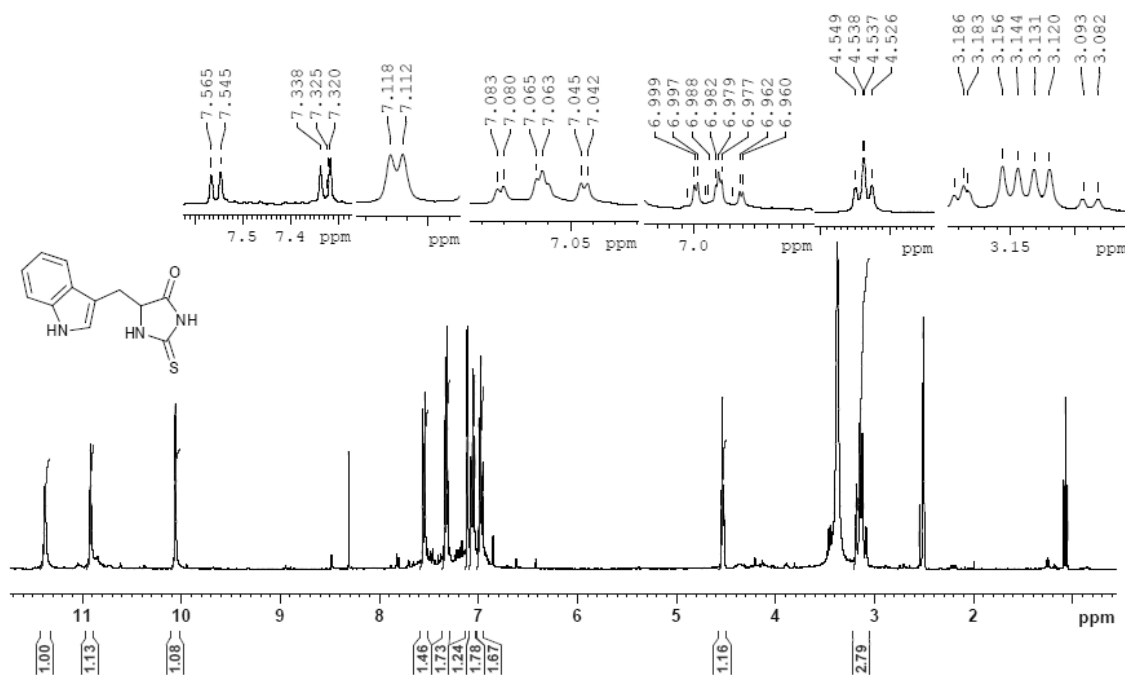


Figura 56. Espectro de RMN de ^1H de 5m (400,13 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

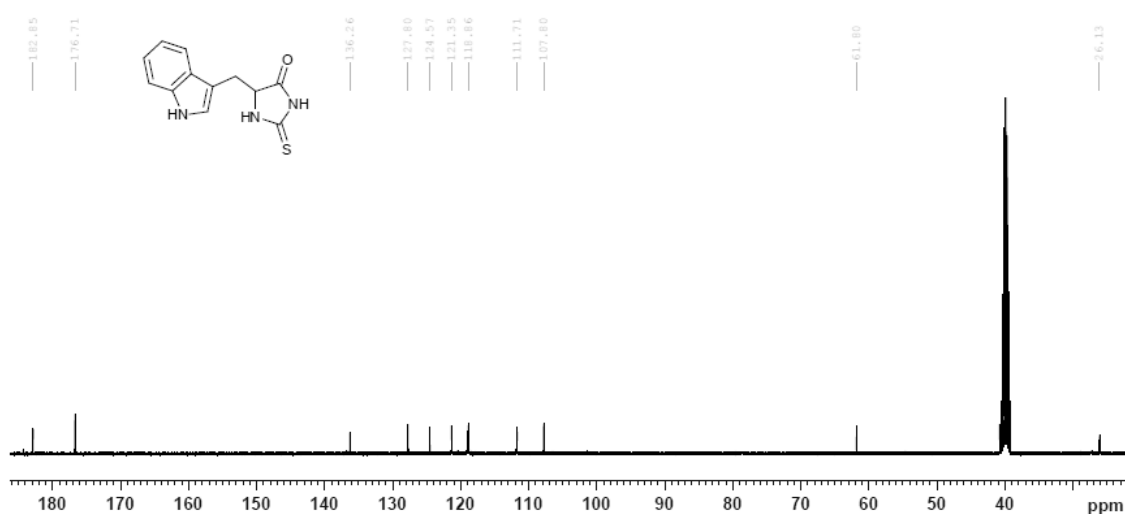


Figura 57. Espectro de RMN de ^{13}C de 5m (100,61 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

5-((1H-indol-3-il)metil)-2-tioxoimidazolidin-4-ona (5m).

Rendimento 162,03 mg (33%); sólido amarelo; pf 196,2-204,8°C; RMN de ^1H (400,13 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 3,08-3,19 (m, 2H), 4,53 (dd, 4,24-4,91 Hz, 1H), 6,95-7,00 (m, 1H), 7,04-7,08 (m, 1H), 7,11 (d, $J = 2,37$ Hz, 1H), 7,31-7,33 (m, 1H), 7,55 (d, $J = 7,94$ Hz, 1H), 10,06 (s, 1H) 10,91 (s, 1H), 11,37 (s, 1 H); RMN de ^{13}C (100,61 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 26,13 (CH_2), 61,80 (CH), 107,80 (CH), 111,71 (CH), 118,85 (CH), 121,35 (CH), 124,57 (C), 127,79 (C), 136,26 (C), 176,70 (C=O), 182,85 (C=S).

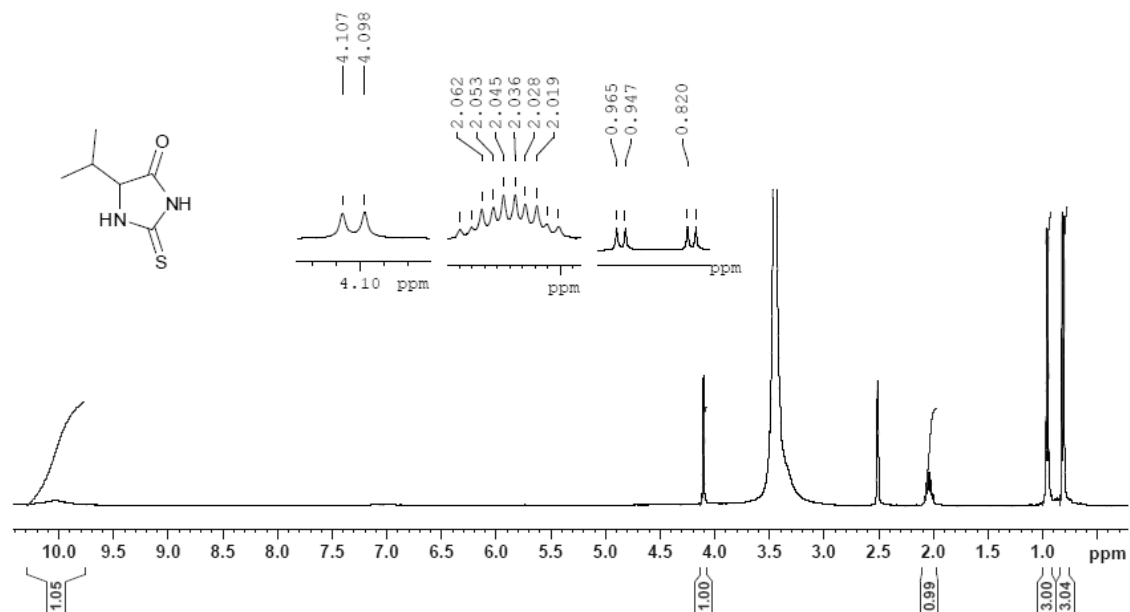


Figura 58. Espectro de RMN de ^1H de 5n (400,13 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

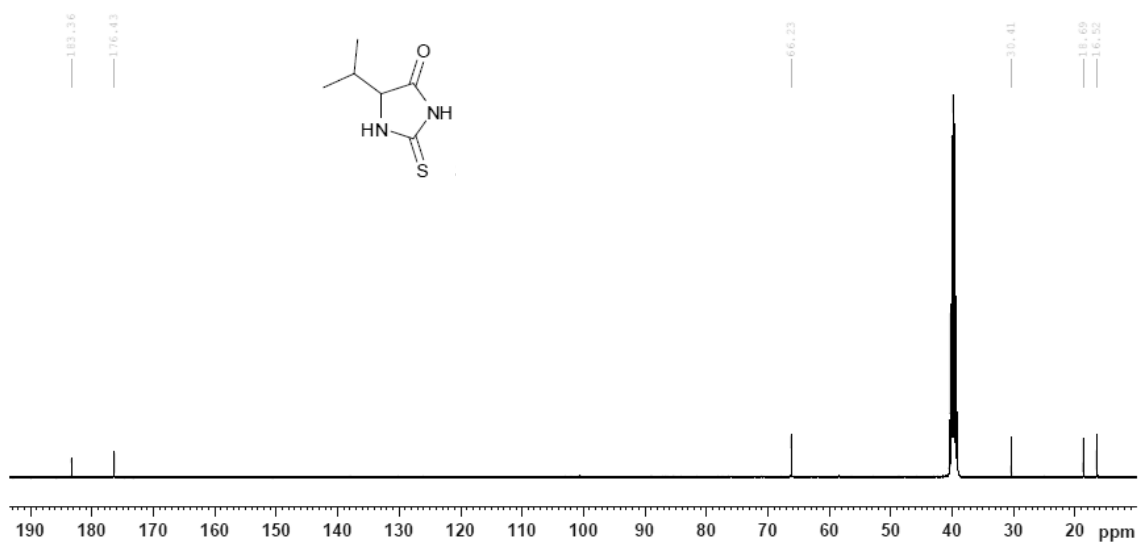


Figura 59. Espectro de RMN de ^{13}C de 5n (100,61 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

5-isopropil-2-tioxoimidazolidin-4-ona (5n). Rendimento 196,00 mg (62%); sólido amarelo; pf 134–136°C; RMN de ^1H (400,13 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 0,81 (d, $J = 6,77$ Hz, 3H), 0,95 (d, $J = 6,77$ Hz, 3H), 2,00–2,07 (m, 1H), 4,10 (d, $J = 3,65$ Hz, 1H), 10,02 (br, 1H); RMN de ^{13}C (100,61 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 16,51 (CH_3), 18,69 (CH_3), 30,41 (CH), 66,23 (CH), 176,43 (C=O), 183,36 (C=S).

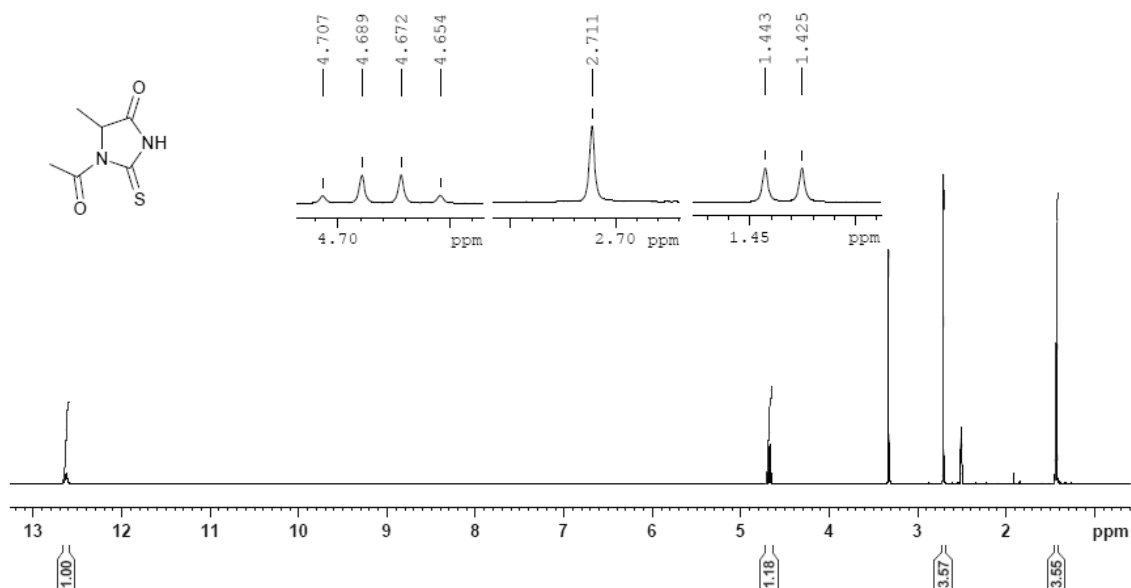


Figura 60. Espectro de RMN de ¹H de 6a (400,13 MHz) em DMSO-*d*₆.

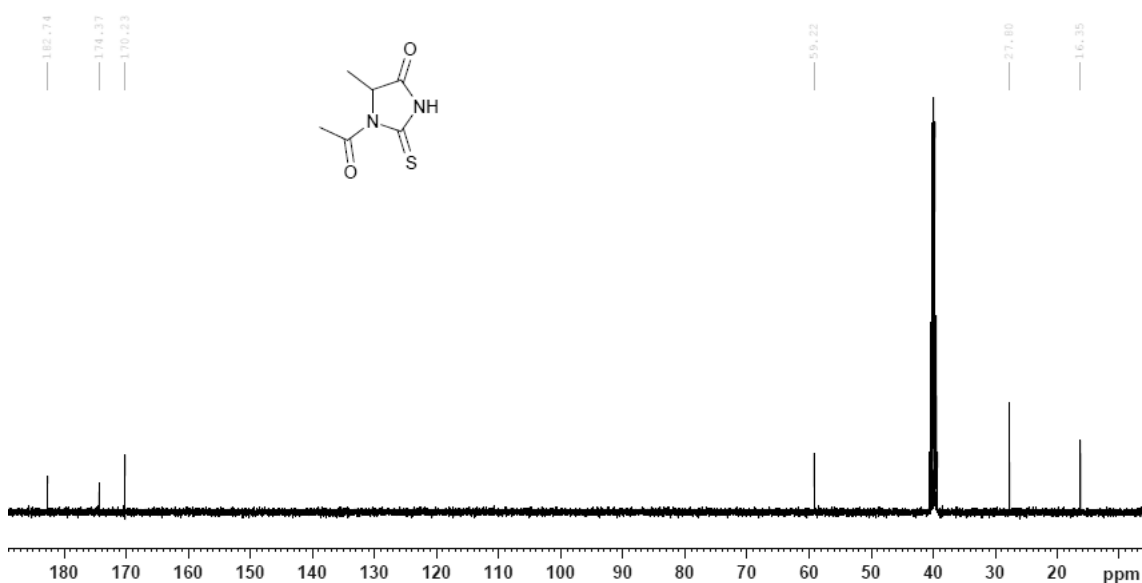


Figura 61. Espectro de RMN de ¹³C de 6a (100,61 MHz) em DMSO-*d*₆.

1-acetil-5-metil-2-tioxoimidazolidin-4-ona (6a). Rendimento 42,82 mg (95%); sólido branco; pf 160–162°C; RMN de ¹H (400,13 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,43 (d, J= 7,00 Hz, 3H), 2,71 (s, 3H), 4,68 (q, J= 7,00 Hz, 1H), 12,63 (s, 1H); RMN de ¹³C (100,61 MHz, DMSO-*d*₆) δ 16,35 (CH₃), 27,79 (CH₃), 59,22 (CH), 174,37 (C=O), 182,73 (C=S).

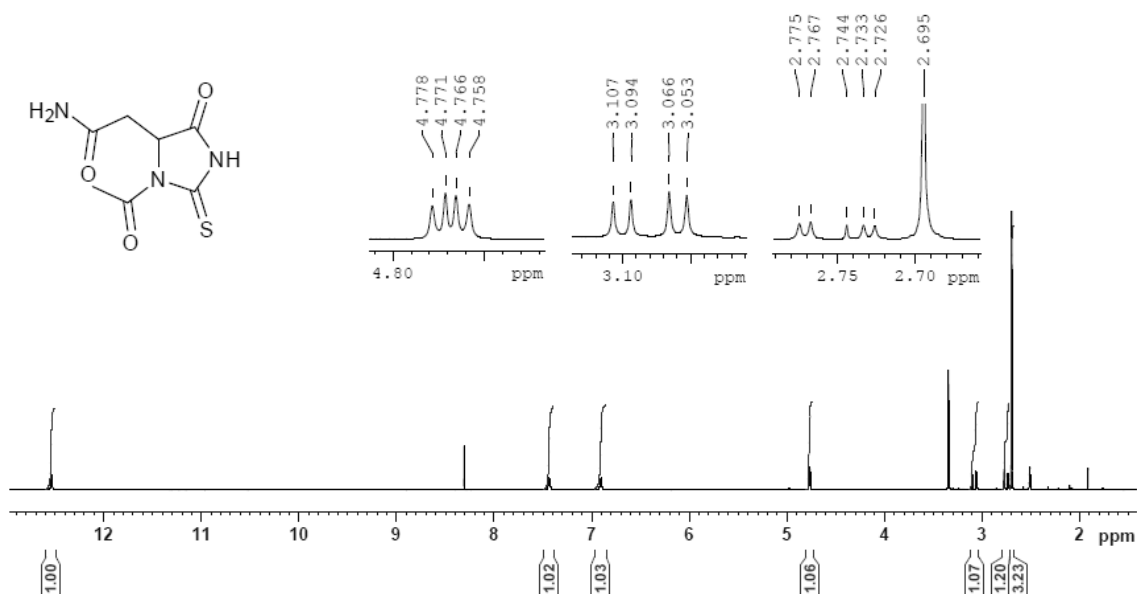


Figura 62. Espectro de RMN de ^1H 6b (400,13 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

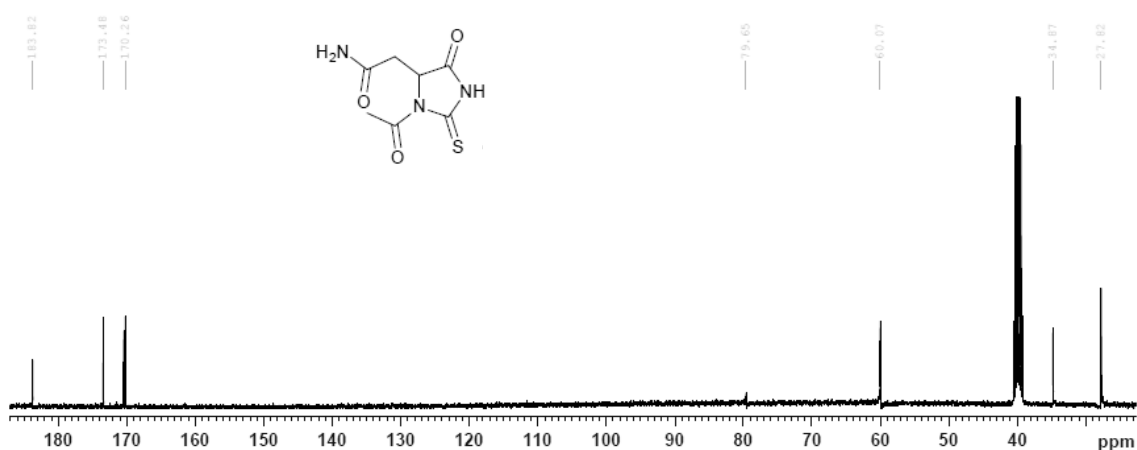


Figura 63. Espectro de RMN de ^{13}C de 6b (100,61 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

2-(3-acetil-5-oxo-2-tioimidazolidin-4-il)acetamida (6b). Rendimento 146,38 mg (51%); sólido branco; pf 210–212°C; RMN de ^1H (400,13 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 2,69 (s, 3H), 2,75 (dd, $J = 2,89\text{-}16,45$ Hz, 1H), 3,08 (dd $J = 5,21\text{-}16,45$ Hz, 1H), 4,76 (dd, $J = 2,89\text{-}5,21$ Hz, 1H), 6,90 (s, 1H), 7,43 (s, 1H), 12,53 (s, 1H); RMN de ^{13}C (100,61 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 27,82 (CH_3), 34,86 (CH_2), 60,07 (CH), 79,64 (C=O), 170,26 (C=O), 173,48 (C=O), 183,81 (C=S).

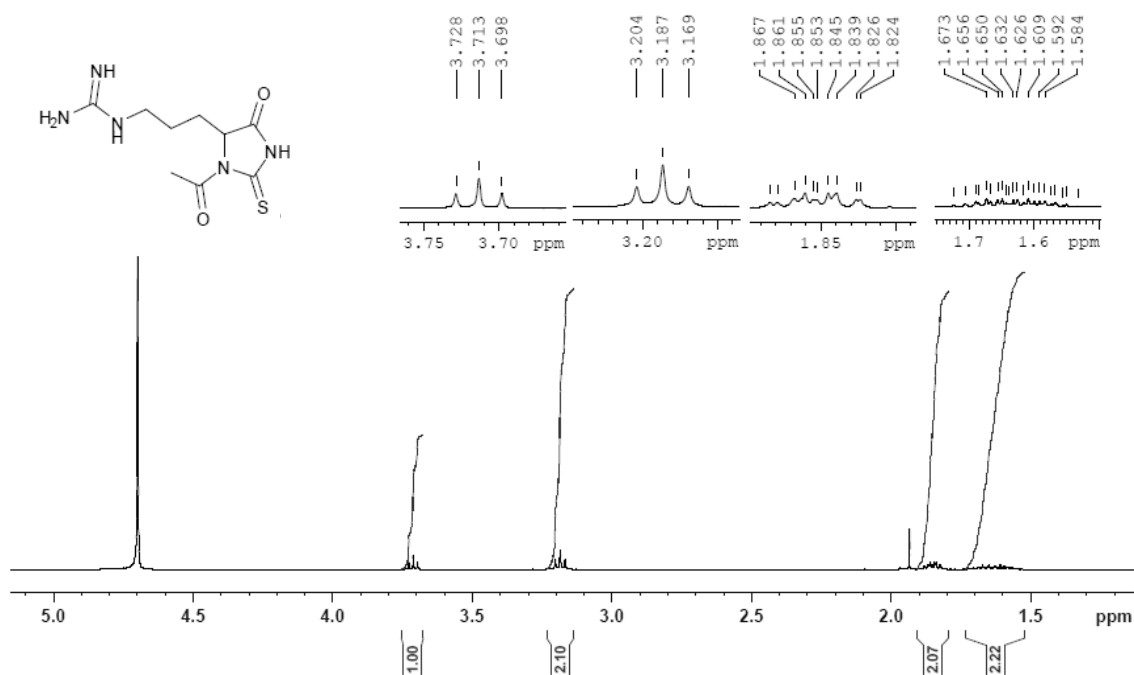


Figura 64. Espectro de RMN de ¹H de 6c (400,13 MHz) em D₂O.

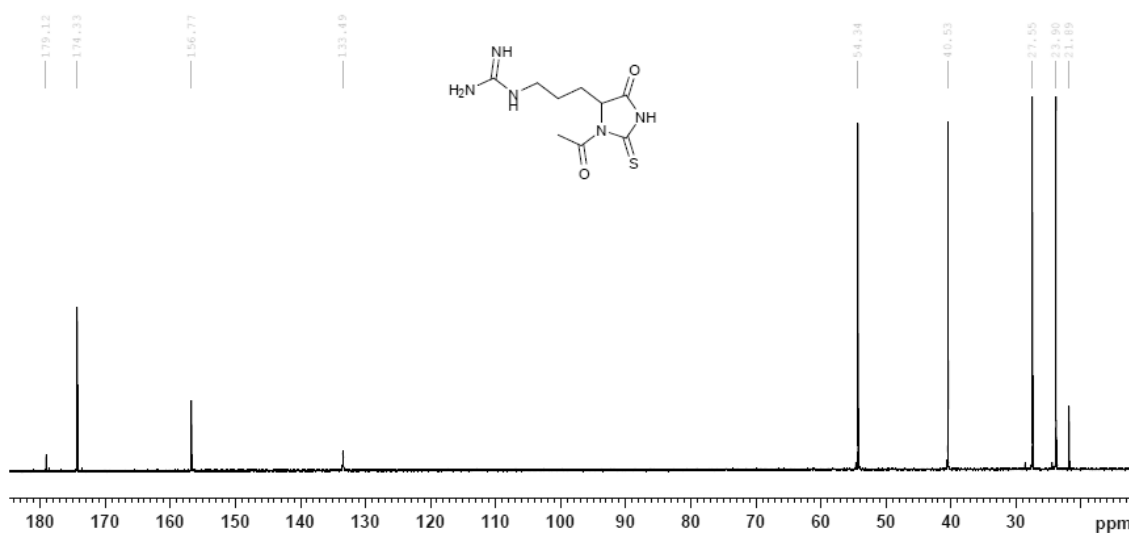


Figura 65. Espectro de RMN de ¹³C de 6c (100,61 MHz) em D₂O.

1-(3-(3-acetil-5-oxo-2-tioimidazolidin-4-il)propil)guanidina (6c). Rendimento 209,30 mg (73%); sólido amarelo; pf 180-183°C; RMN de ¹H (400,13 MHz, D₂O- d₂) δ 1,55-1,72 (m, 2H), 1,82-1,88 (m, 2H), 3,18 (t, J= 6,90 Hz, 2H), 3,71 (t, J= 6,18 Hz, 1H); RMN de ¹³C (100,61 MHz, D₂O-d₂) δ 21,89 (CH₃), 23,90 (CH₂), 27,55 (CH₂), 40,52 (CH₂), 54,33 (CH), 133,49 (C), 156,76 (C=O), 174,33 (C=O), 179,12 (C=S).

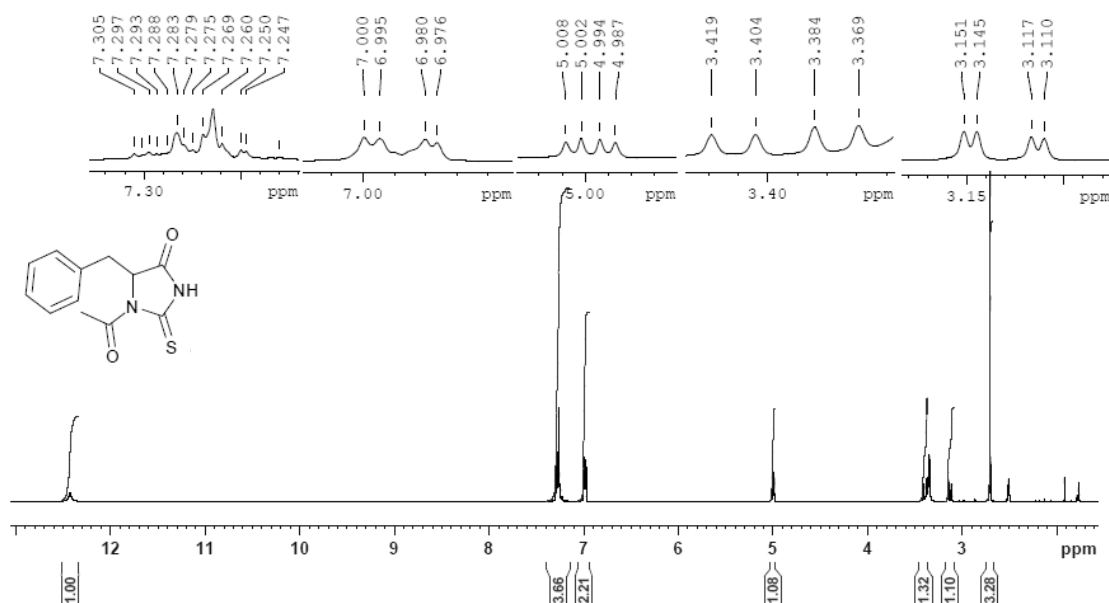


Figura 66. Espectro de RMN de ¹H de 6d (400,13 MHz) em DMSO-*d*₆.

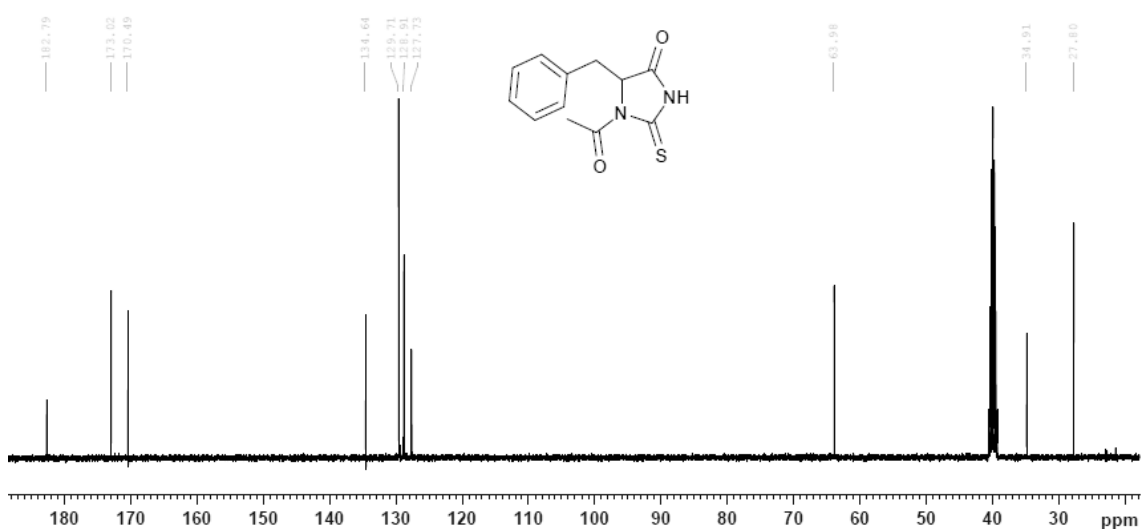


Figura 67. Espectro de RMN de ¹³C de 6d (100,61 MHz) em DMSO-*d*₆.

1-acetil-5-benzil-2-tioxiimidazolidin-4-ona (6d). Rendimento 234,00 mg (70%); sólido branco; pf 160-162°C; RMN de ¹H (400,13 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2,70 (s, 3H), 3,13 (dd, J = 2,67-13,90 Hz, 1H), 3,38 (dd, J= 5,93-13,90 Hz, 1H), 5,00 (dd, J= 2,67-5,93 Hz, 1H), 6,97-6,99 (m, 2H), 7,23-7,30 (m, 3H), 12,43 (s, 1H); RMN de ¹³C (100,61 MHz, DMSO-*d*₆) δ 27,80 (CH₃), 34,90 (CH₂), 63,98 (CH), 127,73 (CH), 128,91 (CH), 129,71 (CH), 134,63 (CH), 170,49 (C=O), 173,02 (C=O), 182,78 (C=S).

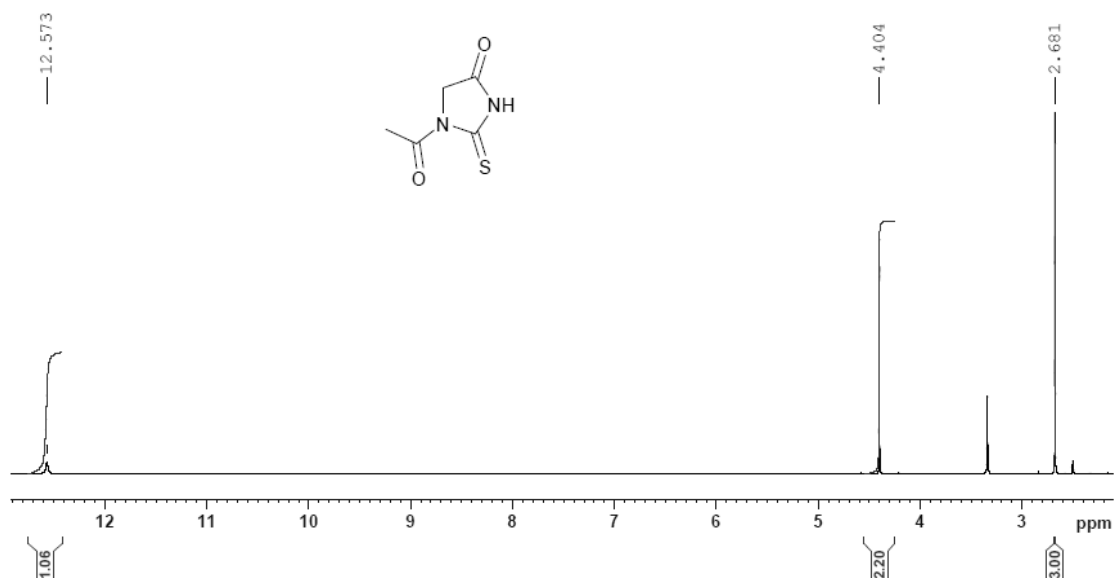


Figura 68. Espectro de RMN de ¹H de 6e (400,13 MHz) em DMSO-*d*₆.

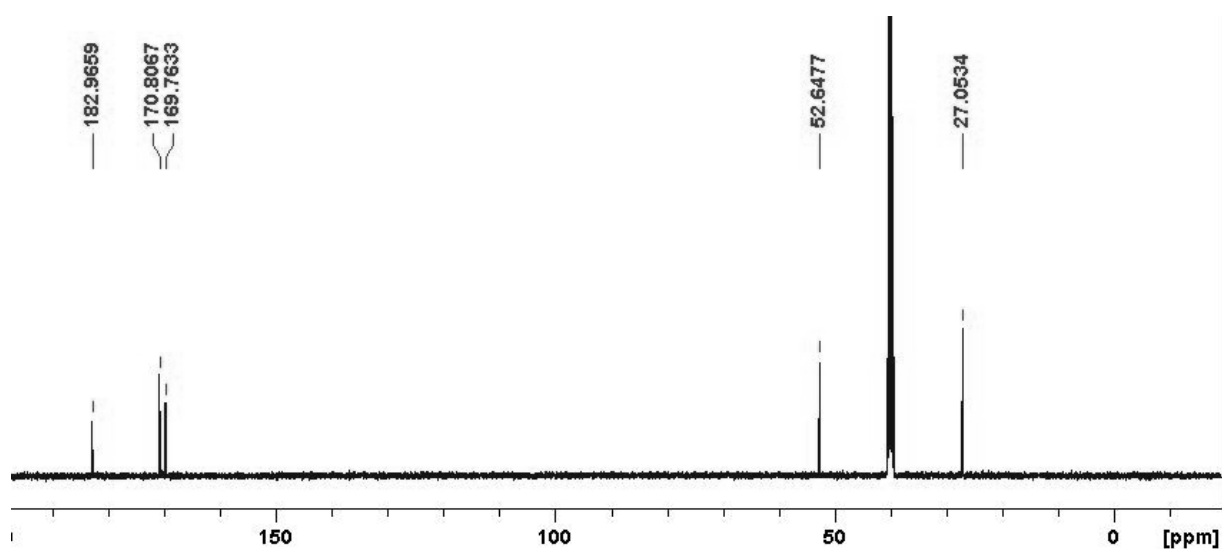


Figura 69. Espectro de RMN de ¹³C de 6e (100,61 MHz) em DMSO-*d*₆.

1-acetil-2-tioxoimidazolidin-4-ona (6e). Rendimento 340,00 mg (55%); sólido branco; pf 164-166°C; RMN de ¹H (400,13 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2,68 (s, 3H), 4,40 (s, 1H), 12,57 (s, 1H); RMN de ¹³C (100,61 MHz, DMSO-*d*₆) δ 27,05 (CH₃), 52,65 (CH₂), 169,76 (C=O), 170,80 (C=O), 182,96 (C=S).

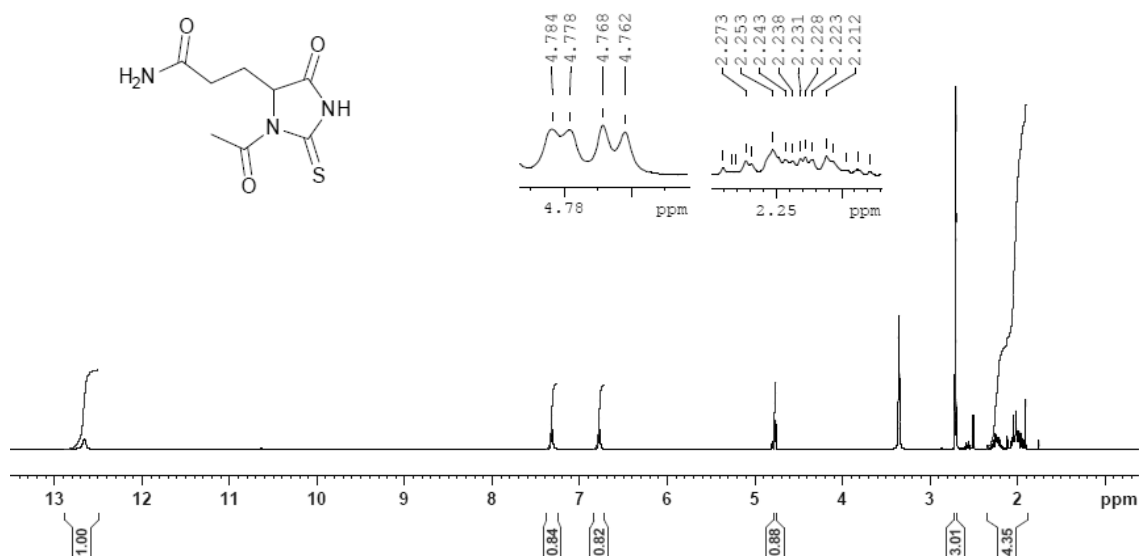


Figura 70. Espectro de RMN de ^1H de 6f (400,13 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

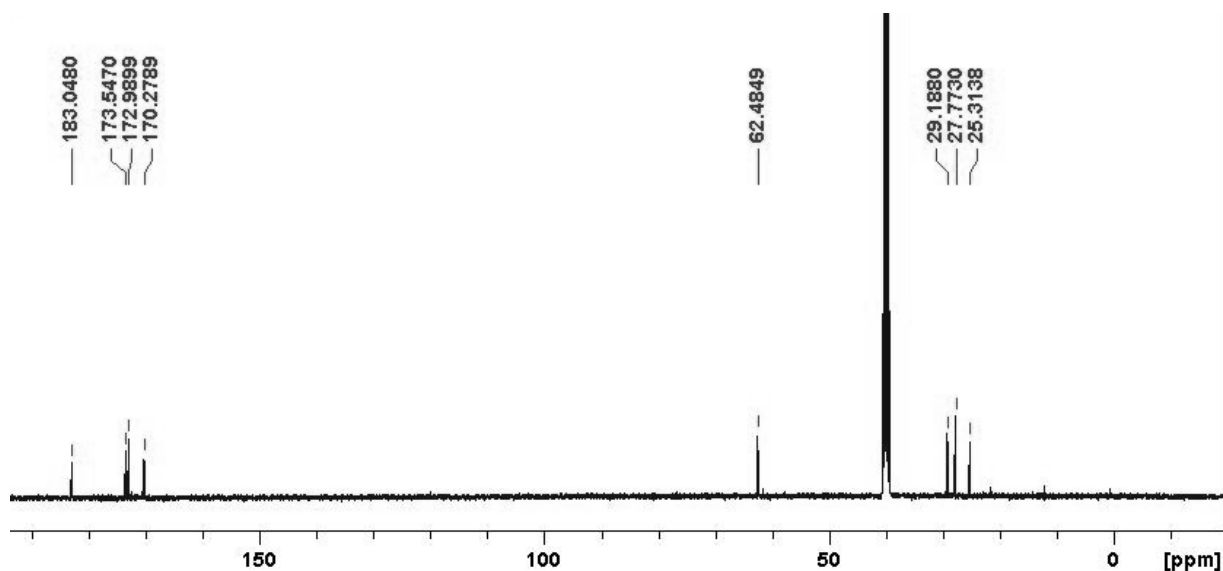


Figura 71. Espectro de RMN de ^{13}C de 6f (100,61 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

3-(3-acetil-5-oxo-2-tioimidazolidin-4-il)propanamida (6f).

Rendimento 106,48 mg (43%); sólido branco; pf 220-222°C; RMN de ^1H (400,13 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1,91-2,34 (m, 4H), 2,70 (s, 3H), 4,77 (dd, $J = 2,15-6,10$ Hz, 1H), 7,32 (s, 1H), 12,66 (s, 1H); RMN de ^{13}C (100,61 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 25,31 (CH_3), 27,77 (CH_2), 29,18 (CH_2), 62,48 (CH), 170,27 (C=O), 172,99 (C=O), 173,54 (C=O), 183,05 (C=S).

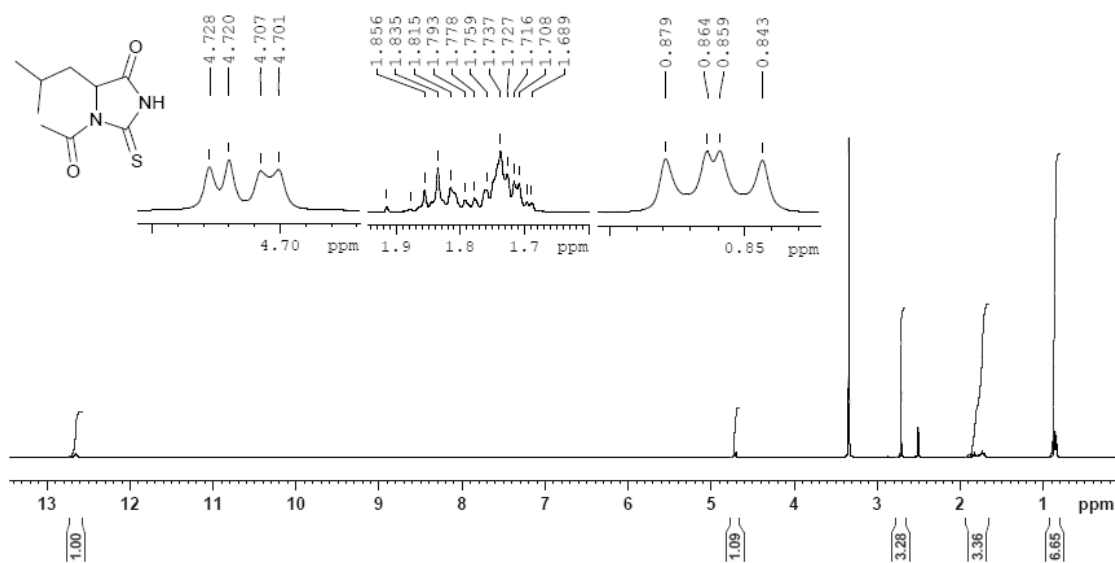


Figura 72. Espectro de RMN de ^1H de 6h (400,13 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

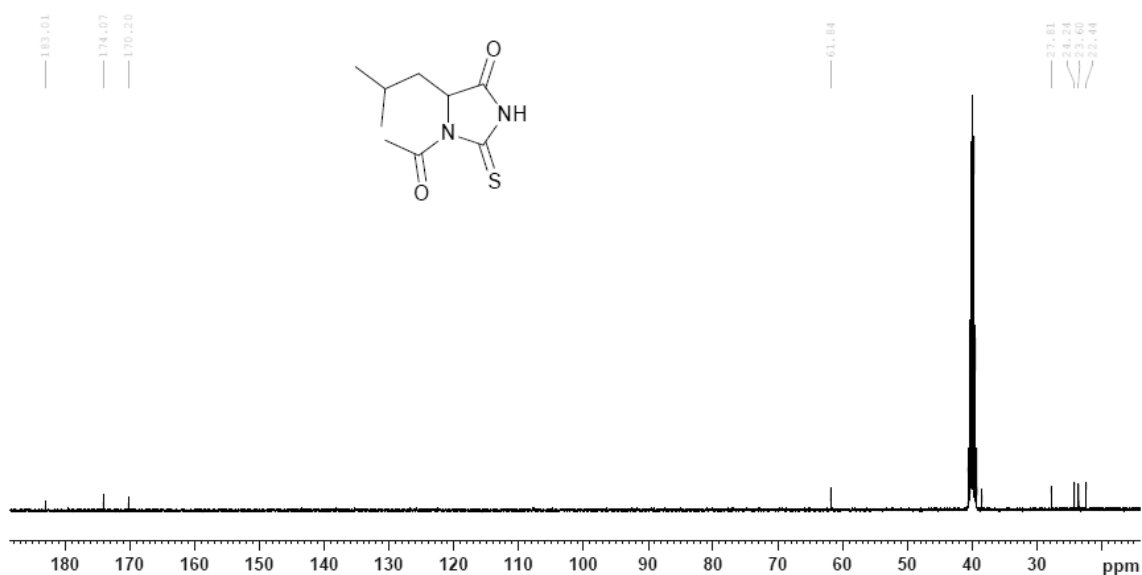


Figura 73. Espectro de RMN de ^{13}C de 6h (100,61 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

1-acetil-5-isobutil-2-tioxoimidazolidin-4-ona (6h). Rendimento 255,93 mg (90%); sólido branco; pf 125-127°C; RMN de ^1H (400,13 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 0,85 (dd, $J=6,12-8,06$ Hz, 6H), 1,69-1,91 (m, 3H), 2,71 (s, 3H), 4,71 (dd, $J=3,04-8,01$ Hz, 1H), 12,65 (s, 1H); RMN de ^{13}C (100,61 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 22,42 (CH_3), 23,60 (CH_3), 24,23 (CH_2), 27,80 (CH), 61,84 (CH), 170,20 (C=O), 174,06 (C=O), 183,00 (C=S).

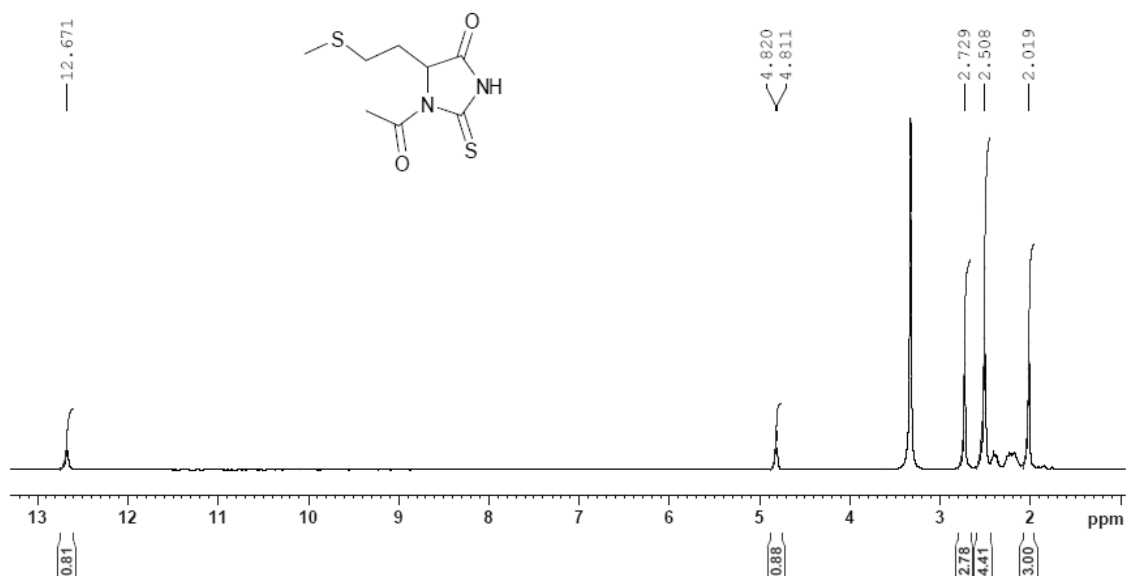


Figura 74. Espectro de RMN de ^1H 6i (400,13 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

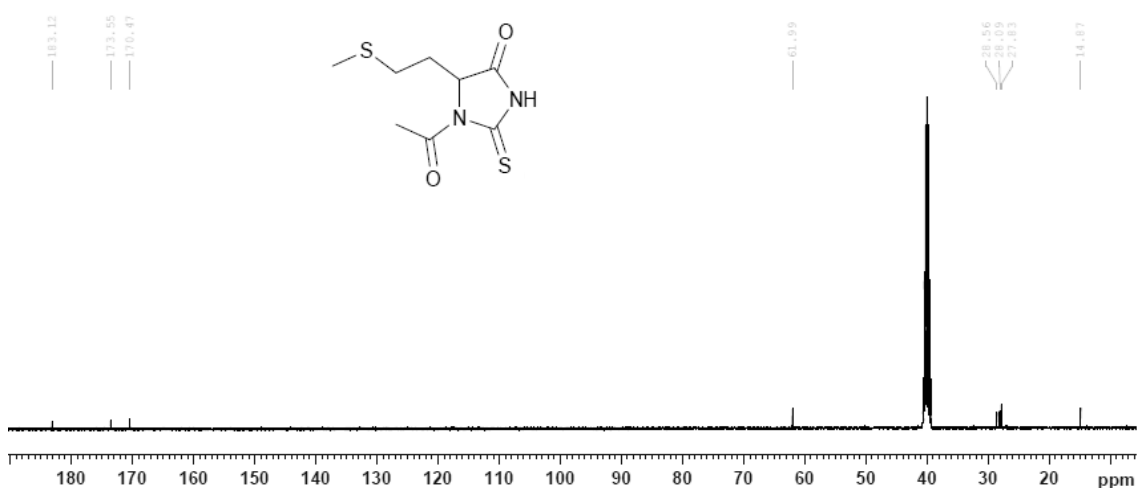


Figura 75. Espectro de RMN de ^{13}C de 6i (100,61 MHz) $\text{DMSO-}d_6$

1-acetil-5-(2-(metiltio)etil)-2-tioxoimidazolidin-4-ona (6i). Rendimento 261,66 mg (85%); sólido branco; pf 93-94°C; RMN de ^1H (400,13 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 2,01 (s, 3H), 2,50 (br, 4H), 2,72 (s, 3H), 4,81 (d, $J= 3,60$ Hz, 1H), 12,67 (s, 1H); RMN de ^{13}C (100,61 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 14,87 (CH_3), 27,83 (CH_3), 28,09 (CH_2), 28,56 (CH_2), 61,99 (C), 170,47 (C=O), 173,55 (C=O), 183,12 (C=S).

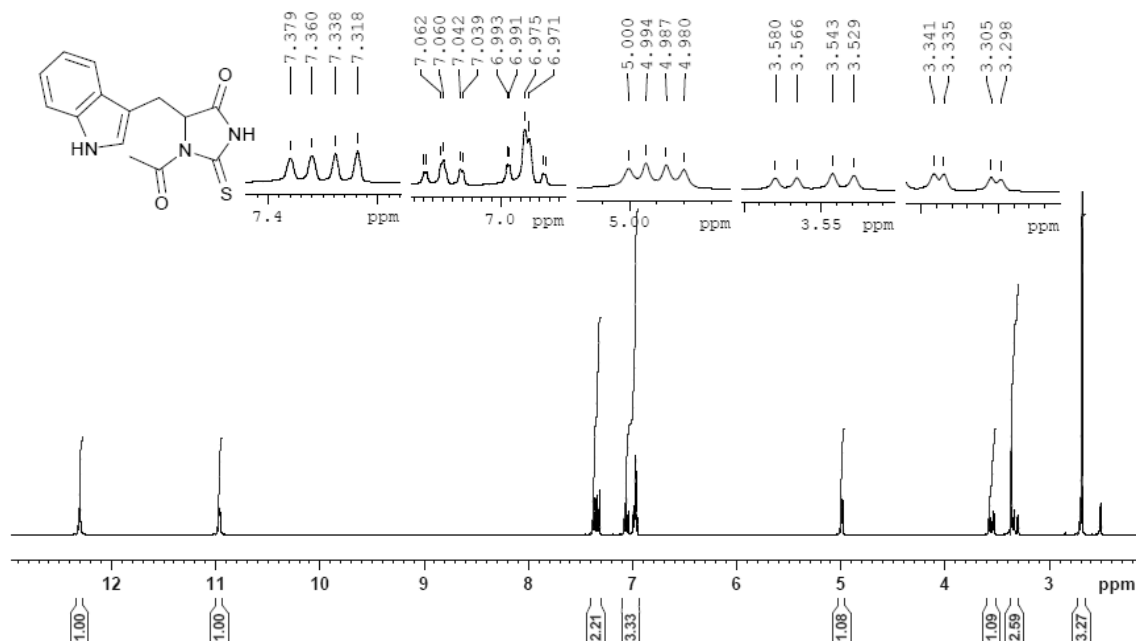


Figura 76. Espectro de RMN de ¹H de 6m (400,13 MHz) em DMSO-*d*₆.

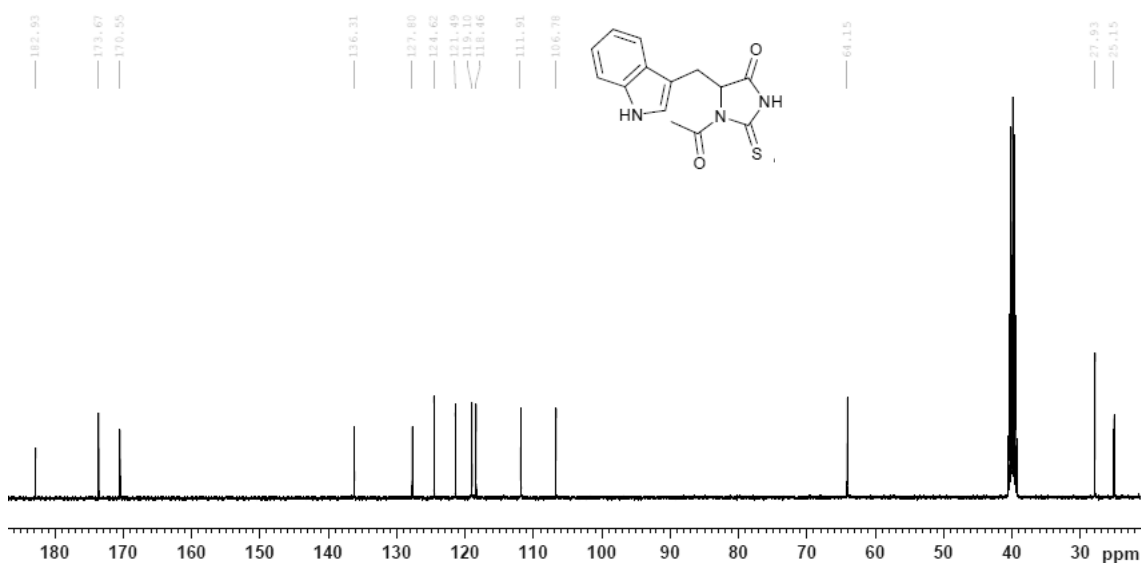


Figura 77. Espectro de RMN de ¹³C de 6m (100,61 MHz) DMSO-*d*₆

5-((1H-indol-3-il)metil)-1-acetil-2-tioxoimidazolidin-4-ona (6m). Rendimento 218,68 mg (57%); sólido amarelo; pf 163-165°C; RMN de ¹H (400,13 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2,68 (s, 3H), 3,33 (dd, J= 2,51-14,78 Hz, 2H), 3,55 (dd, J= 5,63-14,78 Hz, 1H), 4,99 (dd, J= 2,56-5,52 Hz, 1H), 6,95-7,08 (m, 3H), 7,35 (dd, 7,67-16,32 Hz, 2H), 10,97 (s, 1H), 12,30 (s, 1H); RMN de ¹³C (100,61 MHz, DMSO-*d*₆) δ 27,93 (CH₃), 64,14 (CH₂), 106,78 (CH), 111,91 (CH), 118,46 (CH), 119,09 (CH), 121,49 (CH), 124,62, 127,80 (C), 136,31 (C), 170,54 (C=O), 173,67 (C=O), 182,92 (C=S).

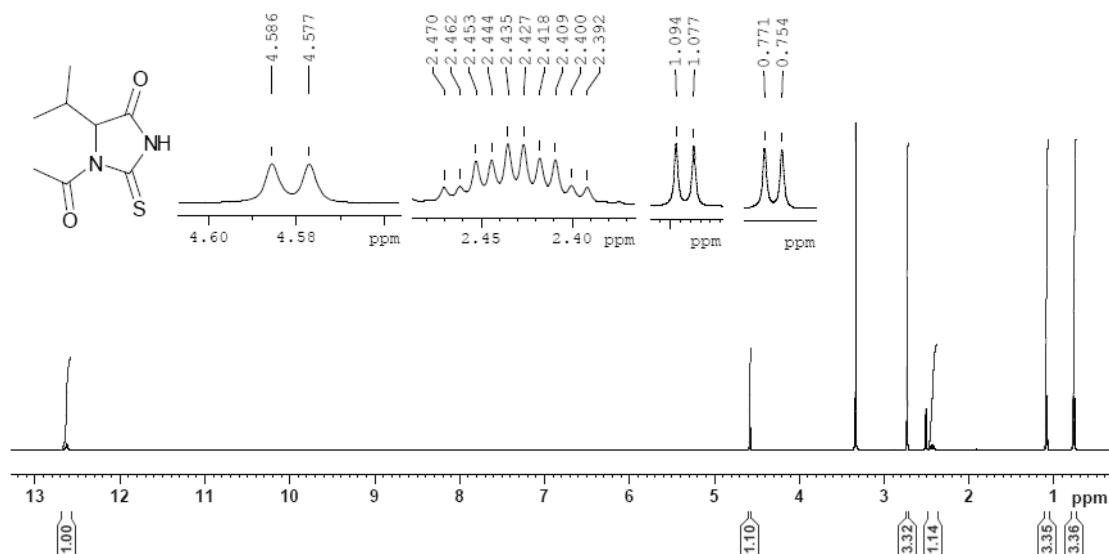


Figura 78. Espectro de RMN de ^1H de 6n (400,13 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.

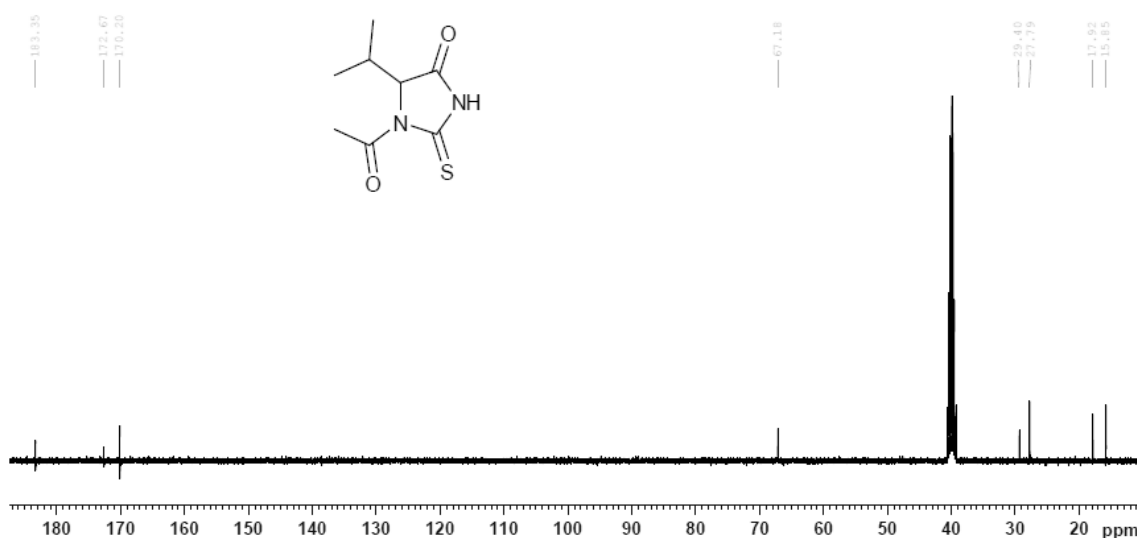


Figura 79. Espectro de RMN de ^{13}C de 6n (100,61 MHz) $\text{DMSO-}d_6$

1-acetil-5-isopropil-2-tioxoimidazolidin-4-ona (6n). Rendimento 111,20 mg (42%); sólido branco; pf 100-103°C; RMN de ^1H (400,13 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 0,76 (d, $J= 6,92$ Hz, 3H), 1,08 (d, $J= 7,04$ Hz, 3H), 2,39-2,47 (m, 1H), 2,73 (s, 3H), 4,58 (d, $J= 3,40$ Hz, 1H), 12,63 (br, 1H); RMN de ^{13}C (100,61 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 15,84 (CH_3), 17,92 (CH_3), 27,78 (CH_3), 29,39 (CH), 67,18 (CH), 170,19 (C=O), 172,67 (C=O), 183,34 (C=S).

APÊNDICE 03

Cópias dos Espectros DOSY

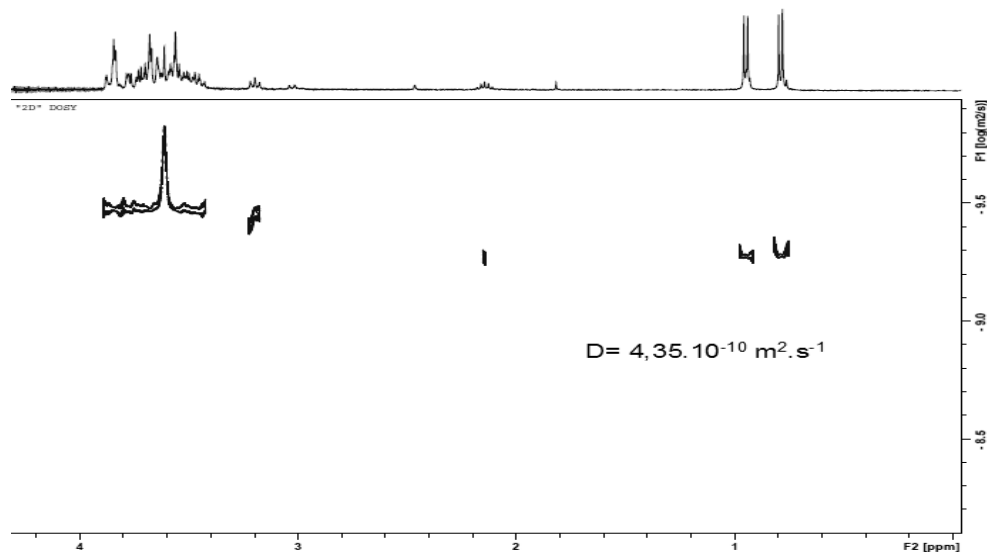


Figura 80. Pseudo 2D DOSY de **5n** com **UCE**, L/E = 100, solução de **5n** (4 mM) com **UCE** (0,04 mM).

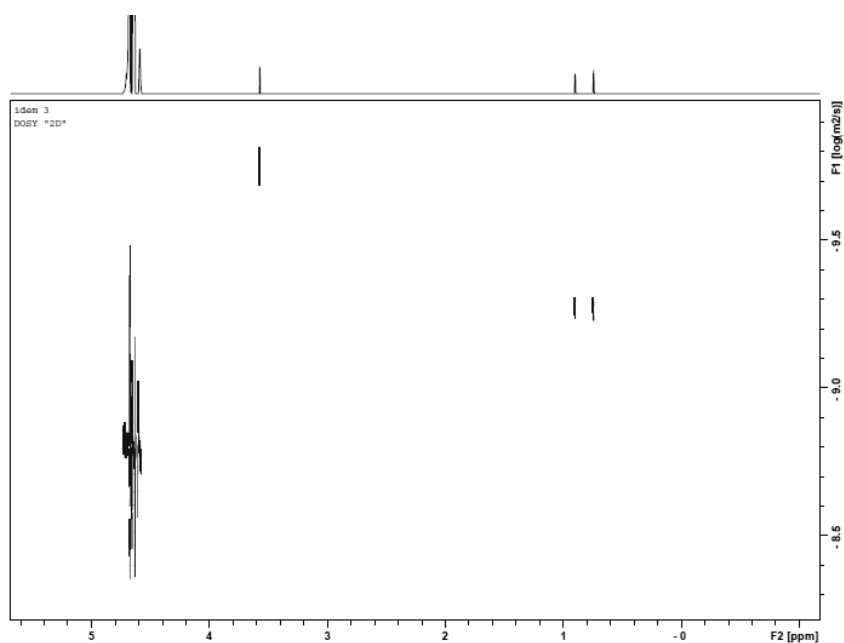


Figura 81. Pseudo 2D DOSY de **5n** com **UCE**, L/E = 80, solução de **5n** (3,2 mM) com **UCE** (0,04 mM).

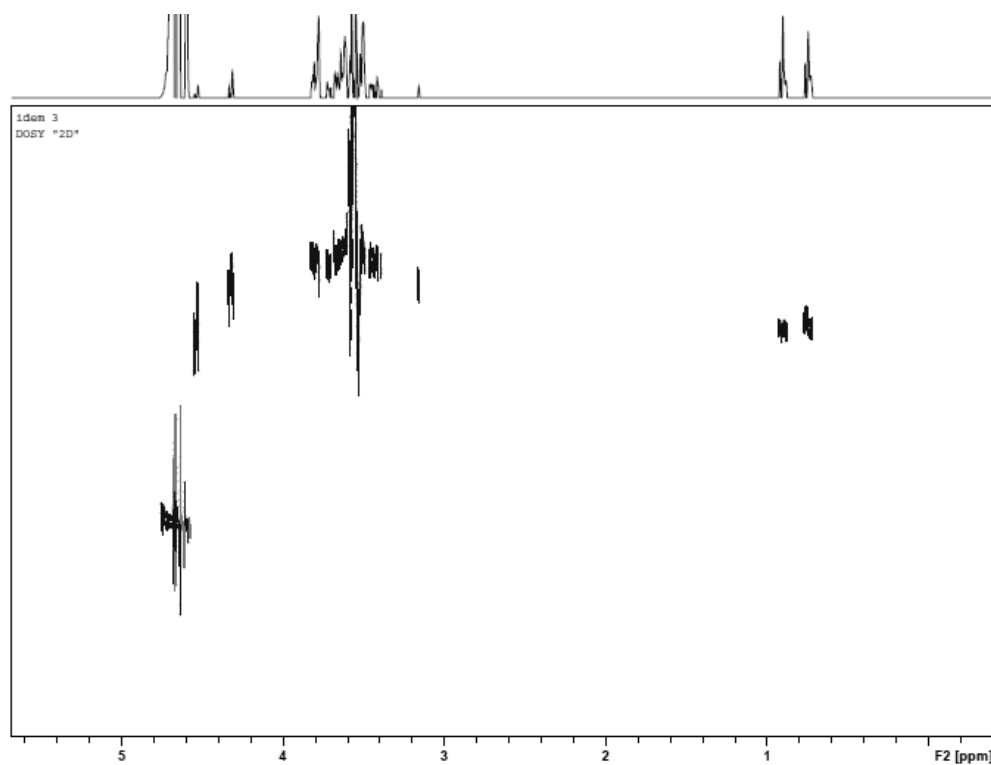


Figura 82. Pseudo 2D DOSY de **5n** com **UCE**, L/E = 60, solução de **5n** (2,4 mM) com **UCE** (0,04 mM).

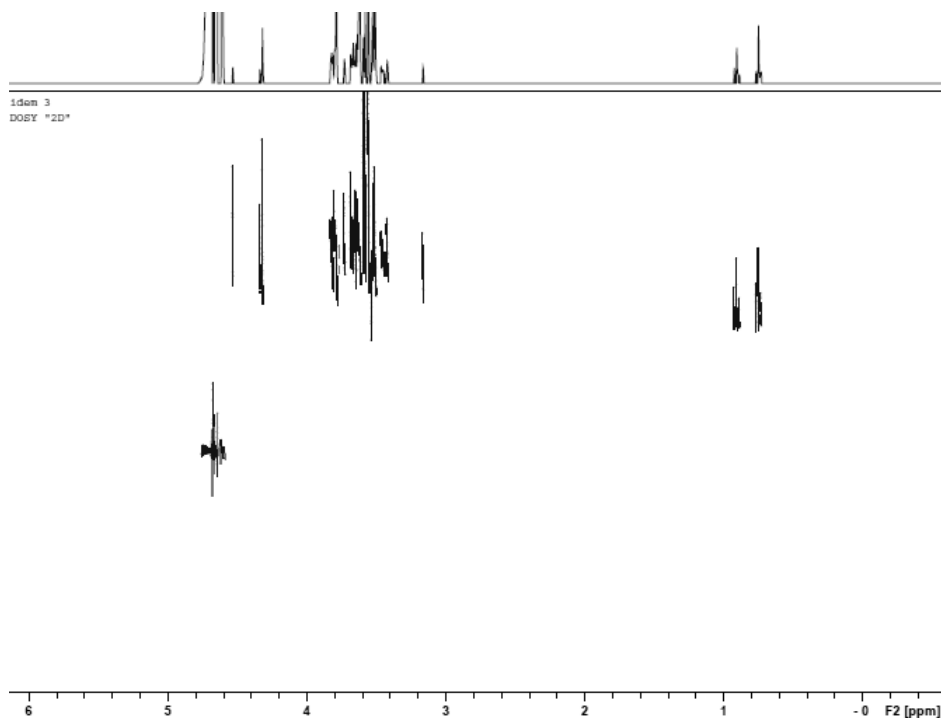


Figura 83. Pseudo 2D DOSY de **5n** com **UCE**, L/E = 40, solução de **5n** (1,6 mM) com **UCE** (0,04 mM).

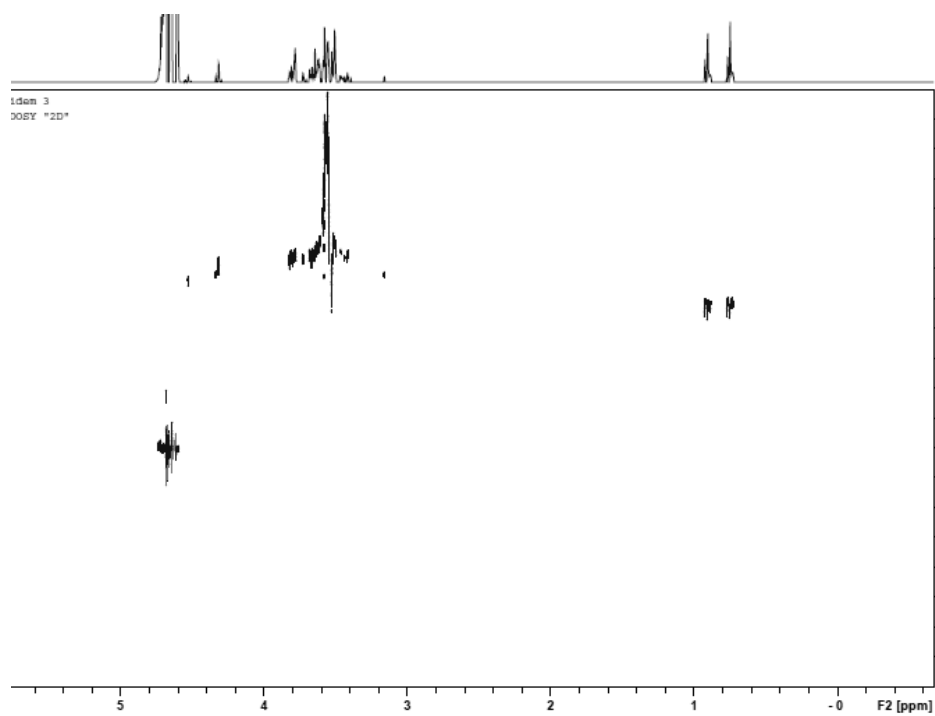


Figura 84. Pseudo 2D DOSY de **5n** com **UCE**, L/E = 20, solução de **5n** (0,86 mM) com **UCE** (0,04 mM).

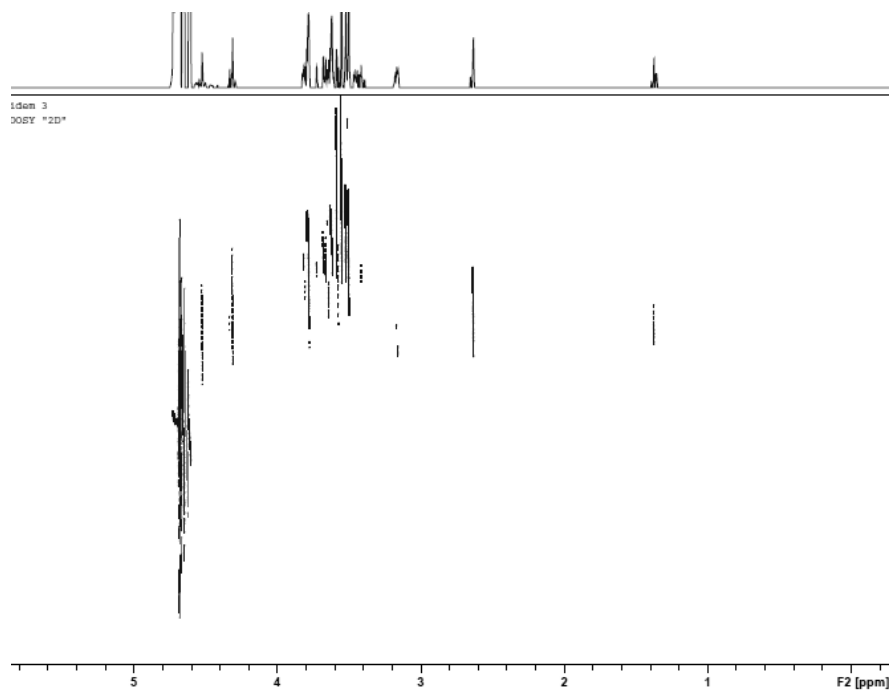


Figura 85. Pseudo 2D DOSY de **6a** com **UCE**, L/E = 100, solução de **6a** (4,0 mM) com **UCE** (0,04 mM).

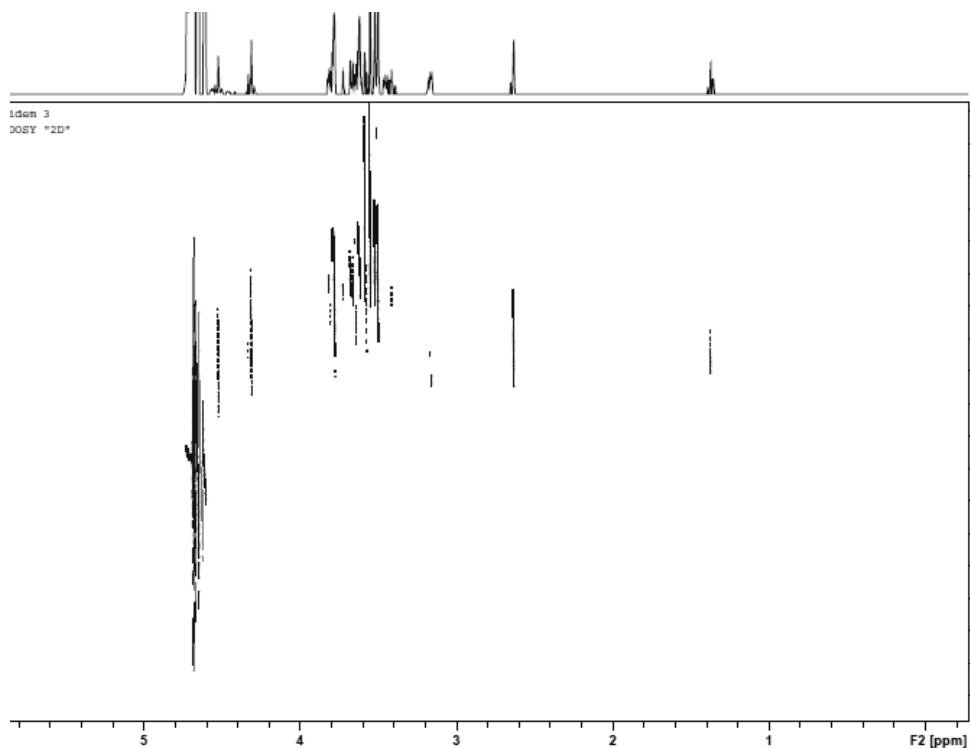


Figura 86. Pseudo 2D DOSY de **6a** com **UCE**, L/E = 80, solução de **6a** (3,2 mM) com **UCE** (0,04 mM).

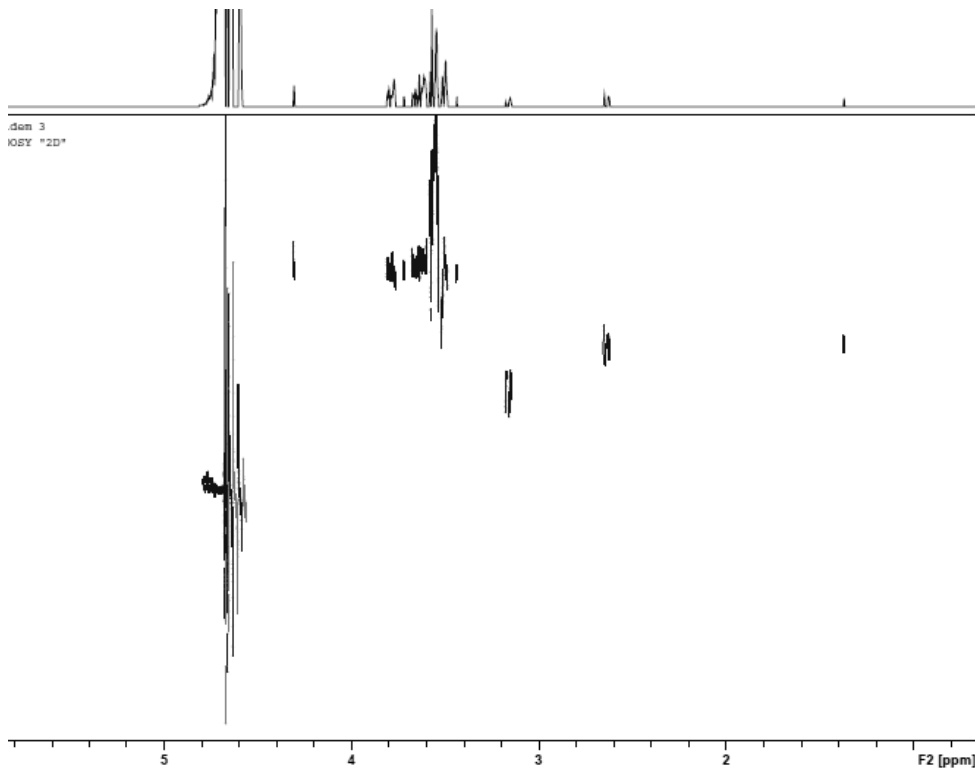


Figura 87. Pseudo 2D DOSY de **6a** com **UCE**, L/E = 60, solução de **6a** (2,4 mM) com **UCE** (0,04 mM).

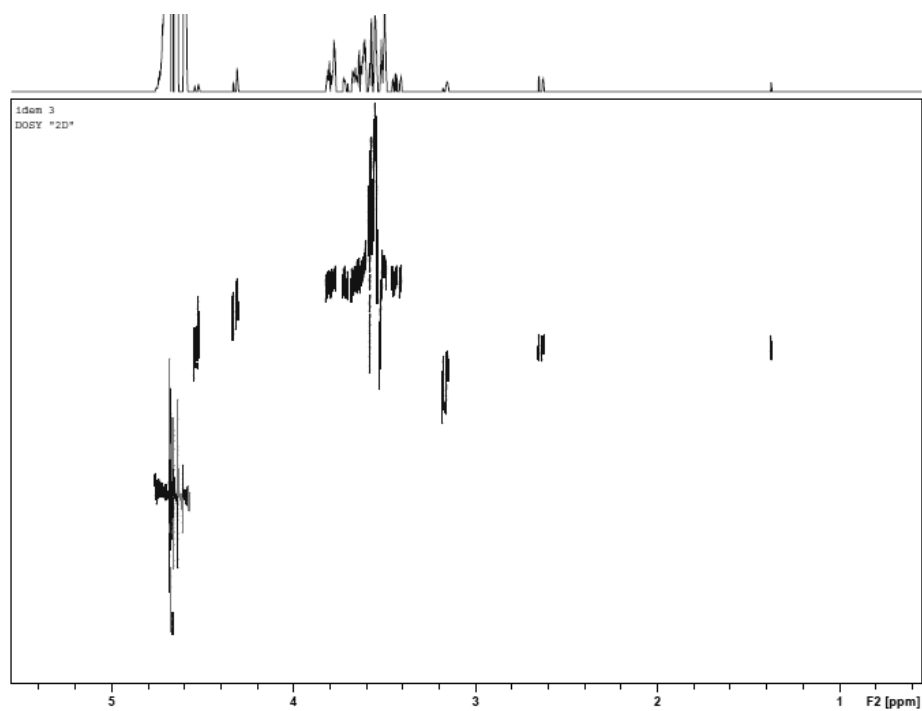


Figura 88. Pseudo 2D DOSY de **6a** com **UCE**, L/E = 40, solução de **6a** (1,6 mM) com **UCE** (0,04 mM).

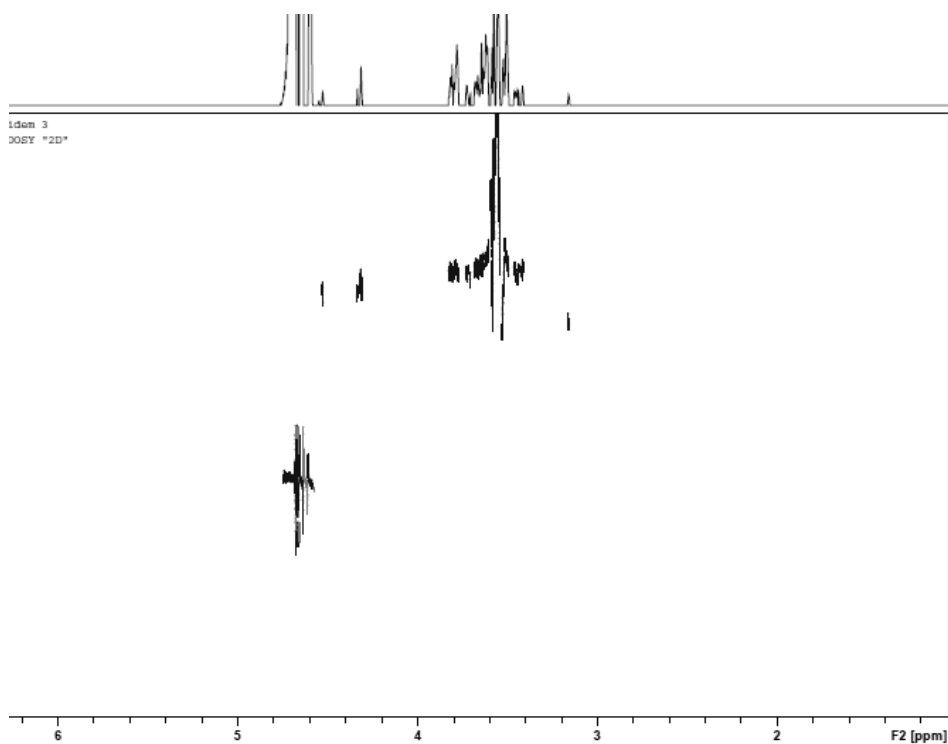


Figura 89. Pseudo 2D DOSY de **6a** com **UCE**, L/E = 20, solução de **6a** (0,8 mM) com **UCE** (0,04 mM).

APÊNDICE 04

Gráficos de cinética da atividade antioxidante

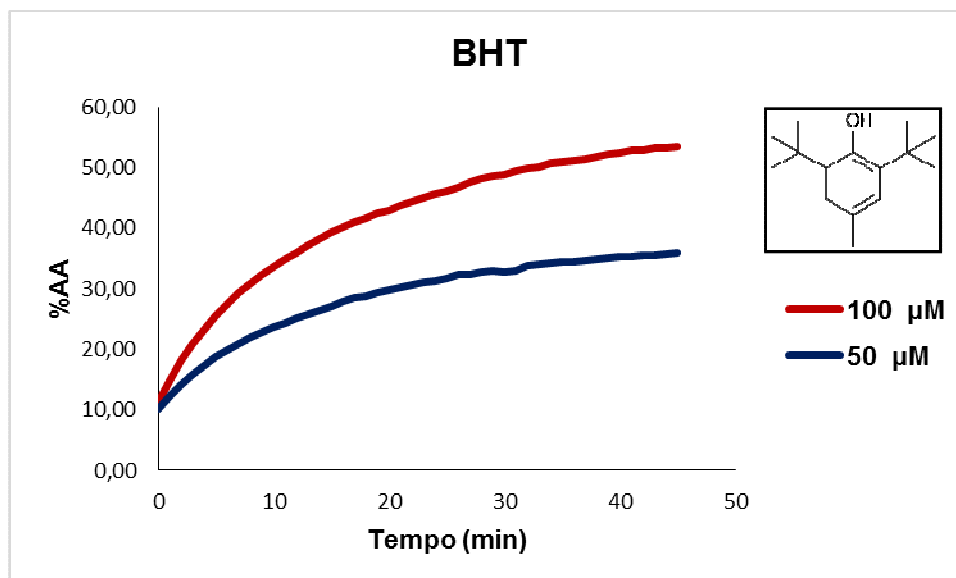


Figura 90. Cinética de reação para padrão BHT nas concentrações de 100 e 50 µM no período de 60 min.

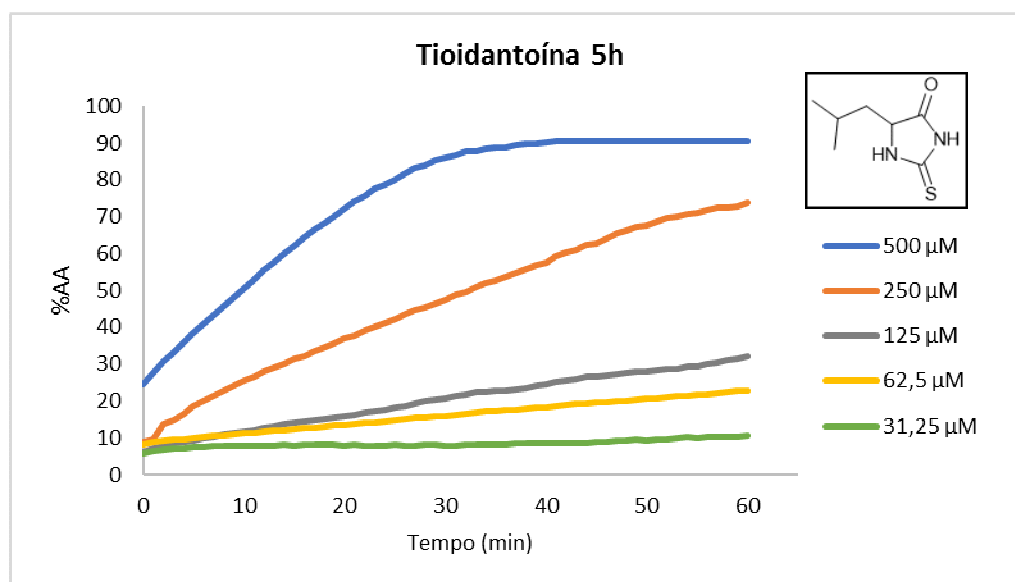


Figura 91. Cinética de reação para 5h nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µM no período de 60 min.

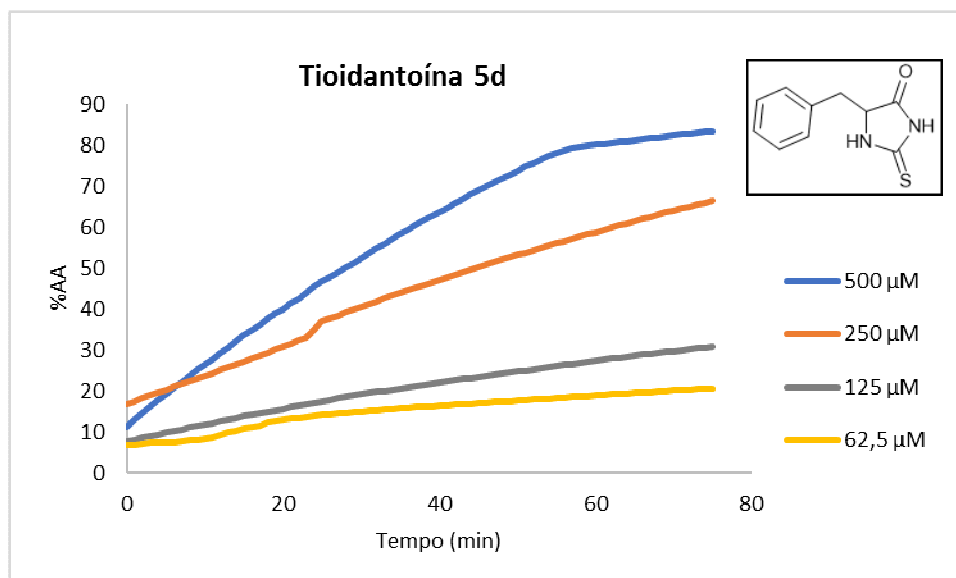


Figura 92. Cinética de reação para **5d** nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 μM no período de 75 min.

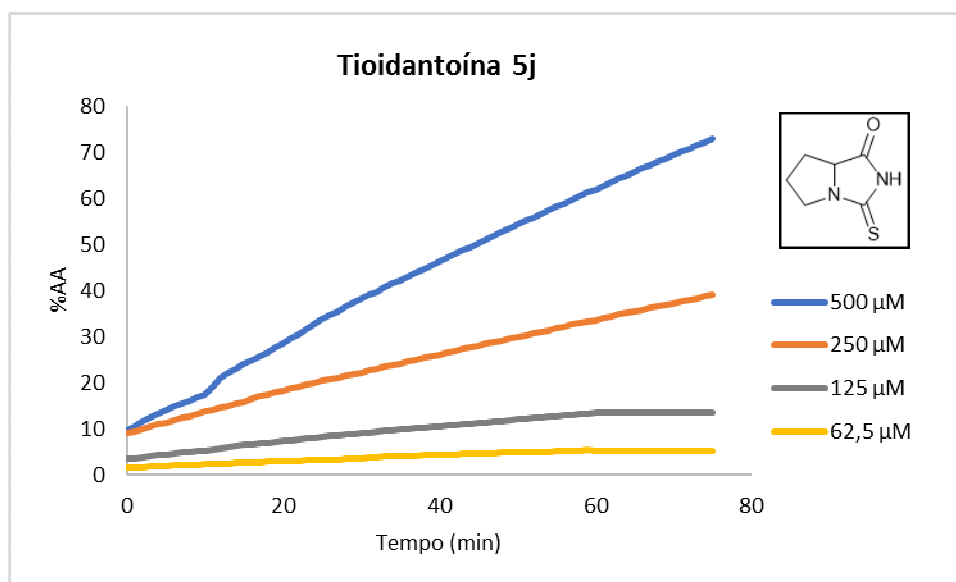


Figura 93. Cinética de reação para **5j** nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 μM no período de 75 min.

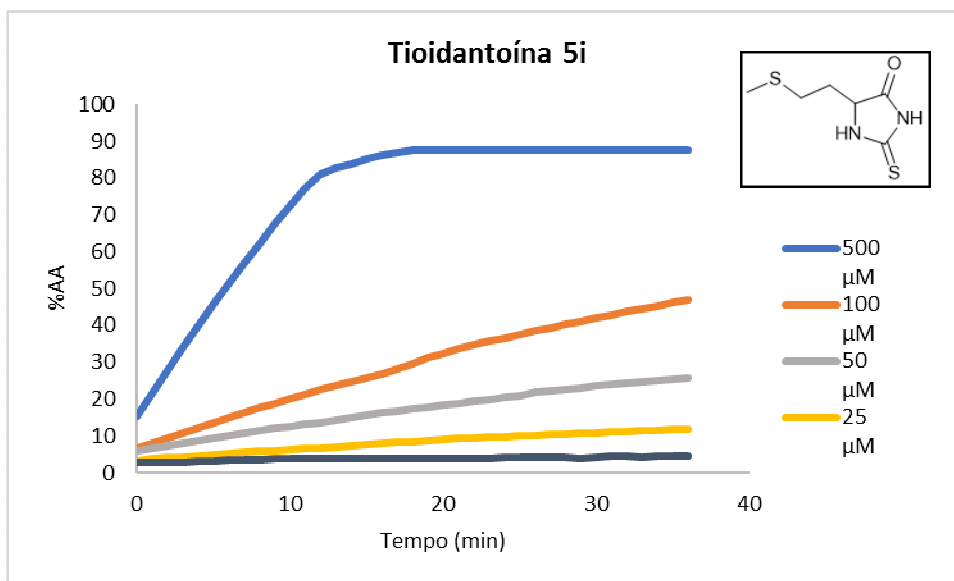


Figura 94. Cinética de reação para **5i** nas concentrações de 500, 100, 50 e 25 μM no período de 35 min.

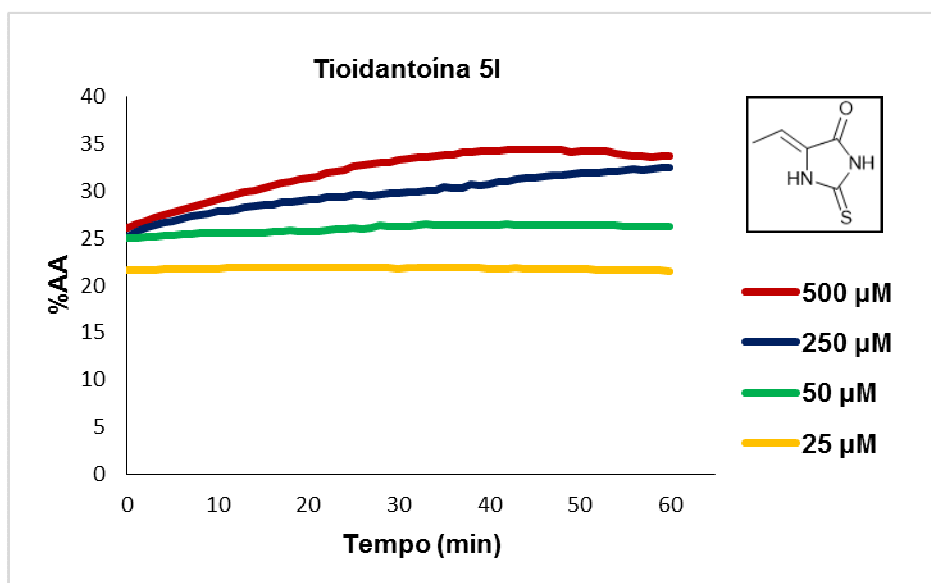


Figura 95. Cinética de reação para **5l** nas concentrações de 500, 250, 50 e 25 μM no período de 60 min.

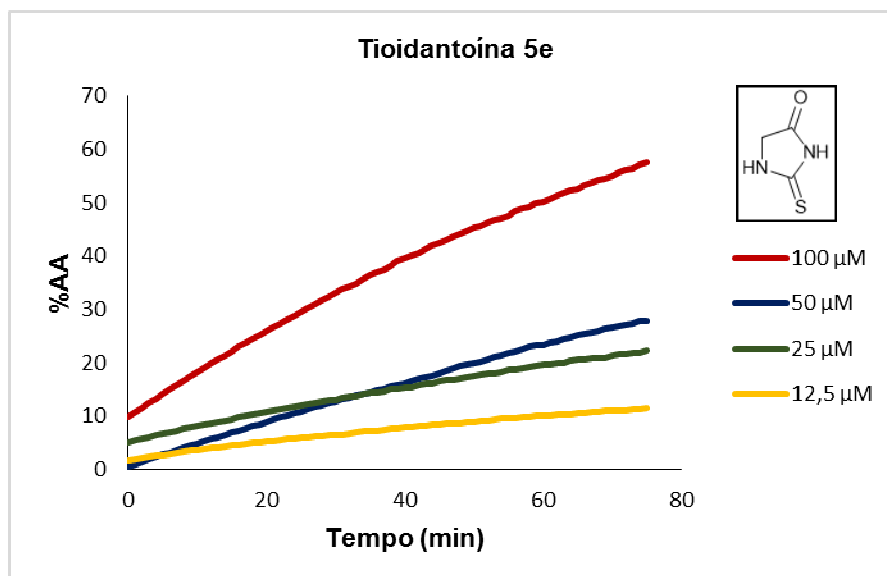


Figura 96. Cinética de reação para **5e** nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 μM no período de 75 min.

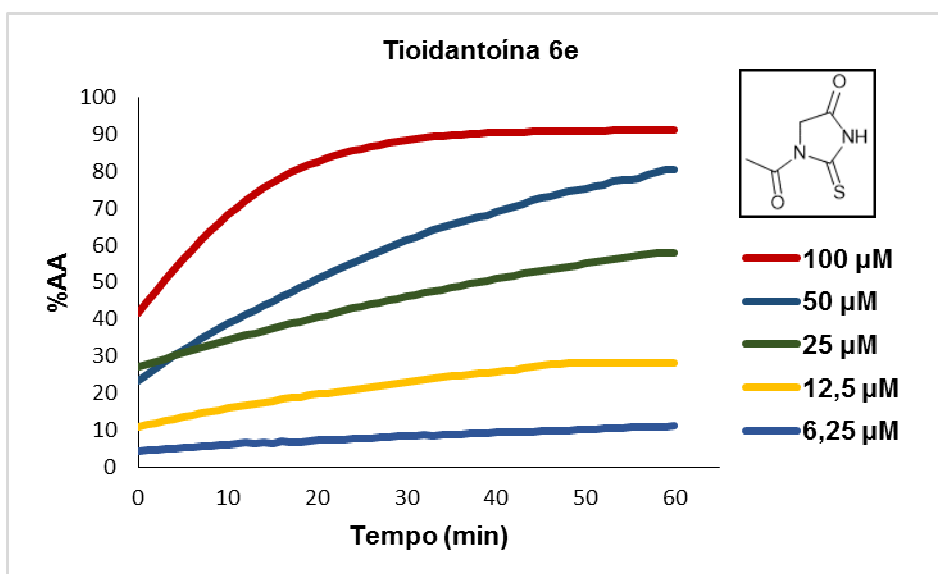


Figura 97. Cinética de reação para **4e** nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 μM no período de 60 min.

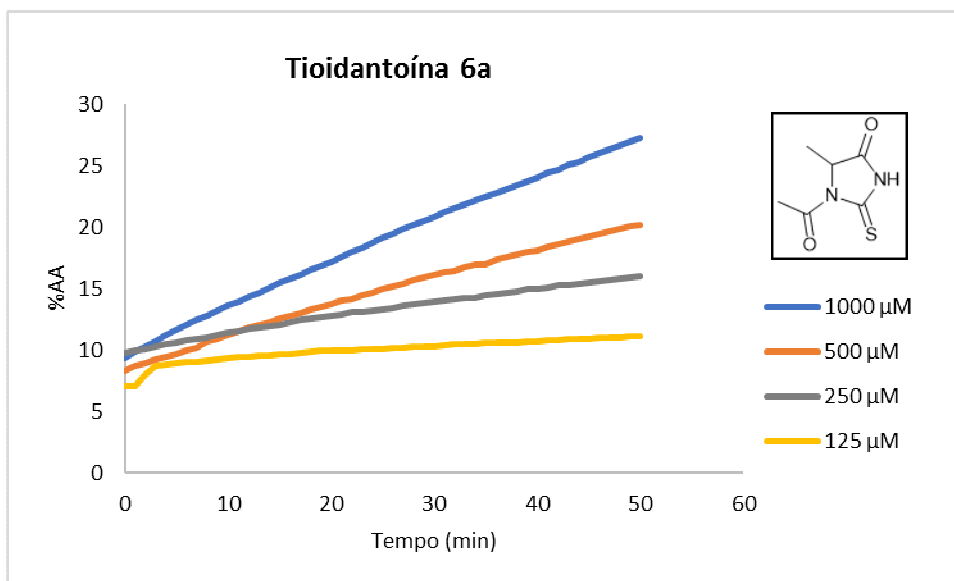


Figura 98. Cinética de reação para 6a nas concentrações de 1000, 500, 250, 125 μM no período de 50 min.

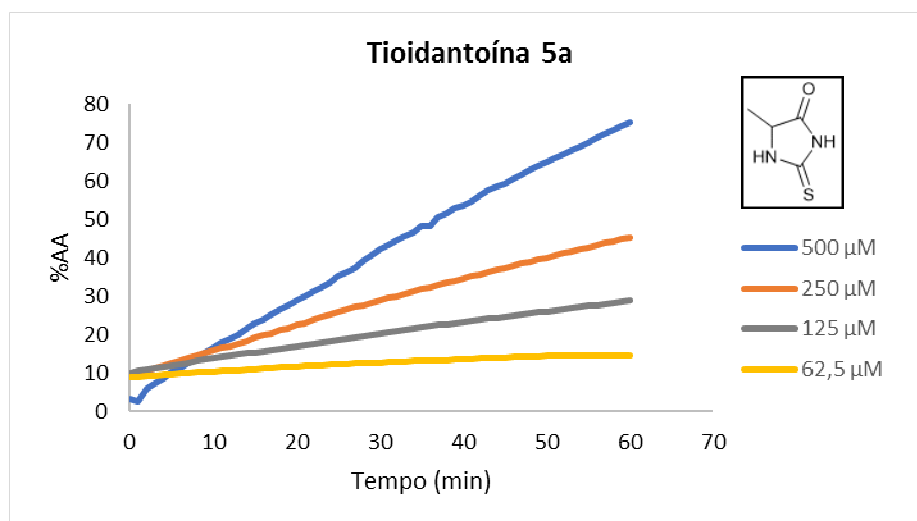


Figura 99. Cinética de reação para 5a nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 μM no período de 60 min.

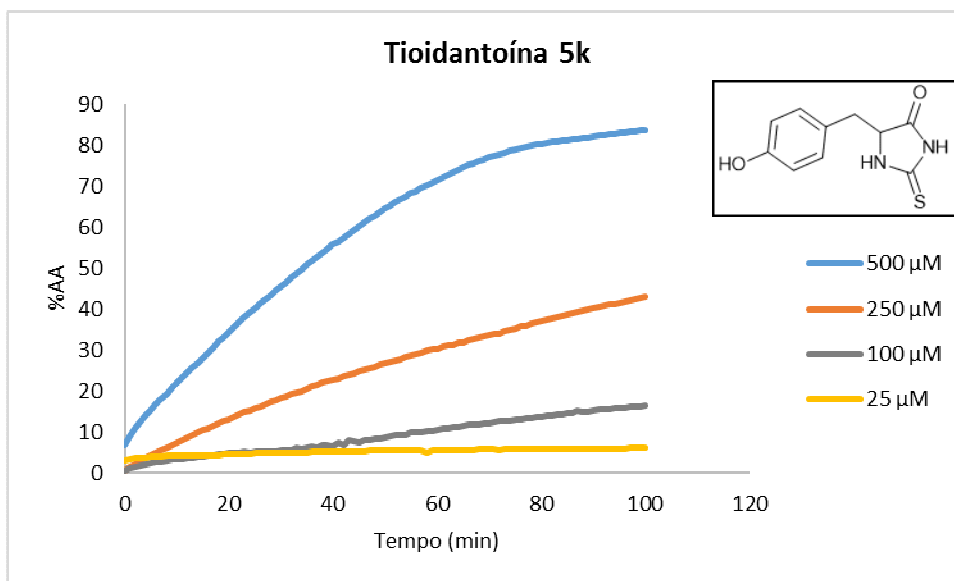


Figura 100. Cinética de reação para **5k** nas concentrações de 500, 250, 100 e 25 μM no período de 100 min.

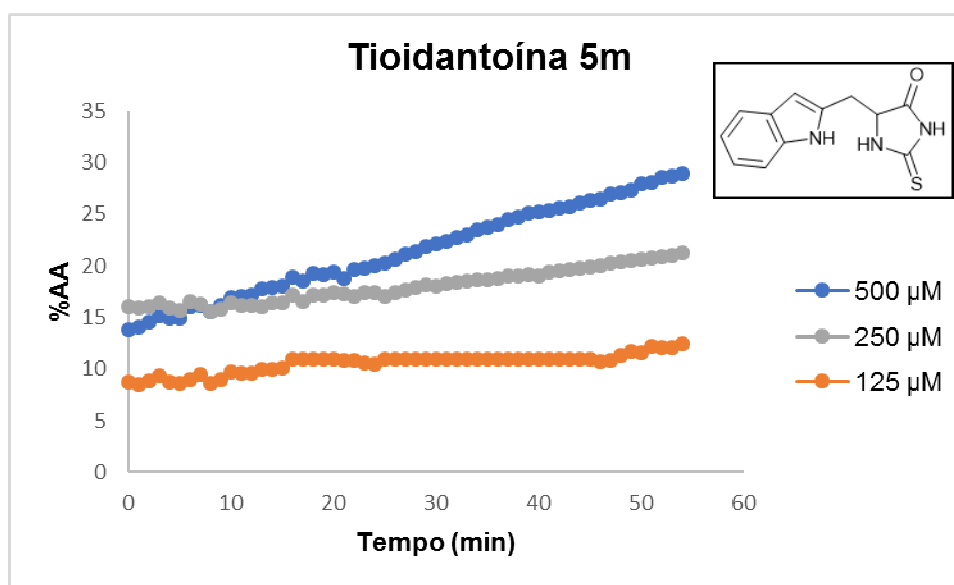


Figura 101. Cinética de reação para **5m** nas concentrações de 500, 250 e 125 μM no período de 55 min.

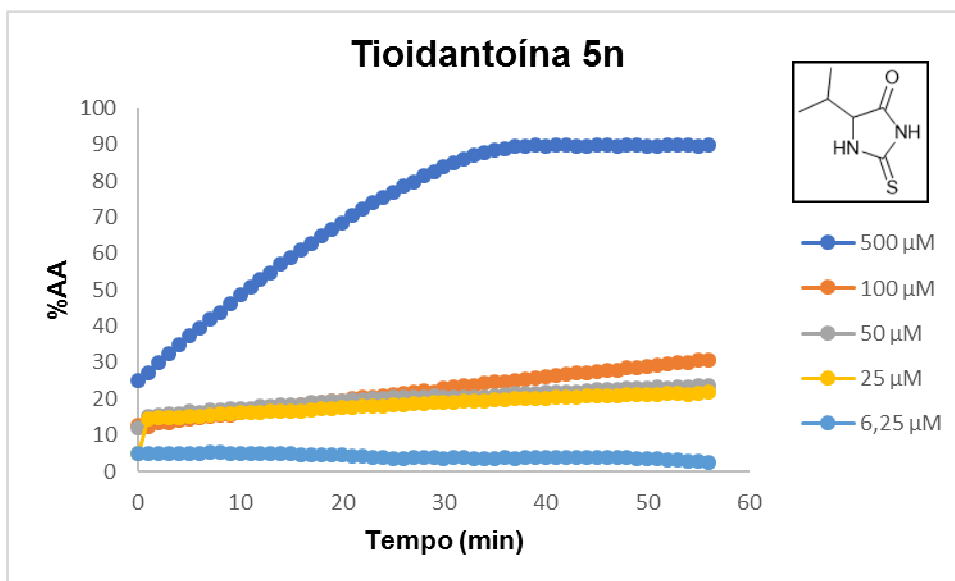


Figura 102. Cinética de reação para **5n** nas concentrações de 500, 100, 50, 25 e 6,25 μM no período de 55 min.

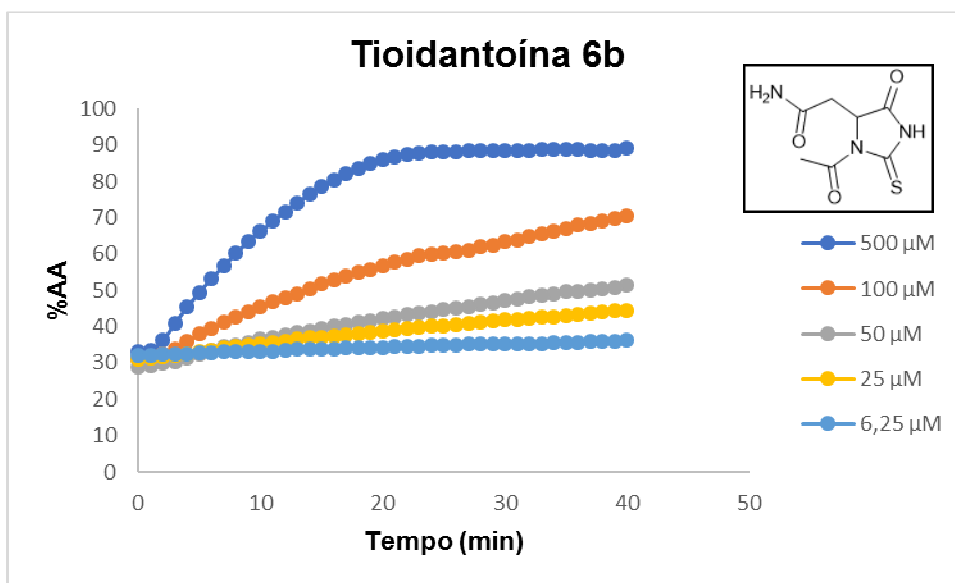


Figura 103. Cinética de reação para **6b** nas concentrações de 500, 100, 50, 25 e 6,25 μM no período de 40 min.

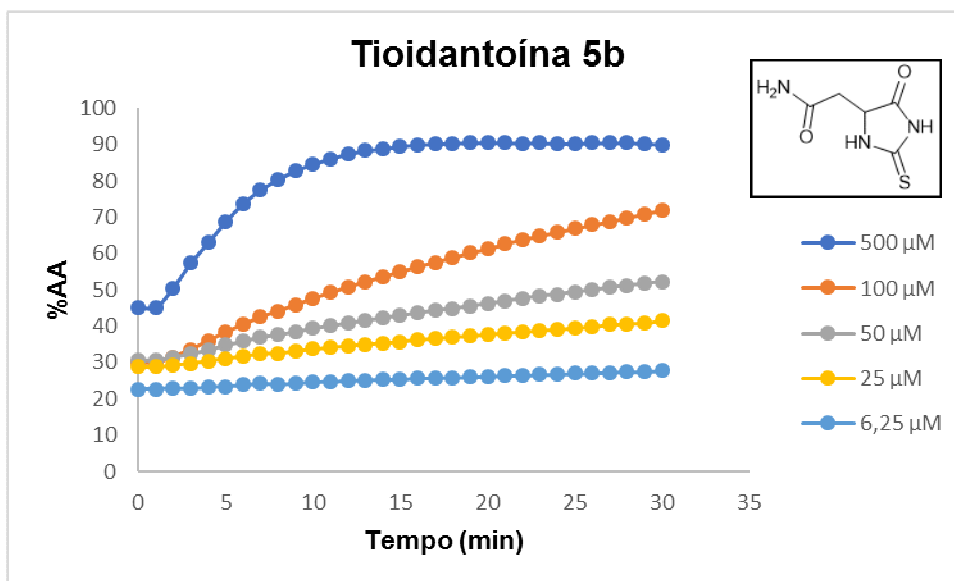


Figura 104. Cinética de reação para **6b** nas concentrações de 500, 100, 50, 25 e 6,25 μM no período de 30 min.

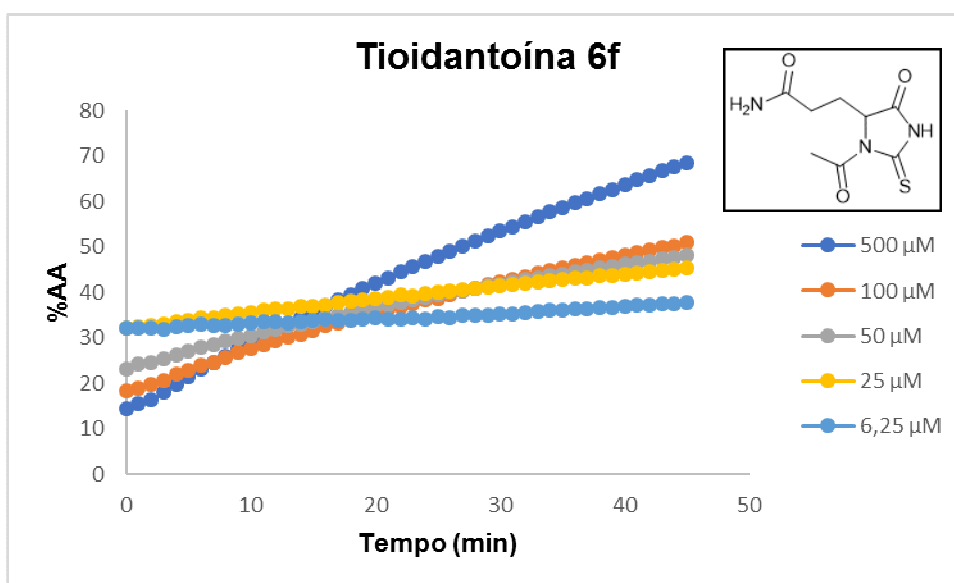


Figura 105. Cinética de reação para **6f** nas concentrações de 500, 100, 50, 25 e 6,25 μM no período de 45 min.

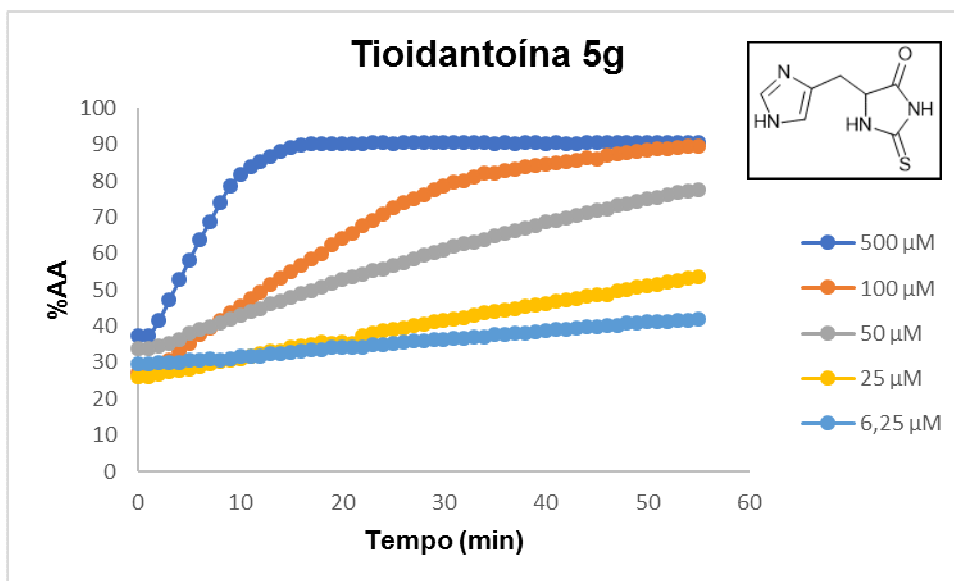


Figura 106. Cinética de reação para **5g** nas concentrações de 500, 100, 50, 25 e 6,25 μM no período de 55 min.

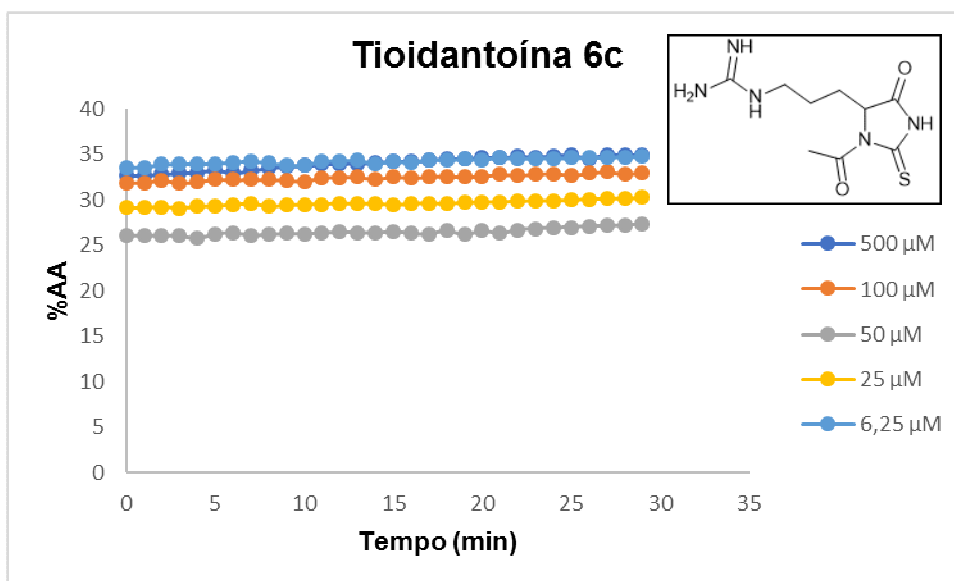


Figura 107. Cinética de reação para **6c** nas concentrações de 500, 100, 50, 25 e 6,25 μM no período de 30 min.

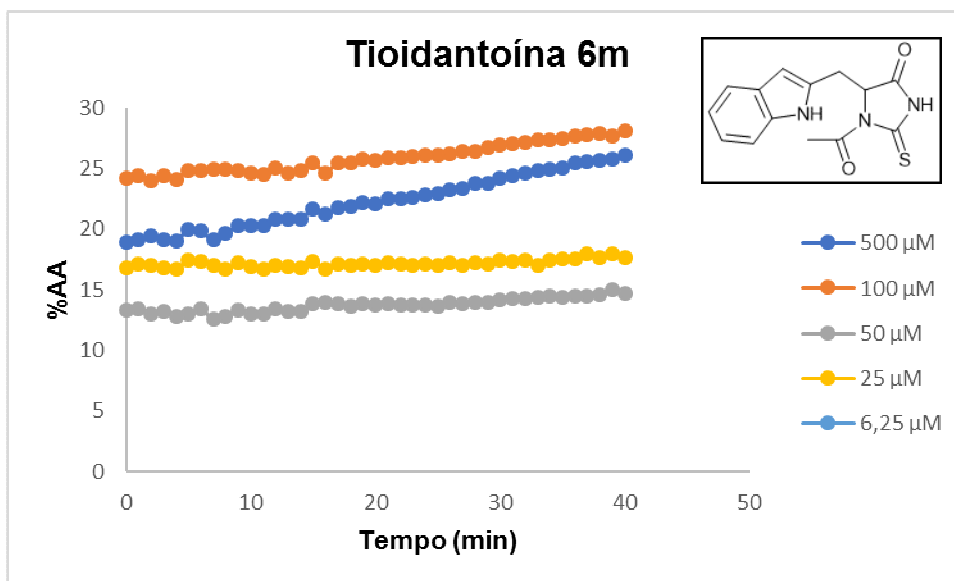


Figura 108. Cinética de reação para **6m** nas concentrações de 500, 100, 50, 25 e 6,25 μM no período de 40 min.

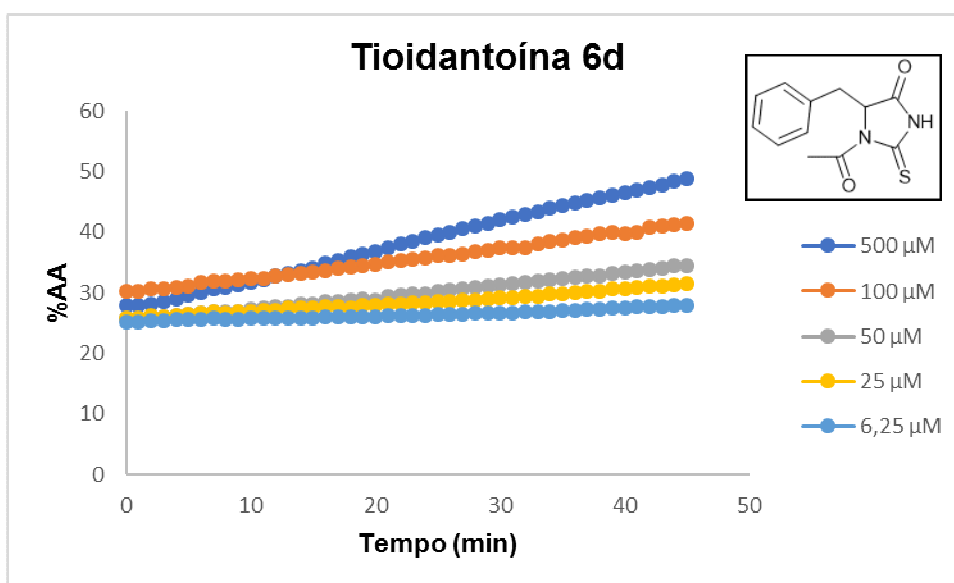


Figura 109. Cinética de reação para **6d** nas concentrações de 500, 100, 50, 25 e 6,25 μM no período de 45 min.

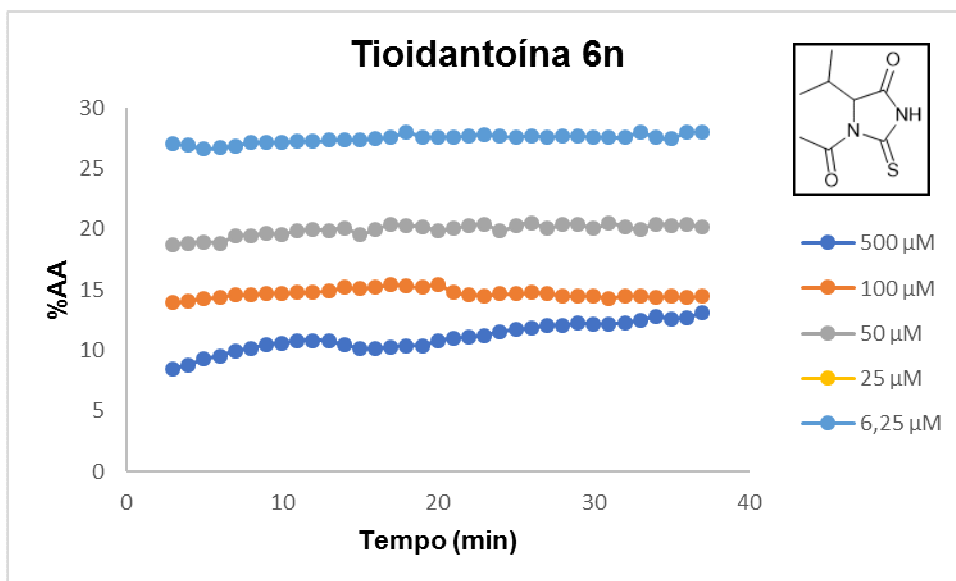


Figura 110. Cinética de reação para **6n** nas concentrações de 500, 100, 50, 25 e 6,25 μM no período de 35 min.

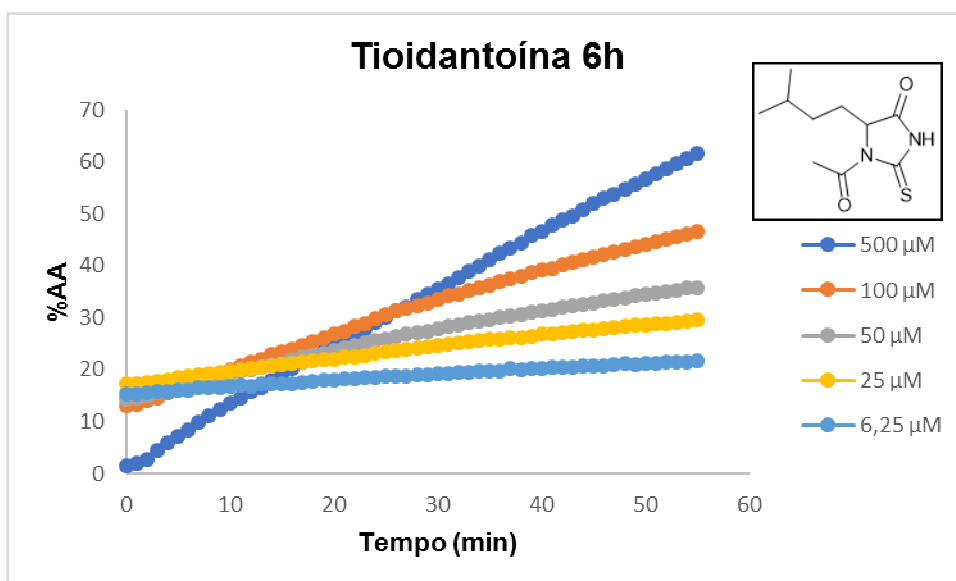


Figura 111. Cinética de reação para **6h** nas concentrações de 500, 100, 50, 25 e 6,25 μM no período de 55 min.

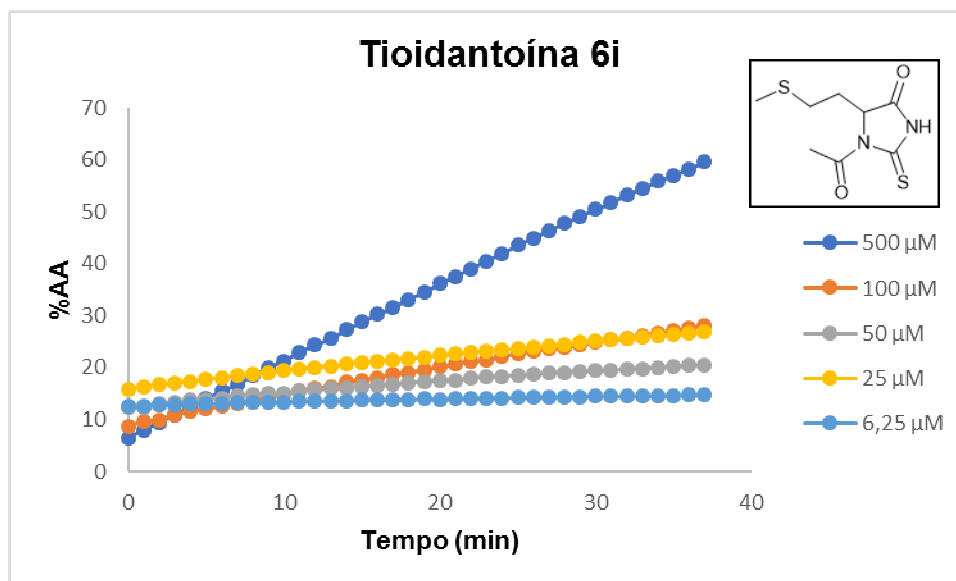


Figura 112. Cinética de reação para **6i** nas concentrações de 500, 100, 50, 25 e 6,25 μM no período de 35 min.

APÊNDICE 05

Gráficos de atividade leishmanicida

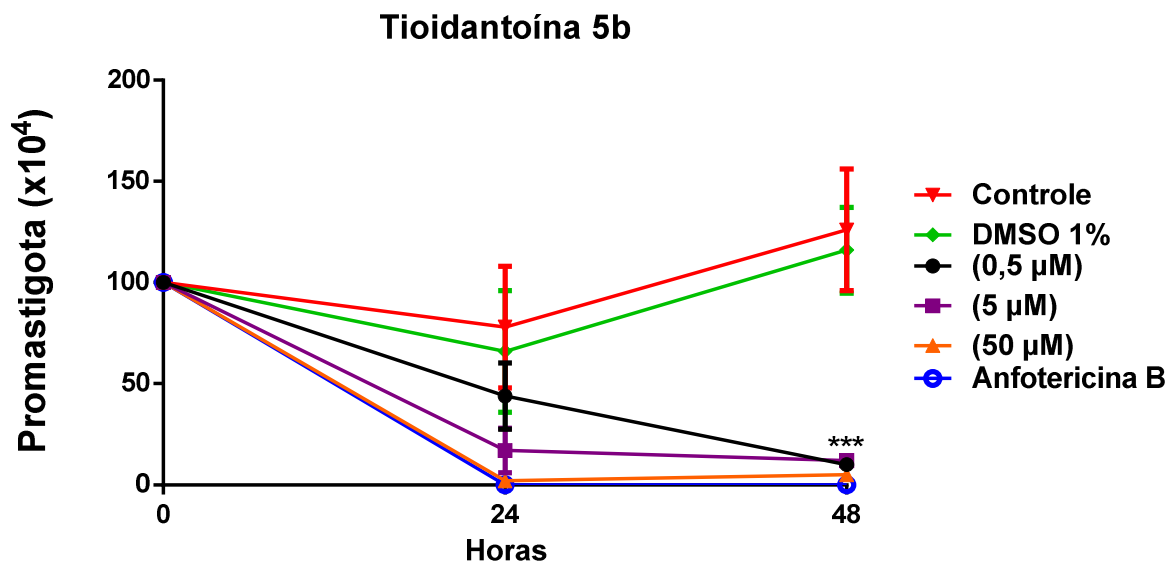


Figura 113. Valores de inibição de 5b frente às formas promastigota de *L. amazonensis* por 24 e 48 horas (** $p < 0.0003$).

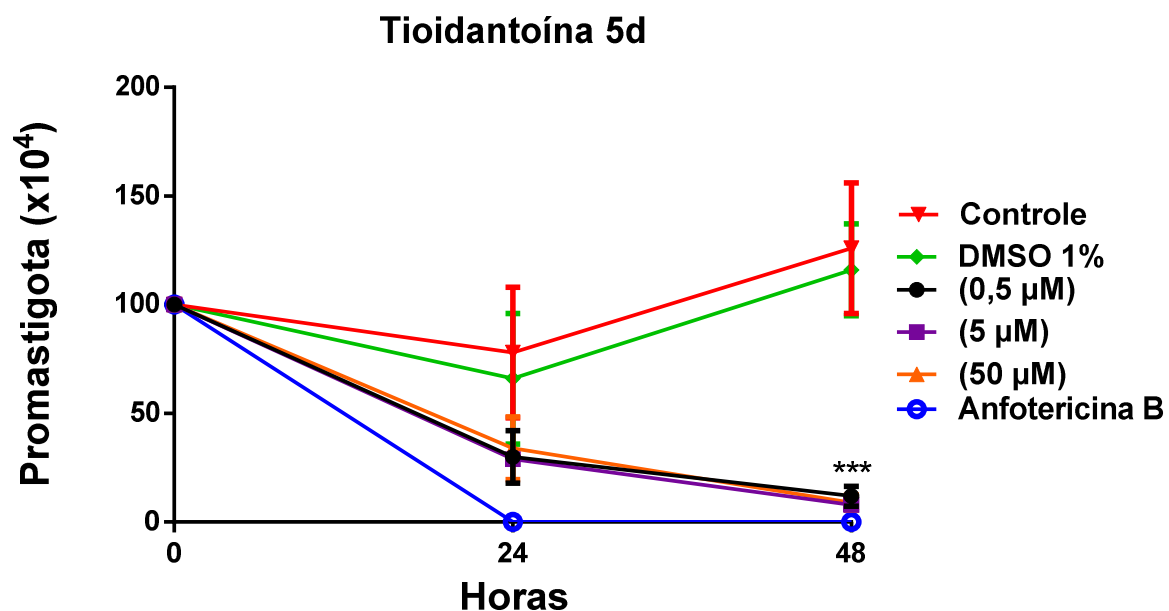


Figura 114. Valores de inibição de 5d frente às formas promastigota de *L. amazonensis* por 24 e 48 horas (** $p < 0.0003$).

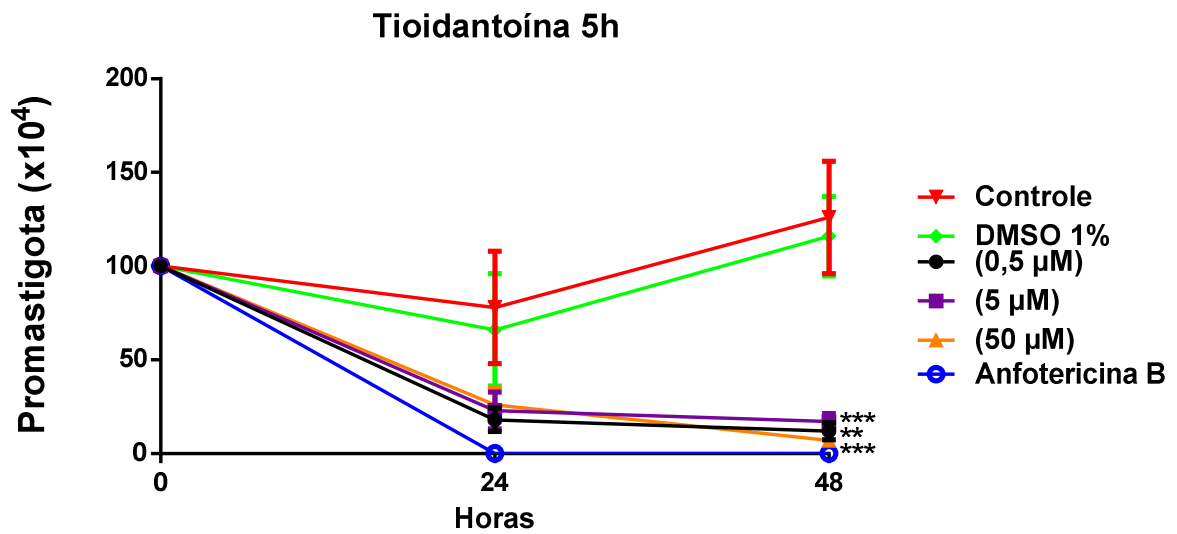


Figura 115. Valores de inibição de 5h frente às formas promastigota de *L. amazonensis* por 24 e 48 horas (** $p < 0,0001$ e *** $p < 0,0003$).

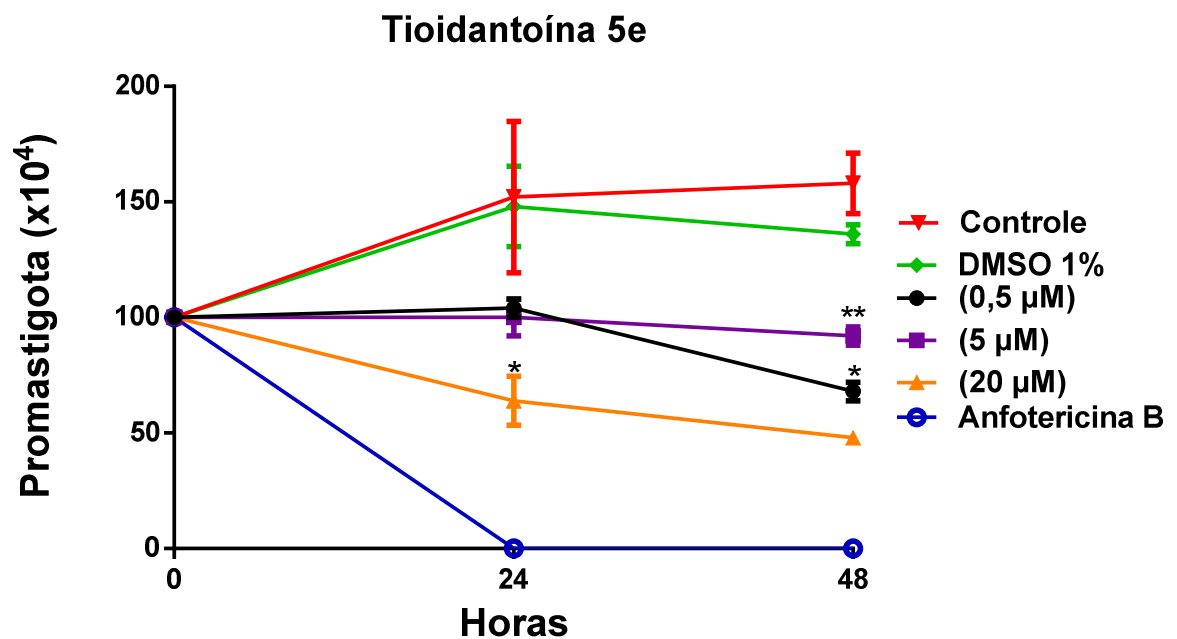


Figura 116. Valores de inibição de 5e frente às formas promastigota de *L. amazonensis* por 24 e 48 horas (* $p < 0,0001$ e ** $p < 0,0005$).

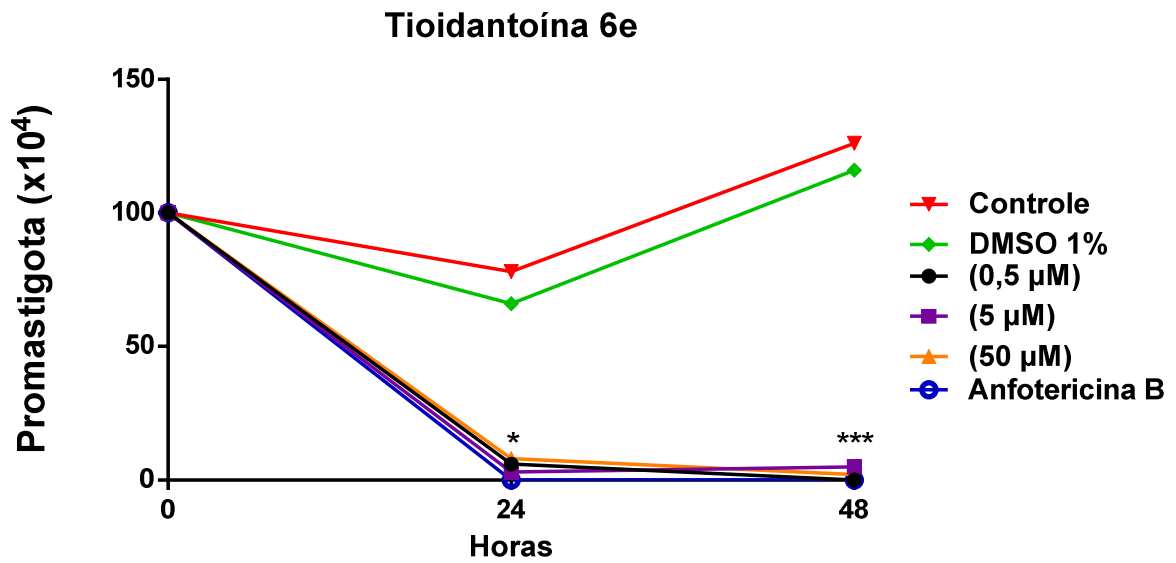


Figura 117. Valores de inibição de 6e frente às formas promastigota de *L. amazonensis* por 24 e 48 horas (* $p < 0,0001$ e *** $p < 0,0003$).

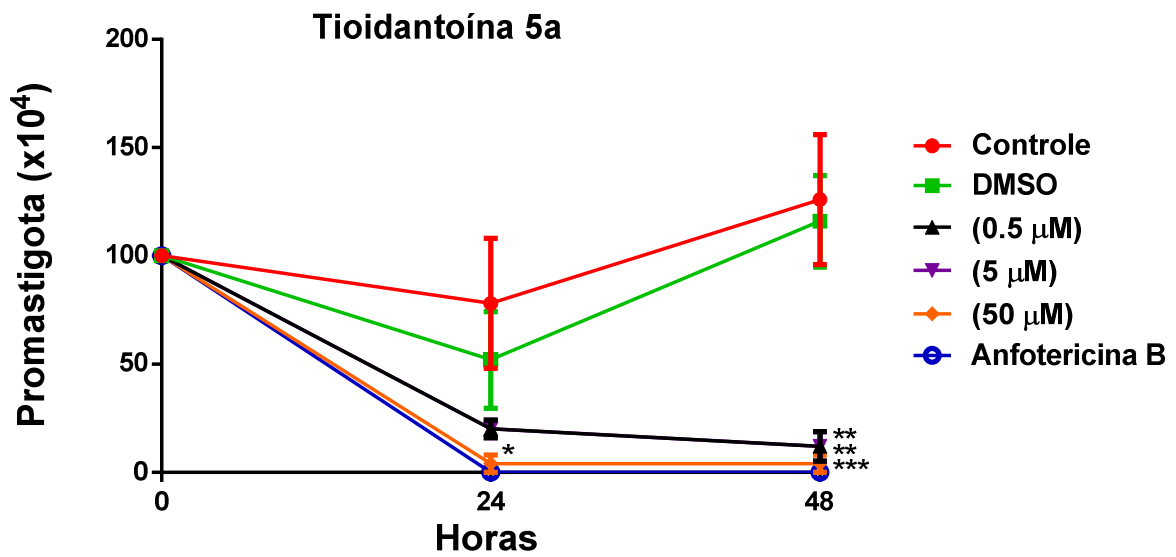


Figura 118. Valores de inibição de 5a frente às formas promastigota de *L. amazonensis* por 24 e 48 horas (* $p < 0,0001$, ** $p < 0,0005$ e *** $p < 0,0003$).

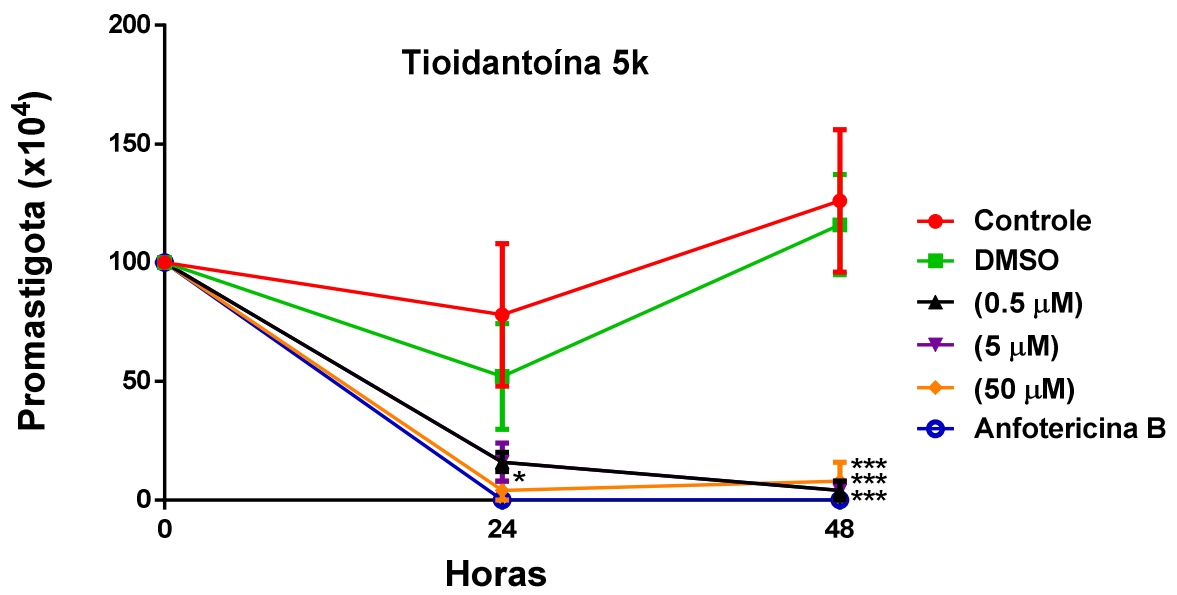


Figura 119. Valores de inibição de 5k frente às formas promastigota de *L. amazonensis* por 24 e 48 horas (** $p < 0.0003$).

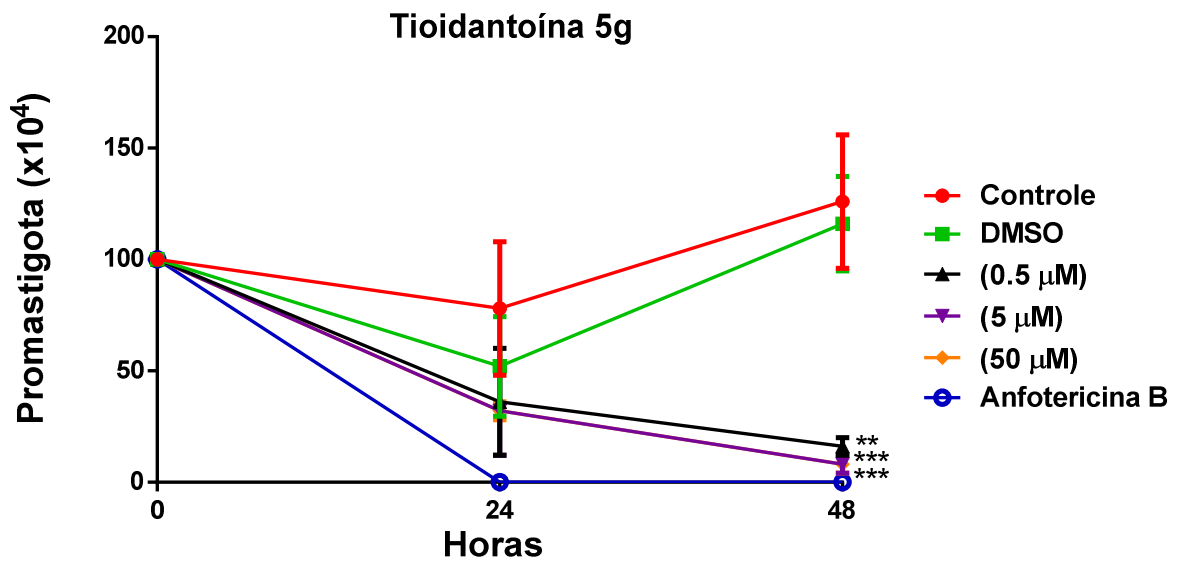


Figura 120. Valores de inibição de 5g frente às formas promastigota de *L. amazonensis* por 24 e 48 horas (** $p < 0.0005$ e *** $p < 0.0003$).

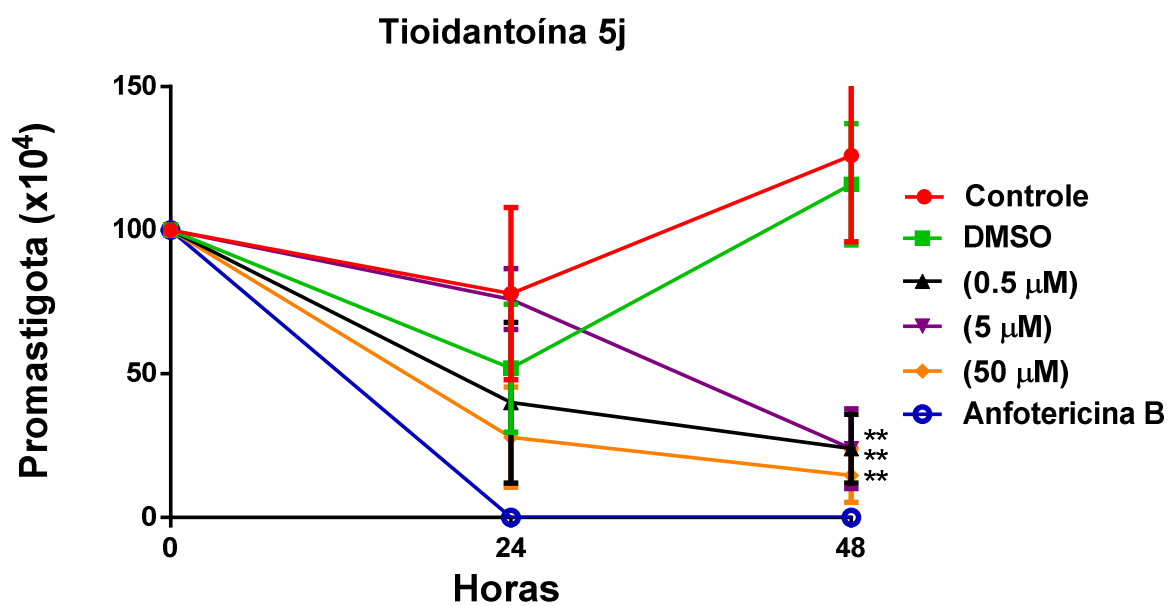


Figura 121. Valores de inibição de 5j frente às formas promastigota de *L. amazonensis* por 24 e 48 horas (** $p < 0.0005$).