



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

TIAGO DE OLIVEIRA BRITO

**BENZOILTIOUREIAS:**  
SÍNTESE, ATIVIDADES ANTIMICOBACTERIANA E  
ANTIUREOLÍTICA E ESTUDO DE INTERAÇÃO COM  
UREASE POR RMN

TIAGO DE OLIVEIRA BRITO

**BENZOILTIOUREIAS:**

SÍNTESE, ATIVIDADES ANTIMICOBACTERIANA E  
ANTIUREOLÍTICA E ESTUDO DE INTERAÇÃO COM  
UREASE POR RMN

Tese apresentada junto à Universidade Estadual de Londrina, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/Unicentro, para a obtenção do título de Doutor em Química.

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

Co-orientador: Prof. Dr. Angelo de Fátima (UFMG).

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Brito, Tiago de Oliveira.

Benzoiltiureias : Síntese, atividades antimicobacteriana e antiureolítica e estudo de interação com urease por rnm / Tiago de Oliveira Brito. - Londrina, 2017.  
286 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Fernando César de Macedo Junior.

Coorientador: Angelo de Fátima .

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Benzoiltiureias - Tese. 2. Antiureolítico - Tese. 3. Inibição da urease - Tese. 4. Ressonância Magnética Nuclear - Tese. I. Macedo Junior, Prof. Dr. Fernando César de. II. Fátima , Angelo de . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

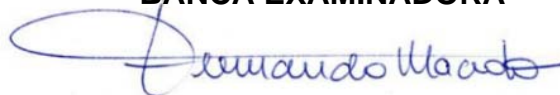
TIAGO DE OLIVEIRA BRITO

**BENZOILTIOUREIAS:**

**SÍNTESE, ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA, ANTIUREOLÍTICA E  
ESTUDO DE INTERAÇÃO COM UREASE POR RMN**

Tese apresentada junto à Universidade Estadual de Londrina, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/Unicentro, para a obtenção do título de Doutor em Química.

**BANCA EXAMINADORA**



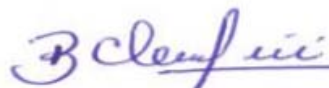
---

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



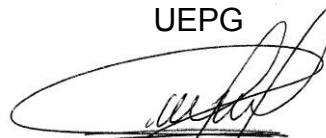
---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anna Paola Butera  
Universidade Estadual de Londrina - UEL



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bárbara Celânia Fiorin  
Universidade Estadual de Ponta Grossa -  
UEPG



---

Prof. Dr. Luís Fernando Cabeça  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -  
UTFPR



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcelle de Lima Ferreira Bispo  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 27 de março de 2017.

Dedico este trabalho à minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Fernando César de Macedo Jr. não só pela orientação neste trabalho, mas sobretudo pela atenção, paciência, profissionalismo e amizade construída durante toda esta jornada.

Ao professor Ângelo de Fátima pela co-orientação e amizade. Agradeço também pela receptividade e acolhimento em minhas idas a Belo Horizonte.

Aos colaboradores: Luzia Valentina Modolo e seus orientandos, responsáveis pelos testes de atividade antiureolítica; Marcelle de Lima Ferreira Bispo, por todo auxílio prestado no planejamento estrutural das benzoiltiureias para os testes antimicobacterianos e pela articulação com os pesquisadores da FIOCRUZ; Maria Cristina da Silva Lourenço pelos ensaios antimicobacterianos.

Aos professores: Antonio Alfaya, Anna Paola, César Andrei, Ieda Scarmínio, Marcelle Bispo, Maria Cristina, Renato Ribeiro e Terezinha de Jesus aos quais sou especialmente grato por participarem de minha formação durante o mestrado e/ou doutorado.

Aos técnicos do Departamento de Química: Dorizete, Mauro, Rogério, Marcia e Ana; em especial ao Jurandir do LP MBA, por todos os auxílios prestados.

A todos os técnicos do Laboratório Multiusuário de Espectroscopia pela aquisição de espectros de RMN e infravermelho. Em especial a Renato, Vanessa e Yasmin pela amizade e colaboração.

A todos os atuais e ex-integrantes do LP MBA que tornaram as horas de bancada mais divertidas e prazerosas, auxiliando e proporcionando boas discussões sobre os mais variados temas. Agradeço em especial aos amigos: Camila, Henrique, Márcio, Ismael, Jéssika, Luís, Priscila, Jonathan, Paula e Simone.

Gostaria de agradecer também a toda minha família, em especial a minha esposa Daniela e minha filha Luiza, meus pais Celestino e Ezilda e meus sogros Augusto e Ivone que de forma indireta foram peças-chave para o desenvolvimento deste trabalho, auxiliando e aconselhando nos momentos difíceis,

e também comemorando juntos pelas conquistas. Meu sincero muito obrigado.

À Capes pela concessão da bolsa de estudos e auxílio PROAP.

Ao CNPq e FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

A todos os integrantes da REDNIU pelo auxílio e realização de análises que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química Associado, UEL-UEPG-Unicento.

Finalmente a todos que fizeram parte desta jornada, meus sinceros agradecimentos. Muito Obrigado.

BRITO, Tiago de Oliveira. **Benzoiltioureias: Síntese, atividades antimicrobacteriana e antiureolítica e estudo de interação com urease por RMN**. 2017. 284f. Tese (Doutorado em Química, Programa de Pós-Graduação em Química Associado, UEL-UEPG-Unicento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

A atividade ureolítica dos solos é uma causa de grandes perdas de fertilizantes a base de ureia, que na presença de ureases é hidrolisada a amônia e dióxido de carbono. Para evitar estas perdas e aumentar a eficiência destes fertilizantes são utilizados inibidores de ureases contidos nas formulações de ureia. Entretanto, os inibidores de ureases utilizados na agricultura são produtos importados que oneram o preço dos fertilizantes a base de ureia. Apesar do protagonismo do Brasil no cenário do agronegócio mundial, nenhum inibidor de ureases foi desenvolvido neste país até o momento. Este trabalho relata a síntese de uma ampla série de benzoiltioureias *N*-substituídas (BTUs), racionalmente planejadas e avaliadas frente seu potencial como inibidores da enzima urease purificada de *Cannavalia ensiformis*, bem como, inibidores da atividade ureolítica de amostras de solo *in natura*. Os ensaios *in vitro* revelaram oito BTUs com níveis de inibição acima de 50% frente à urease de *Cannavalia ensiformis*, sendo mais elevados daqueles apresentados para o inibidor utilizado como controle, a hidroxiiureia. Estudos cinéticos demonstraram que estas BTUs foram capazes de se ligar tanto ao sítio catalítico como a um sítio alostérico da urease, atuando, portanto, como inibidores do tipo misto. Nos testes realizados com amostras de solo, 28 compostos inibiram eficazmente a atividade ureolítica, sendo que sete BTUs apresentaram níveis de inibição maiores que o tiosfato de *N*-(butil)triamida (NBPT; 40% de inibição), empregado como referência. A estabilidade térmica das BTUs, juntamente com a sua capacidade em inibir as ureases do solo, faz desta classe de compostos potenciais aditivos para adubos à base de ureia. Também foram investigados, em nível molecular, os epítomos de ligação entre a urease de *Cannavalia ensiformis* e quatro BTUs através de experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN) envolvendo diferença de transferência de saturação (STD). Foi verificado que a porção benzoila é importante para o reconhecimento dos compostos pela enzima e que os substituintes do nitrogênio modulam o nível de inibição da urease. O efeito STD observado para quatro BTUs evidenciam uma correlação com os ensaios de inibição da atividade ureolítica no ensaio em solo *in natura*, sugerindo que a técnica de STD pode ser utilizada como uma ferramenta no planejamento de novos inibidores de ureases para aplicação na agricultura. Em outra seção deste trabalho, são relatados o planejamento e a avaliação da relação estrutura-atividade (REA) de uma série de benzoiltioureias com foco no desenvolvimento de novos protótipos antituberculose. Neste contexto, 15 compostos apresentaram atividade relevante frente ao *Mycobacterium tuberculosis*, com concentração inibitória mínima (CIM) na faixa de 9,6-190,6  $\mu\text{M}$ , sendo que um deles apresentou um CIM de 9,6  $\mu\text{M}$ , comparável ao CIM do isoxil (antimicrobacteriano de referência – CIM de 6,2  $\mu\text{M}$ ) e 1,7 vezes mais potente que etambutol (fármaco de primeira escolha utilizado no tratamento de tuberculose – CIM de 17,1  $\mu\text{M}$ ). Os resultados obtidos evidenciam o potencial das benzoiltioureias como agentes antimicrobacterianos.

**Palavras-chave:** Benzoiltioureias. Antiureolítico. Inibição da urease. Ressonância Magnética Nuclear. Diferença de transferência de Saturação. Antimicrobacteriano.

BRITO, Tiago de Oliveira. **Benzoylthioureas: synthesis, antimycobacterial and antiureolytic activity and interaction study with urease by NMR**. 2017. 284p. Thesis (Doctorate degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## ABSTRACT

Ureolytic activity of soils is cause of large losses of urea-based fertilizers, which in the presence of ureases is hydrolyzed to ammonia and carbon dioxide. In order to avoid these losses and increase the efficiency of these fertilizers, urease inhibitors are used in urea formulations. However, ureases inhibitors used in agriculture are imported products that inflate the price of urea-based fertilizers. Despite of Brazil prominence in world agribusiness scenario, neither urease inhibitor has been developed in Brazil until now. This work report the synthesis of a wide range of *N*-substituted benzoylthioureas (BTUs) rationally planned and evaluated against their potential as inhibitors of the purified urease enzyme *Cannavalia ensiformis*, as well as inhibitors of the ureolytic activity of *in natura* soil samples. *In vitro* assay revealed eight BTUs with inhibition levels above 50% against *Cannavalia ensiformis* urease, being higher than those presented for the inhibitor used as a control, hydroxyurea. Kinetic studies showed that these BTUs were able to bind both catalytic and allosteric site of urease, acting as mixed type inhibitors. Twenty eight compounds inhibited effectively the ureolytic activity in soil samples and seven BTUs showed higher inhibition levels than NBPT (reference compound that showed 40% inhibition). Thermal stability of BTUs together with their ability to inhibit soil ureases makes this class of compounds potential additives for urea-based fertilizers. We also investigated at molecular levels the binding epitopes between *Cannavalia ensiformis* urease and four BTUs by nuclear magnetic resonance (NMR) experiments involving saturation transfer difference (STD). Has been found that the benzoyl moiety is important for the recognition of the compounds by the enzyme and the substituents on nitrogen modulate the level of urease inhibition. Observed STD effect for four BTUs shows correlation with the inhibition assays of ureolytic activity in the *in natura* soil test, suggesting that STD technique can be used as tool in the planning of new ureases inhibitors for agricultural application. In another section of this work, are reported the planning and evaluation of structure-activity relationship (SAR) for a series of benzoylthioureas with focus on the development of new antituberculosis prototypes. In this context, 15 compounds presented a significant activity against *Mycobacterium tuberculosis*, with a minimum inhibitory concentration (MIC) in the range of 9.6-190.6  $\mu\text{M}$  and one of them showed a MIC of 9.6  $\mu\text{M}$ , which is compatible with isoxil MIC (reference antimycobacterial – MIC of 6,2  $\mu\text{M}$ ) and 1.7 times more potent than ethambutol (first choice drug used in tuberculosis therapy - CIM of 17.1  $\mu\text{M}$ ). Obtained results evidenced the potential of benzoylthioureas as antimycobacterial agents.

**Key words:** Benzoylthioureas. Antiureolytic activity. Urease Inhibition. STD-NMR. Antituberculosis.

## LISTA DE FIGURAS

|                   |                                                                                                                                                                                |    |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b>  | Metodologias mais amplamente empregues na síntese de tioureias.....                                                                                                            | 15 |
| <b>Figura 2.</b>  | Esquema de síntese para obtenção de aciltioureias a partir de ácidos carboxílicos, envolvendo a formação do intermediário acil-isotiocianato.....                              | 16 |
| <b>Figura 3.</b>  | Representação planar e tridimensional da estrutura do sítio ativo da urease de <i>Klebsiella aerogenes</i> .....                                                               | 19 |
| <b>Figura 4.</b>  | Representação esquemática de dois mecanismos propostos para a hidrólise da ureia promovida pela enzima urease .....                                                            | 20 |
| <b>Figura 5.</b>  | Representação da estrutura cristalina do monômero da Urease de <i>Canavalia ensiformis</i> .....                                                                               | 21 |
| <b>Figura 6.</b>  | Superposição dos sítios ativos de ureases de <i>Canavalia ensiformis</i> , de <i>Helicobacter pylory</i> , de <i>Klebsiella aerogenes</i> e de <i>Bacillus pasteurii</i> ..... | 22 |
| <b>Figura 7.</b>  | Representação da estrutura do sítio ativo da urease nativa e inibida por: ácido acetohidroxâmico, ácido bórico, fluoreto e fosforodiamidato.....                               | 25 |
| <b>Figura 8.</b>  | Estrutura do tiofosfato de <i>N</i> -(butil)triamida e fosfato de <i>N</i> -(butil)triamida (NBPTO) e proposta de estrutura do sítio ativo da urease inibida por NBPTO .....   | 26 |
| <b>Figura 9.</b>  | Exemplos de compostos relatados como eficientes inibidores de urease de <i>Canavalia ensiformis</i> .....                                                                      | 27 |
| <b>Figura 10.</b> | Híbridos sulfanilamida-tioureia e seus respectivos $K_i$ 's. ....                                                                                                              | 27 |
| <b>Figura 11.</b> | Benzoiltioureia mais ativa no estudo relatado por Rauf <i>et al.</i> , 2013. ....                                                                                              | 28 |
| <b>Figura 12.</b> | Potencial de inibição in vitro de urease ( $IC_{50}$ $\mu$ M) provocada por benzoiltioureias .....                                                                             | 28 |
| <b>Figura 13.</b> | Representação esquemática do experimento de STD, evidenciando o efeito causado pela saturação seletiva da proteína em compostos ligantes e não-ligantes. ....                  | 32 |
| <b>Figura 14.</b> | Diagrama da sequência de pulsos do experimento básico de STD.....                                                                                                              | 33 |

|                   |                                                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 15.</b> | Diagrama da sequência de pulsos do experimento de STD (stddiffesgp.3). .....                                                                                                                            | 34 |
| <b>Figura 16.</b> | Fármacos de primeira escolha utilizados no tratamento de tuberculose pulmonar ativa. ....                                                                                                               | 37 |
| <b>Figura 17.</b> | Fármacos de segunda escolha utilizados no tratamento de tuberculose resistente. ....                                                                                                                    | 39 |
| <b>Figura 18.</b> | Estrutura de novos fármacos anti-tuberculose: bedaquilina e delamanib.....                                                                                                                              | 40 |
| <b>Figura 19.</b> | Representação da conversão do isoxil em oxo-isoxil.....                                                                                                                                                 | 41 |
| <b>Figura 20.</b> | Híbridos tioureias-tiadiazóis mais ativos frente ao Mycobacterium tuberculosis.....                                                                                                                     | 41 |
| <b>Figura 21.</b> | Mecanismo de reação envolvido na síntese das benzoiltioureias. ....                                                                                                                                     | 50 |
| <b>Figura 22.</b> | Estrutura cristalina da BTU 21, determinada por RX de monocristal.....                                                                                                                                  | 54 |
| <b>Figura 23.</b> | Estratégia utilizada para a concepção de inibidores de urease de interesse agrícola baseados na porção benzoiltioureia.....                                                                             | 55 |
| <b>Figura 24.</b> | Relação entre $V_0$ e $[S]$ na cinética de Michaelis-Menten (adaptado de Berg <i>et al.</i> , 2008).....                                                                                                | 61 |
| <b>Figura 25.</b> | Hipérbole representativa de Michaelis-Menten e gráficos de Lineweaver-Burk para reação de hidrólise de ureia promovida por urease de <i>Canavalia ensiformis</i> na presença das benzoiltioureias ..... | 63 |
| <b>Figura 26.</b> | Inibição de ureases do solo desencadeada por benzoiltioureias .....                                                                                                                                     | 65 |
| <b>Figura 27.</b> | Comportamento termogravimétrico das benzoiltioureias mais promissoras nos testes envolvendo inibição de ureases do solo.....                                                                            | 67 |
| <b>Figura 28.</b> | Representação dos espectros obtidos para o sistema L-triptofano/BSA .....                                                                                                                               | 69 |
| <b>Figura 29.</b> | Fator de amplificação em função do tempo de saturação para o sistema BSA-Triptofano. ....                                                                                                               | 70 |
| <b>Figura 30.</b> | Espectro referência e atribuição dos sinais de $^1H$ do L-triptofano e espectro de STD e mapa de epítomos de L-triptofano interagindo com BSA.....                                                      | 71 |
| <b>Figura 31.</b> | Estrutura dos compostos utilizados nos estudos de STD. ....                                                                                                                                             | 72 |

|                   |                                                                                                                                                |    |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 32.</b> | Espectros de STD obtidos em temperaturas de 25 e 35 °C.....                                                                                    | 74 |
| <b>Figura 33.</b> | Espectros de STD utilizando duas concentrações diferentes de enzima urease.....                                                                | 75 |
| <b>Figura 34.</b> | Perfil de excitação dos pulsos Gaussian1.1000 e Eburp2.1000 em função da largura de excitação em ppm .....                                     | 76 |
| <b>Figura 35.</b> | Espectro referência e espectros de STD obtidos utilizando perfis de excitação Eburp2 e Gauss com diferentes larguras de pulso.....             | 77 |
| <b>Figura 36.</b> | Espectro referência e STD obtidos variando a região de irradiação seletiva da proteína (-0,5 ppm; 0 ppm; 0,5 ppm) .....                        | 78 |
| <b>Figura 37.</b> | Gráfico do fator de amplificação em função do tempo de saturação para o sistema Urease-BTU 1 .....                                             | 79 |
| <b>Figura 38.</b> | Espectro referência e atribuição dos sinais de <sup>1</sup> H do inibidor BTU 1 e mapa de epítomos da BTU 1 interagindo com a urease ....      | 80 |
| <b>Figura 39.</b> | Gráfico do fator de amplificação em função do tempo de saturação para o sistema Urease-BTU 2 .....                                             | 81 |
| <b>Figura 40.</b> | Espectro referência com atribuição dos sinais de <sup>1</sup> H do inibidor BTU 2 e mapa de epítomos da BTU 2 interagindo com a urease ....    | 82 |
| <b>Figura 41.</b> | Espectro referência com atribuição dos sinais de <sup>1</sup> H do inibidor BTU 3 e mapa de epítomos da BTU 3 interagindo com a urease, .....  | 83 |
| <b>Figura 42.</b> | Espectro referência com atribuição dos sinais de <sup>1</sup> H do inibidor BTU 10 e mapa de epítomos da BTU 10 interagindo com a urease ..... | 84 |
| <b>Figura 43.</b> | Planejamento estrutural das duas séries de benzoiltioureias para avaliação frente ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....                   | 86 |
| <b>Figura 44.</b> | Estrutura das benzoiltioureias da série B, e respectivo CIM frente ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....                                  | 91 |

## LISTA DE TABELAS

|                  |                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> | Síntese das benzoiltioureias a partir do cloreto de benzoíla .....                                                                                                                       | 51 |
| <b>Tabela 2.</b> | Abordagem sintética, rendimento (após recristalização) e pontos de fusão obtidos para as benzoiltioureias sintetizadas a partir de cloretos de benzoíla monosubstituídos. ....           | 52 |
| <b>Tabela 3.</b> | Atividade inibitória das benzoiltioureias sintetizadas (0,5 Mm) a partir do cloreto de benzoíla provocada em urease jack bean em reações contendo 10 mM de ureia. ....                   | 57 |
| <b>Tabela 4.</b> | Atividade inibitória das benzoiltioureias sintetizadas (0,5 Mm) a partir de cloretos de benzoíla mono-substituídos provocada em urease jack bean em reações contendo 10 mM de ureia..... | 58 |
| <b>Tabela 5.</b> | Efeito de benzoiltioureias (BTUs) nos parâmetros cinéticos de urease jack bean .....                                                                                                     | 64 |
| <b>Tabela 6.</b> | Comparação dos valores do efeito STD observado das BTU's 1, 3 e 10 e a respectiva inibição.....                                                                                          | 84 |
| <b>Tabela 7.</b> | Primeira série de benzoiltioureias e respectivas atividades frente ao <i>Micobacterium tuberculosis</i> .....                                                                            | 88 |
| <b>Tabela 8.</b> | Segunda série de benzoiltioureias e respectivas atividades frente ao <i>Micobacterium tuberculosis</i> .....                                                                             | 90 |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

|        |                                                                                                  |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| UCE    | Urease de <i>Canavalia ensiformis</i>                                                            |
| HU     | Hidroxiureia                                                                                     |
| TU     | Tioureia                                                                                         |
| NBPT   | Tiofosfato de <i>N</i> -(butil)triamida (do inglês: <i>N-(butyl)thiophosphoric triamide</i> )    |
| PPD    | Fosforodiamidato de fenila (do inglês: <i>phenyl phosphorodiamidate</i> )                        |
| DAP    | Fosforodiamidato (do inglês: <i>phosphorodiamidate</i> )                                         |
| NBPTO  | Fosfato de <i>N</i> -(butil)triamida (do inglês: <i>N-(butyl)phosphoric triamide</i> )           |
| RMN    | Ressonância Magnética Nuclear                                                                    |
| STD    | Diferença de transferência de saturação (do inglês: <i>Saturation Transfer Difference</i> )      |
| DOSY   | Espectroscopia de difusão ordenada (do inglês: <i>Diffusion-Ordered Spectroscopy</i> )           |
| NOE    | Efeito nuclear Overhauser (do inglês: <i>Nuclear Overhauser Effect</i> )                         |
| CW     | Onda contínua (do inglês: <i>Continuous Wave</i> )                                               |
| OMS    | Organização Mundial da Saúde                                                                     |
| SIDA   | Síndrome da imunodeficiência adquirida                                                           |
| TB     | Tuberculose                                                                                      |
| TB-MDR | Tuberculose multirresistente (do inglês: <i>Tuberculosis multidrug resistant</i> )               |
| TB-XDR | Tuberculose extremamente resistente (do inglês: <i>Extensively drug-resistant tuberculosis</i> ) |
| CIM    | Concentração inibitória mínima                                                                   |
| REA    | Relação estrutura-atividade                                                                      |
| FT-IR  | Infravermelho com transformada de Fourier (do inglês: <i>Fourier transform infrared</i> )        |
| BTU    | Benzoiltioureia                                                                                  |
| ISO    | Isoxil                                                                                           |
| BSA    | Albumina isolada de soro bovino (do inglês: <i>Bovine serum albumine</i> )                       |
| HSA    | Albumina isolada de soro humano (do inglês: <i>Human serum albumine</i> )                        |
| TGA    | Análise termogravimétrica (do inglês: <i>Thermogravimetric analysis</i> )                        |
| FID    | Decaimento livre de indução (do inglês: <i>Free induction decay</i> )                            |
| P. F.  | Ponto de fusão                                                                                   |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....                                                                                                 | <b>12</b> |
| 1.1 Síntese e bioatividades de Benzoiltioureias .....                                                                      | 12        |
| 1.2 Utilização de ureia como fertilizante agrícola .....                                                                   | 13        |
| 1.2.1 Estrutura e atividade calítica das ureases .....                                                                     | 14        |
| 1.2.2 Desenvolvimento de inibidores de ureases como aditivos em formulações de fertilizante agrícola a base de ureia. .... | 20        |
| 1.3 Estudo de interação ligante-macromolécula por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear .....                          | 25        |
| 1.3.1 Diferença de Transferência de Saturação (STD) .....                                                                  | 26        |
| 1.4 Descrição e relevância da tuberculose .....                                                                            | 32        |
| 1.4.1 Tratamento e desenvolvimento de novos fármacos contra a tuberculose .<br>.....                                       | 33        |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....                                                                                                  | <b>39</b> |
| 2.1 Objetivos Gerais .....                                                                                                 | 39        |
| 2.2 Objetivos Específicos .....                                                                                            | 39        |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....                                                                                        | <b>40</b> |
| 3.1 Materiais .....                                                                                                        | 40        |
| 3.2 Métodos .....                                                                                                          | 40        |
| 3.2.1 Síntese de tioureias <i>N,N'</i> -substituídas .....                                                                 | 40        |
| 3.2.2 Análise termogravimétrica .....                                                                                      | 41        |
| 3.2.3 Teste de inibição ( <i>in vitro</i> ) da urease de <i>Canavalia ensiformis</i> .....                                 | 41        |
| 3.2.4 Ensaio cinético com urease de <i>Canavalia ensiformis</i> .....                                                      | 42        |
| 3.2.5 Ensaio de atividade inibitória de ureases contidas em amostra de solo .....                                          | 42        |
| 3.2.6 Experimentos de STD – Sistema modelo (BSA-Triptofano) .....                                                          | 43        |
| 3.2.7 Experimentos de STD – Sistema UCE-BTUs .....                                                                         | 43        |
| 3.2.8 Avaliação da atividade antituberculose .....                                                                         | 44        |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....                                                                                     | <b>47</b> |
| 4.1 Síntese e caracterização estrutural das benzoiltioureias .....                                                         | 47        |
| 4.2 avaliação de benzoiltioureias como inibidores de urease .....                                                          | 51        |
| 4.2.1 Efeito inibitório de BTUs na atividade de urease de <i>C. ensiformis in vitro</i> .<br>.....                         | 51        |
| 4.2.2 Estudo do mecanismo de inibição da urease provocada pelas BTUs ...                                                   | 56        |
| 4.2.3 Efeito inibitório de BTUs na atividade ureolítica em solo .....                                                      | 61        |

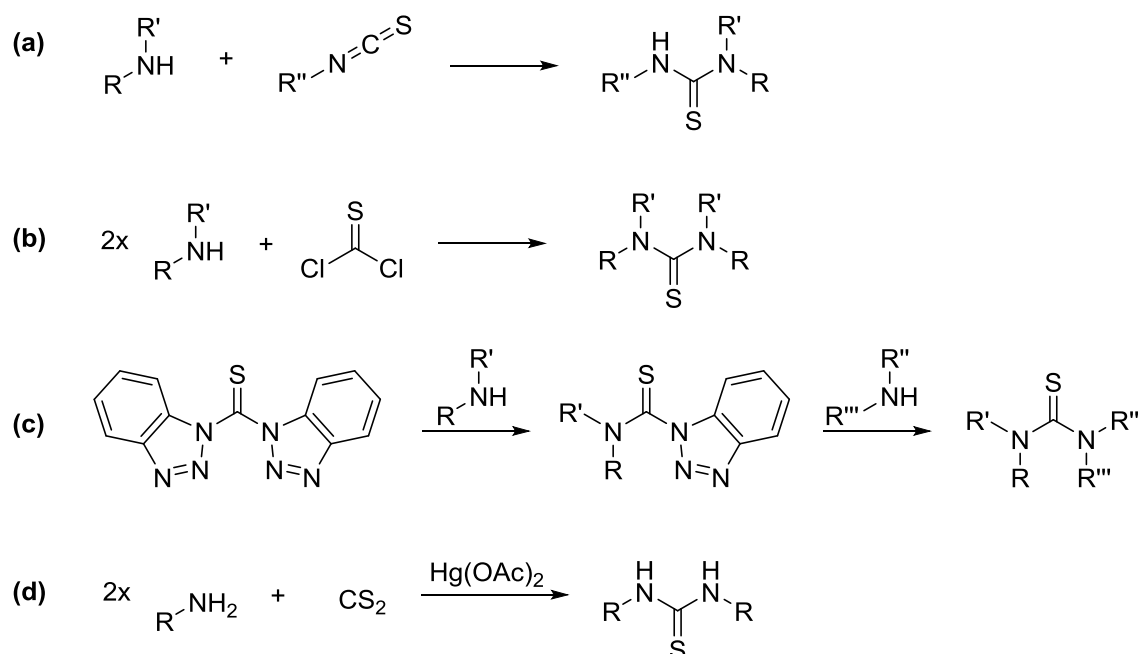
|           |                                                                                                                                |            |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.2.4     | Estabilidade térmica das BTUs.....                                                                                             | 63         |
| 4.3       | Estudo de interação entre Benzoiltiuréias e urease de <i>C. ensiformis</i> por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear ..... | 65         |
| 4.3.1     | Estudo modelo e implementação da técnica de STD no Laboratório Multiusuário de Espectroscopia da UEL .....                     | 65         |
| 4.3.2     | Estudo de interação de BTUs com urease de <i>Canavalia ensiformis</i> por STD .....                                            | 69         |
| 4.4       | Avaliação da atividade antimicobacteriana de benzoiltioureias.....                                                             | 82         |
| <b>5.</b> | <b>CONCLUSÃO .....</b>                                                                                                         | <b>90</b>  |
|           | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                        | <b>92</b>  |
|           | <b>APÊNDICES A – Dados de STD.....</b>                                                                                         | <b>105</b> |
|           | <b>APÊNDICES B – Caracterização dos compostos e espectros de IV e RMN.....</b>                                                 | <b>106</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 SÍNTESE E BIOATIVIDADES DE BENZOILTIOUREIAS

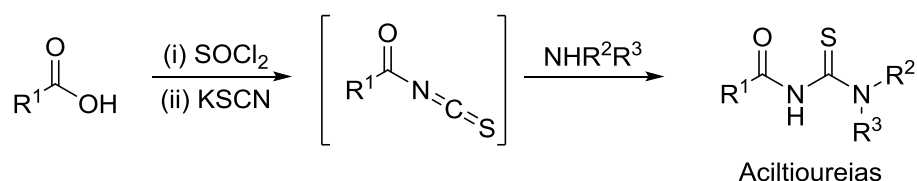
Derivados de tioureia são blocos de construção de valor para a síntese de amidas, de guanidinas, e de uma variedade de compostos heterocíclicos (MADDANI e PRABHU, 2010). Alguns derivados de tioureia também têm sido aplicados como organocatalisadores (TAYLOR e JACOBSEN, 2006). Por estas razões, uma série de metodologias são relatadas na literatura para a síntese de tioureias (MADDANI e PRABHU, 2010).

Entre os vários métodos existentes para a síntese de tioureias, os mais amplamente utilizados (Figura 1) envolvem a condensação de aminas primárias e secundárias com isotiocianato (KATRITZKY et al., 2004), tiosfegênio (SHARMA, 1978) ou seus derivados menos tóxicos, como o bis(1-benzotriazolil)metanotiona (STAAB, 1962). Também se destaca a reação de aminas primárias com dissulfeto de carbono na presença de acetato de mercúrio e a reação de tioureias não substituídas com aminas primárias (ERICKSON, 1956).



**Figura 1.** Metodologias mais amplamente empregues na síntese de tioureias. Reação de aminas com: **(a)** isotiocianatos; **(b)** tiosfegênio; **(c)** bis(1-benzotriazolil)metanotiona; **(d)** dissulfeto de carbono em presença de acetato de mercúrio.

Aciltioureas podem ser obtidas, a partir de ácidos carboxílicos, através da conversão para cloretos de acila utilizando cloreto de tionila. Os cloretos de acila então reagem com tiocianato de amônio ou de potássio em acetona, formando um isotiocianato de acila que pode então ser tratado com aminas para fornecer as aciltioureas de interesse (Figura 2) (OTAZO-SÁNCHEZ et al., 2001).



**Figura 2.** Esquema de síntese para obtenção de aciltioureas a partir de ácidos carboxílicos, envolvendo a formação do intermediário acil-isotiocianato.

As aciltioureas constituem uma importante classe de substâncias para a química medicinal devido as suas atividades biológicas, como antimicrobianas (ZHONG et al., 2008; ABBAS et al., 2013), antifúngicas (ABBAS et al., 2013), antiviral (BURGESON et al., 2012), analgésicas (WALPOLE et al., 1998) e antitumoral (RAO et al., 2011). Além de sua importância para a farmacologia, vários estudos têm descrito tioureas com propriedades úteis para a agricultura, tais como herbicidas (SCHROEDER, 1955), inseticidas (MADAN et al., 1991) e como reguladores de crescimento de plantas (YONOVA e STOILKOVA, 2004; BROWN e HARRIS, 1973).

## 1.2 UTILIZAÇÃO DE UREIA COMO FERTILIZANTE AGRÍCOLA

A ureia possui grande importância histórica, uma vez que este foi o primeiro composto orgânico a ser sintetizado. Em 1828, Friedrich Wöhler converteu cianato de amônio em ureia, rompendo um paradigma histórico de que moléculas biológicas só podiam ser produzidas por organismos vivos (WÖHLER, 1828). Esta descoberta também é considerada como marco inicial do desenvolvimento da síntese orgânica.

A elevação na produção de alimentos para sustentar os crescentes aumentos populacionais após a revolução industrial, só foi alcançada graças à utilização de fertilizantes nitrogenados. A ureia ocupa hoje um papel central neste cenário, correspondendo a cerca de 50% do total de fertilizantes nitrogenados

consumidos mundialmente (WATSON, 2005). Sem a utilização destes fertilizantes, a produção mundial de alimentos reduziria pela metade (ERISMAN et al., 2008).

O Brasil, mesmo com sua elevada produção agrícola, possui uma indústria de fertilizantes muito dependente de matérias-primas importadas, isto tornou-se ainda mais preocupante a partir de 2007/2008, quando houve um aumento em mais de 200% no preço de fertilizantes e suas matérias-primas (FERTBRASIL, 2010).

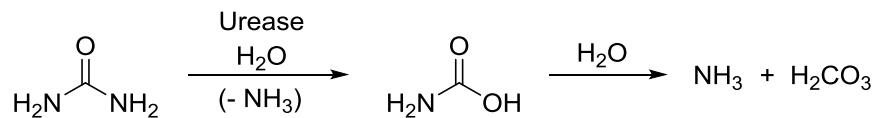
A ureia é o fertilizante nitrogenado mais empregado no Brasil (aproximadamente 60% do total comercializado) (CANTARELLA e MARCELINO, 2006). Isto se deve, entre outros fatores, ao seu baixo custo, a sua elevada porcentagem de nitrogênio por unidade (46% de N), a sua facilidade de fabricação, armazenamento, transporte e manuseio (sem riscos de explosão ou combustão) e sua alta solubilidade em água (KISS e SIMIHAIAN, 2002). Adicionalmente, a ureia apresenta uma baixa corrosividade e é compatível com um grande número de outros fertilizantes e defensivos agrícolas, possuindo alta absorção foliar (YAMADA e ABDALLA, 2007).

O consumo mundial de ureia em 2014 foi de 63 milhões de toneladas, sendo que sua produção cresce a uma taxa de aproximadamente 5% ao ano (IFA, 2015). Entretanto, uma parcela da ureia aplicada no solo, não é aproveitada pelas plantas. Na Ásia, por exemplo, as práticas dos agricultores resultam em um aproveitamento menor que 40% do total do nitrogênio aplicado (MALHI et al., 2001). Alguns estudos relatam que podem ocorrer perdas acima de 70% do total de nitrogênio aplicado, entretanto a média é de 20 a 33% para a maioria dos solos (KELLER e MENGEL, 1986; OLIVEIRA et al., 1997; LARA CABEZAS e TRIVELIN, 1990). As perdas de nitrogênio se devem principalmente pela hidrólise da ureia catalisada por enzimas ureases presentes no solo.

### 1.2.1 Estrutura e atividade calítica das ureases

As ureases (urea amidohidrolases; EC 3.5.1.5) são metaloenzimas produzida por bactérias, fungos, leveduras e plantas, que se incorporam facilmente ao solo, podendo ser encontradas em partículas orgânicas, em minerais e/ou complexada com substâncias húmicas (CANTARELLA et al., 2008). Estas enzimas catalizam a hidrólise da ureia, formando amônia e carbamato como produtos, este

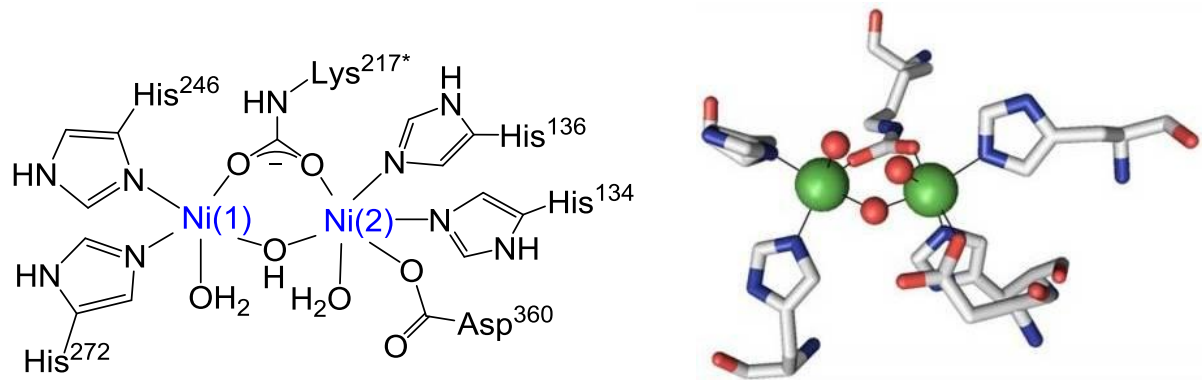
último, se decompõe espontaneamente (em presença de água) em amônia e ácido carbônico (Esquema 1) (MACOMBER et al., 2015; KARPLUS, PEARSON e HAUSINGER, 1997; KISS e SIMIHAIAN, 2002). A reação de hidrólise espontânea da ureia ocorre com um tempo de meia-vida de aproximadamente 3,6 anos (ZERNER, 1991), entretanto a reação catalisada por ureases é cerca de  $10^{14}$  vezes mais rápida, ocorrendo em um tempo de aproximadamente 1  $\mu$ s (HAUSINGER, 1993).



**Esquema 1.** Reação de hidrólise enzimática da ureia.

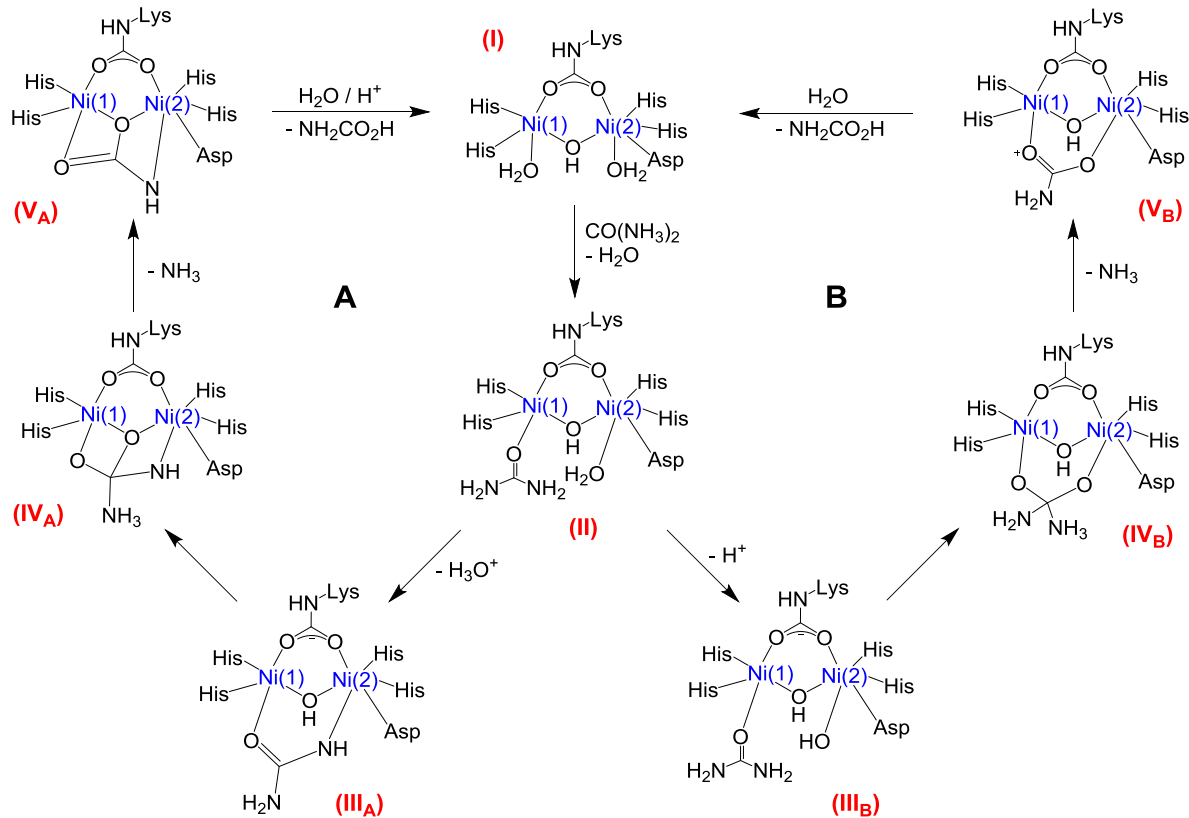
A urease de *Canavalia ensiformis* (UCE) foi a primeira enzima a ser cristalizada, em 1926 por James B. Sumner, que por esta contribuição foi laureado com o Prêmio Nobel de química em 1946. O trabalho de Sumner (SUMNER, 1926) foi muito importante por fornecer uma prova sobre a natureza proteica das enzimas e por demonstrar que estas podem ser cristalizadas (BALASUBRAMANIAN e PONNURAJ, 2010). Entretanto, somente em 1975, Dixon e colaboradores, revelariam que as ureases possuem átomos de níquel em seu sítio ativo, sendo este o primeiro relato de uma enzima a apresentar este metal em sua estrutura (DIXON et al., 1975).

O sítio ativo de ureases contém dois átomos de níquel com uma distância interatômica entre estes de 3,5-3,7 Å (Figura 3) (BOER et al., 2014). Estes íons são interligados por uma lisina carbamoilada e um íon hidróxido. Além destes ligantes, o íon Ni(1) é coordenado com dois resíduos de histidinas e com uma molécula de água. A coordenação do outro íon, Ni(2), é semelhante ao primeiro, mas inclui um resíduo de aspartato terminal (CARLSSON e NORDLANDER, 2010; BARRIOS e LIPPARD, 2000).



**Figura 3.** Representação planar e tridimensional da estrutura do sítio ativo da urease de *Klebsiella aerogenes*. (Adaptado de BARRIOS e LIPPARD, 2000; BOER et al., 2014).

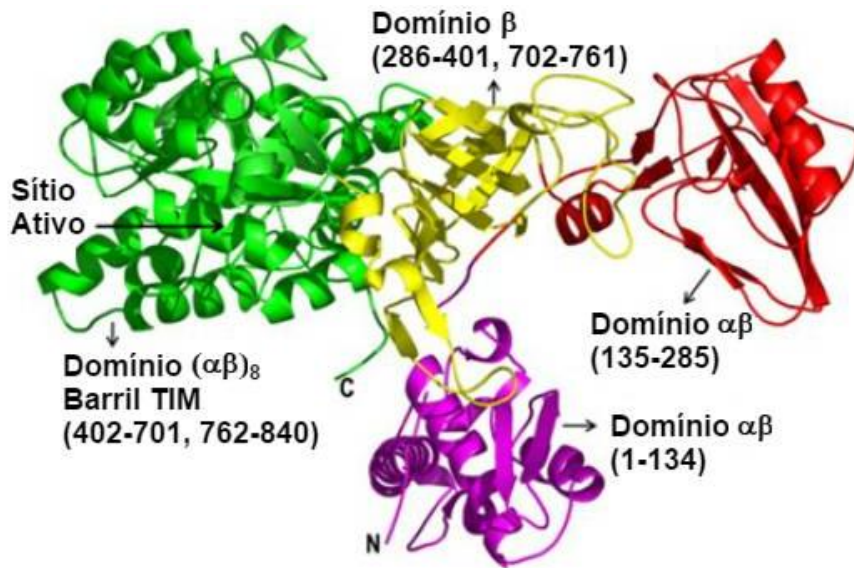
Uma série de propostas já foram relatadas para os possíveis mecanismos de reação de hidrólise da ureia catalisada pelas ureases, entretanto este ainda é um tema em discussão. Existe um consenso que o reconhecimento da ureia pelo sítio ativo, está associado à coordenação do oxigênio deste substrato ao Ni(1) da urease (Figura 4 – **(III)**), mas há propostas divergentes sobre as etapas subsequentes (CARLSSON e NORLANDER, 2010). O mecanismo sugerido primeiramente (Proposta B) propõe que ocorra o ataque nucleofílico ao carbono da ureia por um hidróxido terminal ligado a Ni(2) (**(III<sub>B</sub>)**). Isto levaria a um intermediário que une os dois metais (**(IV<sub>B</sub>)**) e na sequência pode liberar amônia (**(V<sub>B</sub>)**) (DIXON et al., 1980; LIPPARD, 1995; KARPLUS et al., 1997). Com base na estrutura de um complexo urease-inibidor, Benini e colaboradores (1999) sugerem um mecanismo (Proposta A) que envolve uma coordenação secundária de um dos átomos de nitrogênio da ureia com Ni(2) (**(III<sub>A</sub>)**), que posiciona o substrato em favor de um ataque nucleofílico a partir do hidróxido que interliga os dois átomos de Ni (**(IV<sub>A</sub>)**) (BENINI et al., 1999). A coordenação em ponte do substrato (ureia) foi apoiada por Pearson e colaboradores (2000), mas estes investigadores têm sugerido que o nucleófilo não é o hidróxido, mas sim a água coordenada ao Ni(2) (PEARSON et al., 2000; CARLSSON e NORLANDER, 2010).



**Figura 4.** Representação esquemática de dois mecanismos propostos para a hidrólise da ureia promovida pela enzima urease; **A** (BENINI et al., 1999) e **B** (LIPPARD, 1995). (Adaptado de CARLSSON e NORDLANDER, 2010).

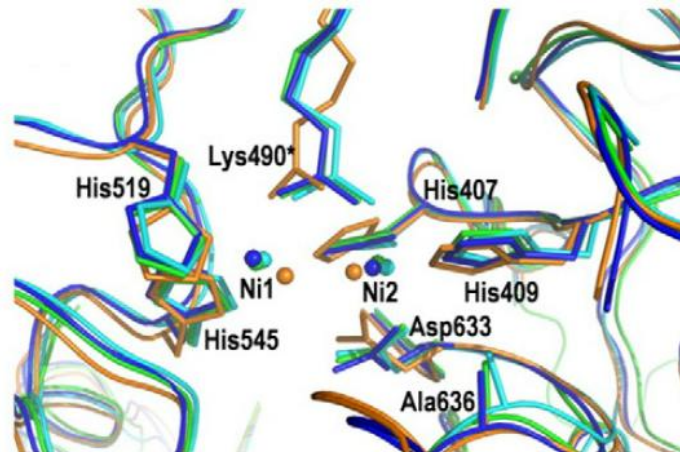
A estrutura da urease de *Klebsiella aerogenes* foi elucidada pela primeira vez em 1995 (JABRI et al., 1995), e desde então várias outras estruturas desta enzima, com ou sem inibidores ligados foram determinadas (PEARSON et al., 1997; BENINI et al., 1998; BENINI et al., 1999; BENINI et al., 2000), incluindo a de *Bacillus pasteurii* e de *Helicobacter pylori* (HA et al., 2001).

Embora a urease de *Canavalia ensiformis* tenha sido a primeira enzima a ser cristalizada, sua estrutura cristalina só foi determinada em 2010 por Balasubramanian e Ponnuraj. Estes revelaram sua forma em T ou martelo. Seu monômero pode ser dividido em quatro domínios:  $\alpha\beta$  N-terminal (1-134),  $\alpha\beta$  (135-285),  $\beta$  (286-401, 702-761) e barril TIM C-terminal  $(\alpha\beta)_8$  (402-701, 762-840), onde está localizado o sítio ativo da enzima (Figura 5) (BALASUBRAMANIAN e PONNURAJ, 2010).



**Figura 5.** Representação da estrutura cristalina do monômero da Urease de *Canavalia ensiformis* evidenciando sua forma em T, que consiste em quatro domínios: αβ N-terminal (magenta), αβ (vermelho), β (amarelo) e barril TIM C-terminal (αβ)<sub>8</sub> (verde). (BALASUBRAMANIAN e PONNURAJ, 2010).

As ureases vegetais e fúngicas são proteínas homo-oligoméricas de subunidades idênticas de 90 kDa, enquanto ureases bacterianas são multímeros complexos de duas ou três subunidades (BALASUBRAMANIAN e PONNURAJ, 2010). Ainda assim, as ureases bacterianas, fúngicas e de vegetais têm alta similaridade de sequência, sugerindo que elas têm estruturas tridimensionais semelhantes. Através da superposição dos sítios ativos de ureases isoladas de *Canavalia ensiformis*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella aerogenes* e *Bacillus pasteurii* (Figura 6), é possível observar a similaridade entre os arranjos tridimensionais dos sítios ativos de urease vegetal e de ureases bacterianas (BALASUBRAMANIAN e PONNURAJ, 2010).



**Figura 6.** Superposição dos sítios ativos de ureases de *Canavalia ensiformis* (verde, 3LA4), de *Helicobacter pylori* (laranja, 1E9Z), de *Klebsiella aerogenes* (azul, 1FWJ) e de *Bacillus pasteurii* (ciano, 2UBP) (BALASUBRAMANIAN e PONNURAJ, 2010).

A atividade ureolítica de bactérias desempenha um papel importante na patogênese de algumas doenças humanas e animais (MOBLEY et al., 1995). Uma das ureases bacteriana mais frequentemente relacionadas a doenças é a produzida por *Helicobacter pylori*. A presença desta enzima no trato gástrico pode implicar em úlceras pépticas e câncer de estômago (COVACCI et al., 1999).

Nas plantas, a urease é encontrada principalmente em sementes de leguminosas, desempenhando um papel de defesa das sementes contra predadores (ZONIA et al., 1995). Também é sugerido que as ureases possam desempenhar um papel importante na germinação das sementes (POLACCO e HOLLAND, 1993; BALASUBRAMANIAN e PONNURAJ, 2010).

Por outro lado, a amônia formada na hidrólise da uréia pode prejudicar o crescimento de mudas e causar danos a sementes germinadas. Além disto, a sua alta concentração no solo pode impedir a oxidação bacteriana de nitritos a nitratos, gerando como consequência um acúmulo de nitritos em concentrações tóxicas (KISS e SIMIHAIAN, 2002).

A amônia também constitui um problema ambiental, pois este produto, além de poluir o ar e contribuir para o efeito estufa, pode contaminar lagos e córregos próximos promovendo a eutrofização (KISS e SIMIHAIAN, 2002).

Como prevenção da excessiva taxa de hidrólise de uréia no solo e de seus efeitos indesejáveis, surgiram algumas alternativas que visam aumentar a eficiência dos fertilizantes a base de uréia. Podendo gerar uma série de efeitos positivos, como: aumento do valor econômico e agrônômico destes fertilizantes, economia de energia e matérias-primas utilizadas na fabricação e minimização de

alguns efeitos sobre o meio ambiente que resultam do uso de fertilizantes ineficientes (KISS e SIMIHAIAN, 2002).

A redução na taxa de hidrólise de uréia no solo pode ser conseguida principalmente através de: (a) Obtenção de produtos que reduzem a solubilidade da ureia em água e limitam a quantidade livre no solo, por exemplo, revestimento das esferas de ureia com ceras ou pós e utilização de derivados sintéticos como diureia isobutilideno e diureia crotonilideno; (b) Inibição da atividade de urease através da associação de ureia a um composto como tiofosfato de *N*-(butil)triamida (NBPT), hidroxiiureia (HU) e tioureia (TU), que inibe a enzima e impede ou retarda a hidrólise do substrato; (c) Uso de adutos ou complexos de ureia formados a partir de ácidos minerais ou orgânicos e ions metálicos, respectivamente (KISS e SIMIHAIAN, 2002).

Dentre as opções citadas, o uso de inibidores de ureases é considerado como uma das abordagens mais viáveis para aumentar a eficácia dos fertilizantes à base de ureia. Devido principalmente pelo fato de utilizar baixas concentrações do inibidor que é adicionado ao fertilizante, a um baixo custo industrial. O uso destes inibidores reduz a concentração de  $\text{NH}_4^+$  no solo e conseqüentemente o potencial de volatilização de  $\text{NH}_3$ , além de reduzir a taxa de hidrólise, permitindo maior tempo para a incorporação do nitrogênio no solo (JUNEJO et al., 2011).

### 1.2.2 Desenvolvimento de inibidores de ureases como aditivos em formulações de fertilizante agrícola a base de ureia.

A busca por inibidores de ureases vem sendo feita por mais de seis décadas, principalmente devido às potenciais aplicações como fármacos para tratamento de infecções causadas por microorganismos ureolíticos e como aditivo em fertilizantes a base de uréia para reduzir as perdas de nitrogênio.

Metais pesados inibem a urease de forma não competitiva, com uma eficiência de inibição que pode ser classificada na seguinte ordem:  $\text{Ag}^+ \sim \text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$ , sendo que os íons  $\text{Ag}^+$  e  $\text{Hg}^{2+}$  são capazes de inativar completamente a urease, até mesmo em concentrações na ordem de  $10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>. Estes íons reagem com os grupos sulfidrilas dos resíduos de cisteína próximos ao sítio ativo da urease, formando sulfetos metálicos e inativando a enzima (UPADHYAY, 2012). Entretanto, para as aplicações como fármacos ou fertilizantes a

utilização destes íons não é possível, devido principalmente às altas toxicidades aos seres humanos e animais e também por serem nocivos ao meio ambiente.

Estudos direcionados à identificação de inibidores de ureases de plantas revelam que as substâncias mais promissoras são estruturalmente similares ao substrato natural da enzima, ou seja, compostos que mimetizam a estrutura da ureia (BENINI, 1999; VAREL, 1997; FONT et al., 2008).

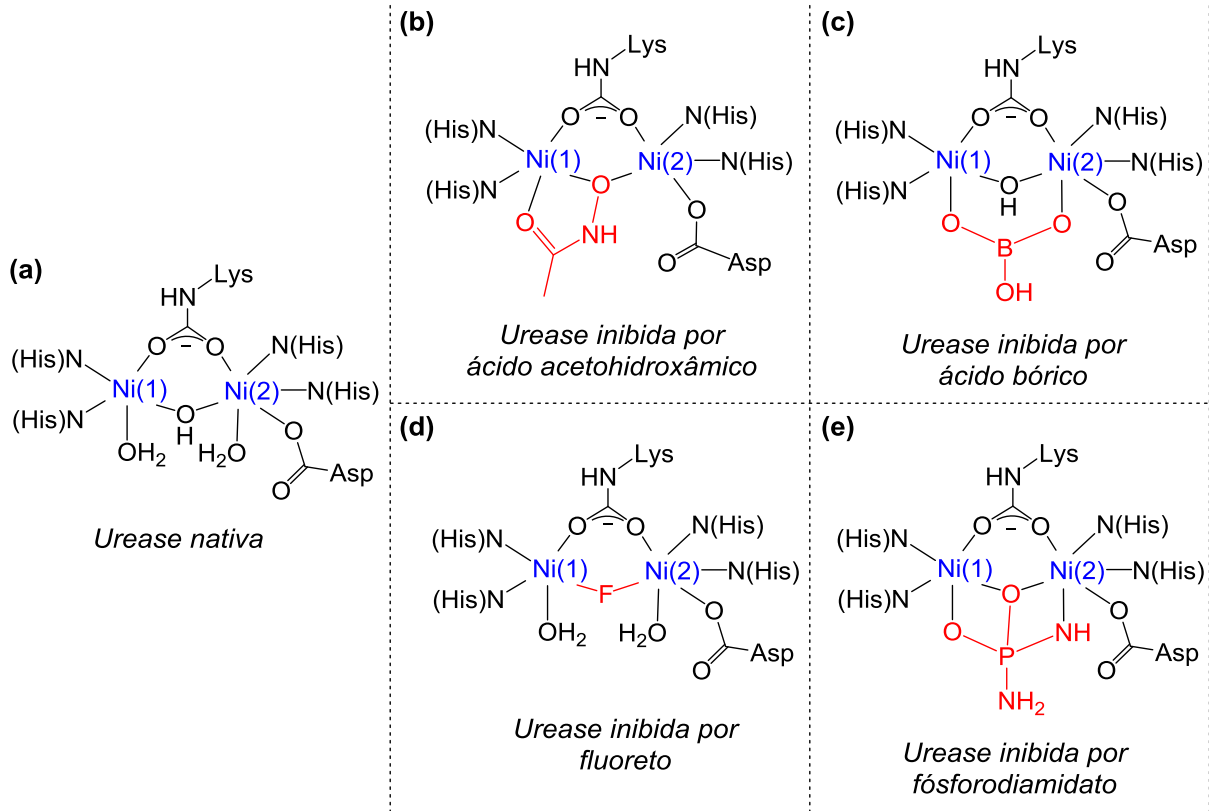
Os ácidos hidroxâmicos e derivados são conhecidos inibidores de ureases bacterianas e de plantas, sendo classificados como inibidores reversíveis. Nesta classe de compostos, o ácido acetohidroxâmico é o inibidor mais amplamente estudado, sendo que a porção  $-\text{CONHOH}$  é essencial para a atividade antiureolítica (UPADHYAY, 2012). A estrutura do complexo urease-ácido acetohidroxâmico (Figura 7b) foi determinada através de cristalografia de raios-X, revelando que o composto inibe a urease através do deslocamento de ambas as moléculas de água e o hidróxido presentes no sítio ativo da enzima nativa (BENINI et al., 2000).

O ácido bórico é um inibidor competitivo da urease, que possui máxima eficiência de inibição em pHs em torno de 5,0 e mínima em pHs acima de 10,0 (UPADHYAY, 2012). Um estudo de cristalografia de raios-X do complexo revelou que o ácido bórico desloca as duas moléculas de água ligadas no sítio ativo da enzima nativa e inibe a urease através da formação de um quelato que envolve a ligação do inibidor com os dois átomos de níquel do sítio ativo (Figura 7c) (BENINI et al., 2004).

O íon fluoreto também inibe a urease de forma dependente do pH (UPADHYAY, 2012). O mecanismo de inibição é controverso, sendo relatado tanto como pseudo-incompetitivo (TODD e HAUSINGER, 2000) ou como competitivo (KRAJEWSKA et al., 2001). Apesar disso, ambos os estudos propõem que este íon liga-se à urease deslocando o hidróxido que interliga os dois átomos de níquel no sítio ativo da enzima (Figura 7d) (TODD e HAUSINGER, 2000; KRAJEWSKA et al., 2001).

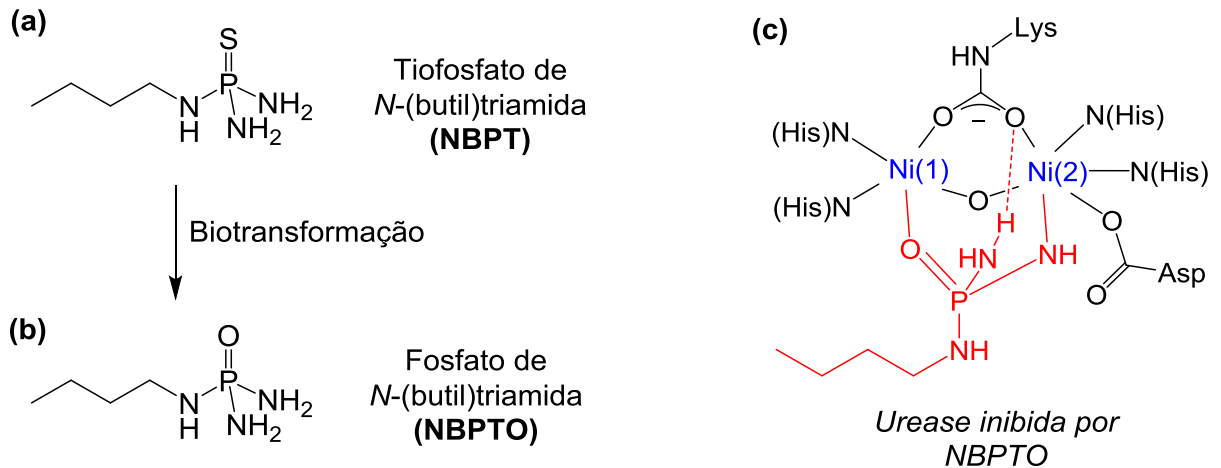
As fosforamidas são consideradas potentes inibidores de ureases, sendo o fosforodiamidato de fenila (PPD) o primeiro composto desta classe a ser relatado como um inibidor indireto. Este sofre hidrólise enzimática formando fosforodiamidato (DAP), que inibe a enzima através da remoção do hidróxido e deslocamento das duas moléculas de água ligadas aos átomos de níquel do sítio ativo (Figura 7e), formando um quelato que mimetiza o estado de transição de

hidrólise do substrato. Esta hipótese foi confirmada através de análise de cristalografia de raios-X (KRAJEWSKA e ZABORSKA, 2007; BENINI et al., 1999).



**Figura 7.** Representação da estrutura do sítio ativo da urease nativa (a) e inibida por: ácido acetohidroxâmico (b), ácido bórico (c), fluoreto (d) e fosforodiamidato (e). Em vermelho a porção de cada inibidor responsável pela atividade. (Adaptado de KRAJEWSKA e ZABORSKA, 2007).

Um dos compostos revelados como mais promissores é o tiofosfato de *N*-(butil)triamida (NBPT, Figura 8a), sendo atualmente utilizado como aditivo em fertilizantes a base de ureia. No solo, o NBPT é oxidado formando seu derivado fosfato de *N*-(butil)triamida (NBPTO, Figura 8b) que então inibe a urease atuando como um inibidor misto (podendo ligar-se tanto ao sítio ativo quanto a sítios alostéricos) (YAMADA e ABDALLA, 2007). Cálculos de dinâmica molecular sugerem que o NBPTO coordena-se a ambos os átomos de níquel e também parece ser capaz de interagir com o grupo carbamato localizado no sítio ativo da enzima através de ligação de hidrogênio, formando um complexo tridentado (Figura 8c) (MANUNZA et al., 1999).



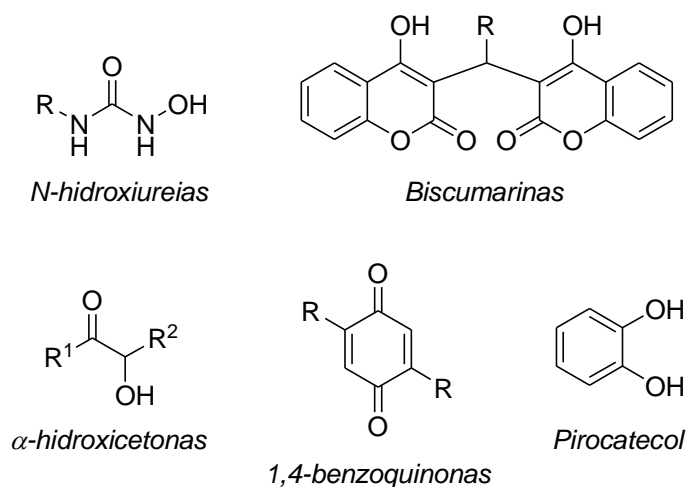
**Figura 8.** (a) Estrutura do Tiofosfato de N-(butil)triamida (NBPT); (b) Fosfato de N-(butil)triamida (NBPTO); (c) Proposta de estrutura do sítio ativo da urease inibida por NBPTO, evidenciando as interações Ni-O, Ni-NH<sub>2</sub> e ligação de hidrogênio entre um dos oxigênios da carbamida com NH<sub>2</sub> do NBPTO (Adaptado de MANUNZA et al., 1999).

O uso de NBPT em formulações à base de ureia mostrou contribuir para a redução das perdas de nitrogênio em solos com plantações de milho, arroz, cana-de-açúcar, entre outros (GIOACCHINI et al., 2002; YAMADA e ABDALLA, 2007; CANTARELLA et al., 2008; CHIEN et al., 2009; SCIVITTARRO et al., 2010). O uso deste inibidor pode aumentar a produtividade dos cultivares em média de 7 a 12%, dependendo das condições climáticas e da forma de manejo do solo (YAMADA e ABDALLA, 2007).

O NBPT e outros inibidores de urease são produtos importados, o que onera os preços de fertilizantes à base de ureia para os agricultores brasileiros. Além disso, depois de adicionado à ureia, o NBPT tende a perder eficácia com o tempo de armazenamento (HENDRICKSON e DOUGLASS, 1993), sendo recomendado um armazenamento de no máximo seis semanas após a mistura (YAMADA e ABDALLA, 2007). A eficiência do NBPT também tende a ser menor em solos ácidos e a altas temperaturas, quando há maior atividade de urease, maior dissolução dos grânulos de uréia e maior evaporação da solução do solo (CANTARELLA et al., 2008).

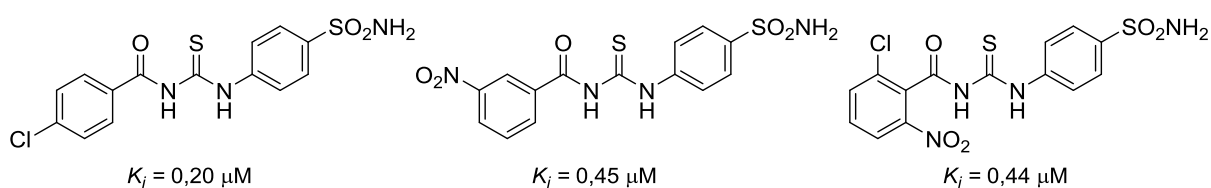
Uma série de outros compostos também tem sido relatados como eficientes inibidores de urease de *Canavalia ensiformis* (Figura 9), entre estes destacam-se a hidroxauréia e seus derivados (UESATO et al., 2002), biscumarinas (KHAN et al., 2004),  $\alpha$ -hidroxicetonas (TANAKA et al., 2004), benzoquinonas

(ZABORSKA et al., 2002), pirocatecol (KOT e ZABORSKA, 2003), entre outros (UPADHYAY, 2012).



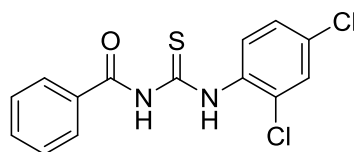
**Figura 9.** Exemplos de compostos relacionados como eficientes inibidores de urease de *Canavalia ensiformis*.

Recentemente, as tioureias também foram relatadas como excelentes inibidores de ureases em estudos *in vitro*. O primeiro estudo data de 2013, onde a inibição de urease provocada por híbridos sulfanilamida-tioureia revelaram 19 compostos com potencial de inibição maior que a tioureia ( $K_i = 22,3 \mu\text{M}$ ), sendo que os três compostos mais ativos apresentaram um  $K_i$  na faixa de 0,20 a 0,45  $\mu\text{M}$  (Figura 10) (SAEED et al., 2013).



**Figura 10.** Híbridos sulfanilamida-tioureia e seus respectivos  $K_i$ 's. (SAEED et al., 2013).

Rauf e colaboradores relataram, também em 2013, a inibição de urease provocada por tioureias *N,N'*-dissubstituídas derivadas de ácido benzóico. Neste estudo foram testados 26 compostos, onde 14 destes revelaram-se mais potentes que a tioureia ( $\text{IC}_{50} = 22,3 \mu\text{M}$ ). O composto mais promissor foi a (*N*-benzoil-*N'*-2,4-clorofeniltioureia (Figura 11), que apresentou um  $\text{IC}_{50}$  de 1,67  $\mu\text{M}$  inibindo a urease através de um mecanismo competitivo (RAUF et al., 2013).



$$IC_{50} = 1,67 \mu\text{M}$$

**Figura 11.** Benzoiltioureia mais ativa no estudo relatado por RAUF et al., 2013.

A capacidade inibitória de ureases provocada por benzoiltioureias também foi relatado recentemente por Saeed e colaboradores (2014), neste estudo uma série de etil-(4-(benzoiltioureido)-benzoatos apresentaram excelentes níveis de inibição frente à urease de *Canavalia ensiformis* (Figura 12), sendo os melhores resultados expressos para os compostos 4-metoxi e 3,4-metoxi benzoilsubstituídos ( $IC_{50}$  de 0,21 e 0,13  $\mu\text{M}$ , respectivamente) (SAEED et al., 2014).

| R                    | Inibição ( $IC_{50}$ ) |
|----------------------|------------------------|
| H                    | 0,51                   |
| 3-Cl                 | 0,26                   |
| 2,4-Cl               | 0,28                   |
| 4-CH <sub>3</sub>    | 0,67                   |
| 3-CH <sub>3</sub>    | 1,07                   |
| 4-OCH <sub>3</sub>   | 0,21                   |
| 3,4-OCH <sub>3</sub> | 0,13                   |
| 2-Br                 | 0,35                   |
| 2-OCH <sub>3</sub>   | 0,47                   |
| 2-F                  | 0,73                   |
| Tioureia             | 20,3                   |

**Figura 12.** Potencial de inibição *in vitro* de urease ( $IC_{50}$   $\mu\text{M}$ ) provocada por benzoiltioureias. (adaptado de SAEED et al., 2014).

Além disso, estudos recentes desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa revelam que benzoiltioureias atuam como inibidores de ureases presentes em solo (BRITO et al., 2013). Ressaltando ainda mais o grande potencial desta classe de compostos para aplicação em fertilizantes a base de ureia.

### 1.3 ESTUDO DE INTERAÇÃO LIGANTE-MACROMOLÉCULA POR TÉCNICAS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A espectroscopia de RMN é uma ferramenta valiosa para o estudo de interações moleculares em solução. Ela se consolidou como uma técnica essencial para caracterizar eventos de reconhecimento molecular e obtenção de

informações sobre interações de pequenos ligantes com macromoléculas biologicamente relevantes (proteínas, enzimas e ácidos nucleicos). Técnicas de RMN para triagem de ligantes e determinação da conformação de um ligante em seu estado ligado são ferramentas importantes no processo de planejamento racional de fármacos (MEYER e PETERS, 2003). Neste contexto, técnicas de diferença de transferência de saturação (STD), water-LOGSY e DOSY são utilizadas frequentemente para caracterizar complexos ligante/macromolécula (MEYER e PETERS, 2003).

### 1.3.1 Diferença de Transferência de Saturação (STD)

A técnica de diferença de transferência de saturação (do inglês: *Saturation Transfer Difference*, STD) tem sido utilizada como uma forma de triagem por novos compostos bioativos, em sistemas que podem envolver um único ligante na solução com a macromolécula ou misturas complexas que pode envolver dezenas de moléculas, com o objetivo de identificar aquelas que possuem maior afinidade pela macromolécula. A aplicação mais difundida relaciona-se à identificação de estruturas protótipo com mapeamento das porções do ligante que são mais importantes para a ligação com a macromolécula (MAYER e MEYER, 1999; MAYER e MEYER, 2001; MEYER e PETERS, 2003).

Benoni e colaboradores (2016) utilizaram a técnica de STD para estudos de inibição da enzima sulfidrilase O-acetilserina, que catalisa a última etapa da biossíntese de cisteína em bactérias e está envolvida com o processo de resistência bacteriana e formação de biofilme. Utilizando técnicas complementares (REA e *docking*) os autores conseguiram mapear como ocorre a interação entre isoenzimas isoladas de *Salmonella typhimurium* e um inibidor pentapeptídico (denominado MNYDI) (BENONI et al., 2016). Em estudos similares, Brandão e colaboradores (2017) mapearam as interações envolvidas entre mucina (glicoconjugados produzidos por tecidos epiteliais, responsável pela viscosidade do muco) e procianidinas utilizando a técnica de STD, onde observou-se que estas interações podem comprometer as funções lubrificantes da mucina (BRANDÃO et al., 2017). Estes estudos exemplificam o potencial de aplicação da técnica de STD para estudos de interação entre ligantes e macromoléculas.

A técnica de STD foi desenvolvida por Mayer e Meyer e tem como fundamento a transferência de saturação da proteína para o ligante em contato íntimo com esta ( $\leq 5 \text{ \AA}$ ). O ligante, por sua vez, quando se dissocia do complexo mantém a saturação recebida, que pode ser então detectada e quantificada (MAYER e MEYER, 1999). O fenômeno envolvido nos experimentos de STD é o efeito nuclear Overhauser (NOE), que através de difusão de spin, transfere NOE da proteína para o ligante. Isto ocorre de uma forma muito eficiente, devido ao fato de que moléculas grandes (como as proteínas) possuem NOE negativo, difusão lenta e tempos de relaxação curtos (devido ao fato de serem ricas em núcleos H). O ligante, que pode ser considerado como um aceptor de magnetização devido à sua relaxação relativamente lenta e a sua difusão rápida, é capaz de armazenar a saturação recebida por tempo suficiente até que possa ser detectada (VIEGAS et al., 2011; FIGUEIREDO e MARSALOLI, 2007).

A ligação de uma molécula pequena (ligante) a uma macromolécula grande (proteínas), de uma maneira simplificada, possui uma cinética de segunda ordem. Com a associação do ligante (L) à macromolécula (P) gera-se o complexo LP, em um estado de equilíbrio, que pode ser descrito através das taxas de  $k_{on}$  (associação) e  $k_{off}$  (dissociação) (Equação 1) (MEYER e PETERS, 2003).



Assim, a constante de dissociação ( $K_D$ ) pode ser expressa através das concentrações das espécies em solução, que também podem ser representadas através das taxas de  $k_{on}$  e  $k_{off}$  (Equação 2) (MEYER e PETERS, 2003).

$$K_D = \frac{[L][P]}{[LP]} = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (2)$$

No experimento de STD, durante o tempo de irradiação da proteína com pulsos seletivos, a energia é rapidamente transferida para uma população de ligantes levando à saturação de seus sinais de RMN de  $^1\text{H}$ . Portanto, o uso de ligante em excesso é necessário para que um sítio de ligação da macromolécula seja capaz de saturar várias moléculas em um curto período de tempo (de alguns segundos), sendo que a transferência de saturação ocorre somente para moléculas ligadas à macromolécula (complexo PL) com uma taxa que depende da mobilidade da macromolécula, tempo de vida do complexo ligante/macromolécula e da geometria do complexo (MEYER e PETERS, 2003; MAYER e MEYER, 2001).

A presença de ligante em excesso propicia um aumento na sensibilidade do experimento e permite a utilização de soluções de proteínas diluídas (em concentrações na ordem de  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Isto é uma vantagem, visto que a grande maioria das proteínas são de difícil purificação ou possuem custos elevados. Normalmente, para cada sistema, devem ser otimizados a proporção ligante-proteína e o tempo de saturação de acordo com o  $K_D$  (VIEGAS et al., 2011).

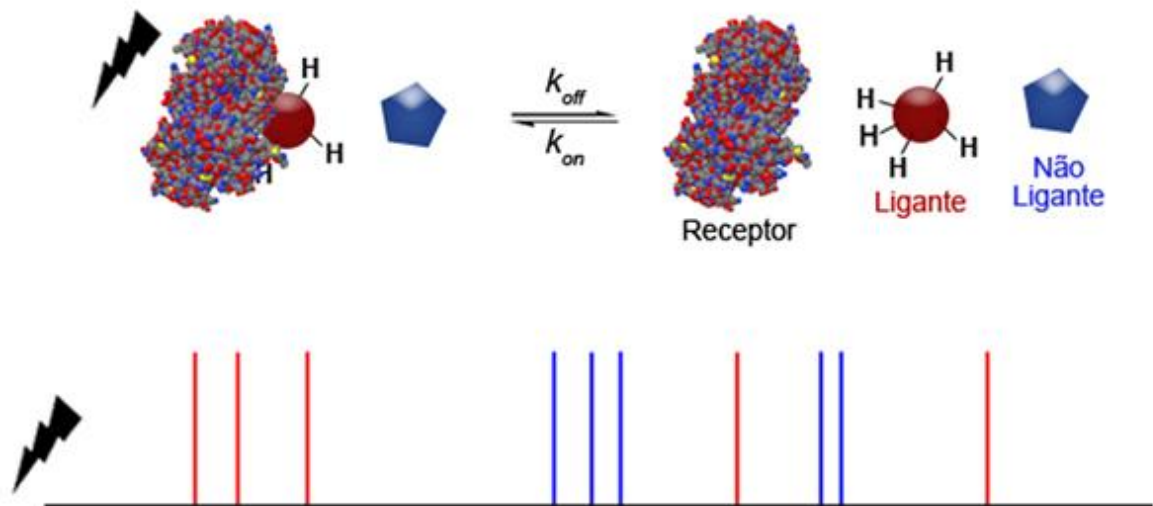
Neste sentido, a detecção do efeito STD depende do valor de  $K_D$  estar em uma faixa entre  $10^{-3}$  a  $10^{-8}$   $\text{mol.L}^{-1}$ . Se o valor de  $K_D$  for maior que  $10^{-3}$   $\text{mol.L}^{-1}$ , o ligante não irá permanecer tempo suficiente ligado à proteína para se tornar saturado (MAYER e MEYER, 2001).

Outro processo que limita a aplicação do STD em sistemas com valores de  $K_D$ 's menores que  $10^{-8}$  é a taxa de relaxação da magnetização que é alta para a proteína e baixa para moléculas pequenas. Assim, o complexo LP se comporta como uma única espécie, e como consequência, a taxa de relaxação dos sinais do ligante no complexo é muito mais alta do que no estado livre. Devido a este processo, a velocidade de dissociação ( $k_{off}$ ) do ligante deve ser maior do que a taxa de relaxação da magnetização, caso contrário, a magnetização gerada é perdida antes que se acumule uma população satisfatória de ligantes livres saturados passíveis de detecção. Portanto, o tempo de permanência máxima do ligante no sítio da macromolécula, é também dependente da taxa de relaxação da macromolécula (VIEGAS et al., 2011).

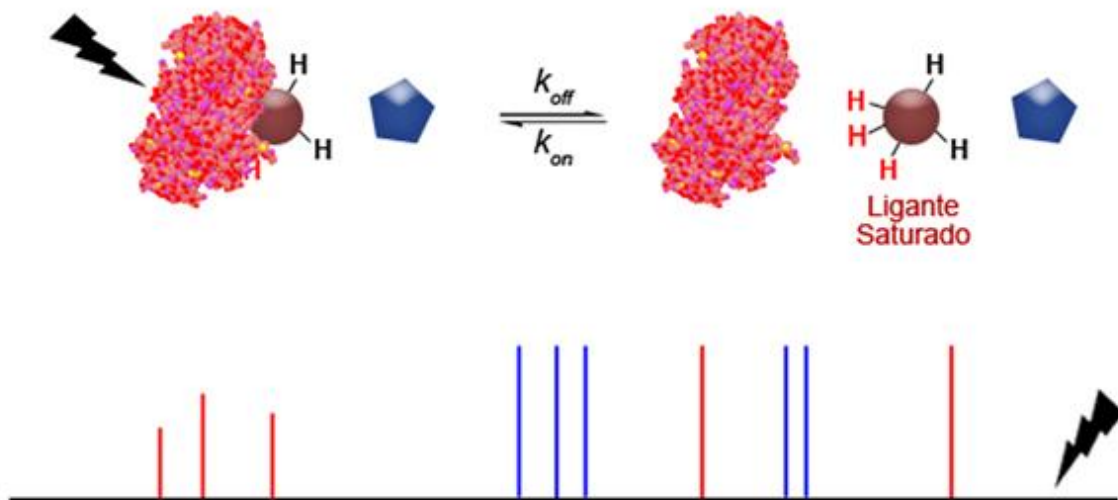
Na aquisição do espectro de STD (Figura 13) são obtidos dois conjuntos de espectros com as mesmas condições experimentais: um sem saturação da proteína (espectro fora de ressonância ou  $\text{STD}_{off}$ , normalmente utilizado como referência), através da irradiação em uma região do espectro onde se verifica ausência de quaisquer ressonâncias do sistema, geralmente na faixa de 20 a 50 ppm (sendo a intensidade de cada sinal denominado como  $I_0$ ); e outro com saturação seletiva da proteína (espectro em ressonância ou  $\text{STD}_{on}$ ), obtido através da irradiação em uma região espectral que contém apenas ressonâncias da macromolécula/proteína, geralmente entre -1 a 1 ppm, fornecendo um espectro com as intensidades de sinais saturados ( $I_{SAT}$ ). Os espectros ( $\text{STD}_{on}$  e  $\text{STD}_{off}$ ) são obtidos de forma alternada, minimizando as pequenas variações que podem ocorrer durante a aquisição do experimento. Finalmente, a subtração do espectro fora de

ressonância do espectro em ressonância ( $I_{STD} = I_0 - I_{SAT}$ ) fornece o espectro de diferença, ou  $STD_{diff}$  (MAYER e MEYER, 2001; VIEGAS et al., 2011).

(a) Experimento fora de ressonância (irradiação distante de qualquer ressonância do sistema):



(b) Experimento em ressonância (irradiação seletiva da proteína):



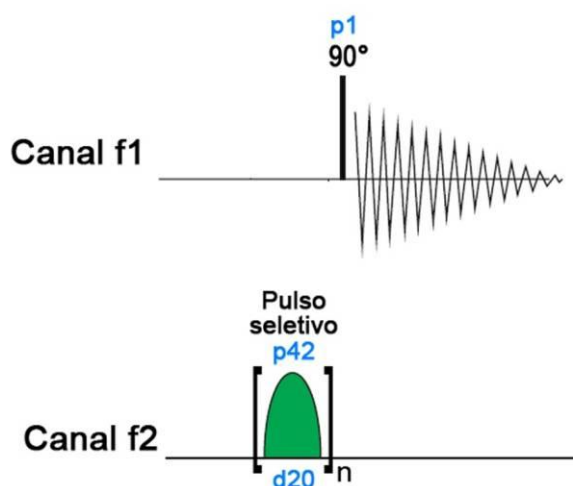
(c) Espectro de diferença



**Figura 13.** Representação esquemática do experimento de STD, evidenciando o efeito causado pela saturação seletiva da proteína em compostos ligantes e não-ligantes. (a) Experimento fora de ressonância e respectivo espectro ( $STD_{off}$ ), obtido com irradiação em uma região com ausência de quaisquer ressonâncias do sistema, por exemplo, 50 ppm; (b) Experimento em ressonância e respectivo espectro ( $STD_{on}$ ), obtido com irradiação seletiva da proteína, usualmente entre -1 a 1 ppm. (c) Espectro de diferença ( $STD_{diff}$ ), obtido através da subtração dos espectros: ( $STD_{off}$ ) - ( $STD_{on}$ ).

No espectro de diferença (Figura 13c), apenas os sinais dos átomos de hidrogênio dos ligantes que fizeram parte do complexo ligante-proteína e que receberam a transferência de saturação da proteína irão permanecer, estes também terão intensidade de sinal dependentes da proximidade que estiveram com a proteína, devido à transferência de saturação mais ou menos eficaz. Se outros compostos estiverem presentes, mas não ligarem-se à macromolécula, seus sinais serão de igual intensidade nos espectros  $STD_{off}$  e  $STD_{on}$ , e serão suprimidos após a subtração, não aparecendo no espectro de  $STD_{diff}$  (MAYER e MEYER, 2001; VIEGAS et al., 2011).

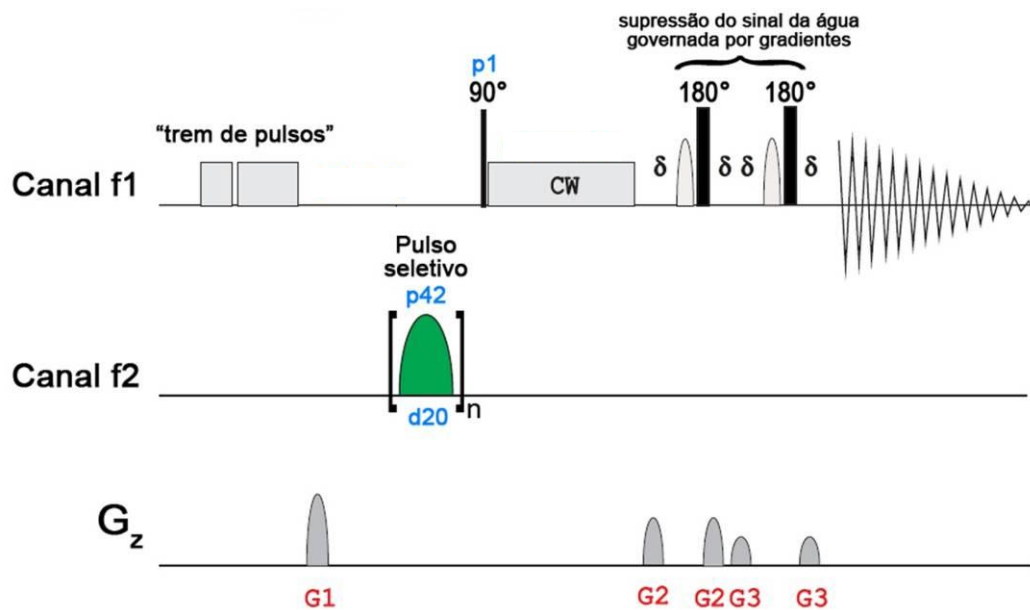
A sequência de pulsos básica do experimento de STD (Figura 14) consiste em um pulso de  $90^\circ$  seletivo para núcleos de  $^1H$  da proteína (canal f2) que é repetido  $n$  vezes durante todo o tempo de saturação (d20), e um pulso duro de excitação/aquisição de  $90^\circ$  (canal f1). O número de repetições do tempo de saturação é calculado automaticamente na sequência de pulsos através da divisão de  $d20/p42$  (ROWE et al., 2015).



**Figura 14.** Diagrama da sequência de pulsos do experimento básico de STD. **p1**: pulso de aquisição; **p42** e **d20**: potência e duração do pulsos seletivo; **n**: número de repetições do pulso p42 (Adaptado de PARELLA, 2004)

Ao longo dos anos, uma série de benefícios foram incorporados na sequência de pulsos do experimento de STD, sendo que atualmente em geral utiliza-se uma trava de spins  $T_2$  (CW, com duração de 50 a 10 ms, dependendo do tamanho da macromolécula) para suprimir os sinais da proteína, com o objetivo de fornecer uma linha de base mais limpa e tornar os sinais do ligante mais evidentes

(Figura 15) (ROWE et al., 2015). Os gradientes de campo pulsado no eixo z ( $G_z$ ) tem como função remover quaisquer sinais indesejados e governar a supressão do sinal de água pelo utilização de pulsos de excitação seletiva (do inglês, *excitation sculpting*). No início da sequência também foram incorporados dois “trens de pulsos” responsáveis por desfocalizar qualquer magnetização transversal remanescente (ROWE et al., 2015).



**Figura 15.** Diagrama da sequência de pulsos do experimento de STD (stddiffesgp.3).  $p1$ : pulso de aquisição;  $CW$ : trava de spins  $T_2$ ;  $\delta$ : atraso para a recuperação do gradiente;  $p42$  e  $d20$ : potência e duração do pulso seletivo;  $n$ : número de repetições do pulso  $p42$ ;  $G1$ ,  $G2$  e  $G3$ : gradientes de campo pulsado. (Adaptado de PARELLA, 2004).

Uma das variáveis que se deve ter em mente antes da configuração do experimento de STD é a relaxação, que pode ser definida como a taxa com que as populações de spins afetadas pela magnetização, relaxam e retornam ao seu estado de equilíbrio. Este processo é definido por duas componentes: relaxação longitudinal ou spin-rede ( $T_1$ ) e relaxação transversal ou spin-spin ( $T_2$ ).  $T_1$  é basicamente a redistribuição das populações dos estados de spin nucleares com a finalidade de se atingir a distribuição de equilíbrio térmico, este processo envolve uma variedade de mecanismos de relaxamento que permitem que os spins nucleares troquem energia com seu ambiente e as populações de spin se equilibrem.  $T_2$  é a perda de coerência transversal da magnetização entre os spins nucleares excitados e envolve a transferência de energia para núcleos vizinhos, que

levam a variações na frequência de precessão dos spins, até que as fases estejam desordenadas. Nos experimentos de RMN,  $T_1$  é associado à intensidade do sinal e  $T_2$  à largura deste, sendo que  $T_1$  é maior que  $T_2$  (LEVITT, 2008).

Neste sentido, como uma regra geral, o valor da soma do tempo de espera entre cada aquisição e o tempo de cada aquisição deve estar na faixa entre 1 e 5 vezes o valor de  $T_1$  mais longo do ligante permitindo assim uma completa recuperação da magnetização deste, que refletirá em um valor máximo de efeito STD detectado. Caso contrário, a saturação remanescente de uma aquisição irá permanecer durante a aquisição seguinte, ocasionando uma redução na intensidade das ressonâncias do ligante (ROWE et al., 2015).

#### 1.4 DESCRIÇÃO E RELEVÂNCIA DA TUBERCULOSE

A tuberculose é uma das mais antigas enfermidades que afetam o homem, sendo que algumas evidências paleontológicas sugerem que desde 3700 a.C. o homem convive com esta doença (ROSEMBERG, 1999).

A tuberculose é causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, que infecta principalmente os pulmões, embora também possam ocorrer formas extrapulmonares, menos incidentes, afetando principalmente os rins, coluna vertebral e cérebro. A transmissão se dá pelo ar, através de aerossóis expelidos durante os atos de tosse, fala ou espirro. Os principais sintomas da doença em sua forma pulmonar são: tosse crônica (por mais de duas semanas), febre, sudorese noturna, falta de apetite, perda de peso e falta de disposição (FERREIRA et al., 2007).

Comumente a tuberculose é classificada em latente ou ativa, sendo que a forma latente da doença é caracterizada pela presença da bactéria no organismo mas que permanece em uma forma não ativa e não transmissível, sendo que o paciente também não apresenta sinais da doença. Na sua forma ativa, o paciente apresenta sintomas da doença e é transmissível (KAUR et al., 2016a).

A infecção da tuberculose ocorre quando a micobactéria entra em contato com os macrófagos dos alvéolos pulmonares, onde pode se replicar livremente utilizando múltiplos receptores da superfície celular. Inicialmente, a micobactéria se replica dentro do endossoma dos macrófagos, passando em seguida para os gânglios linfáticos (linfonodos). Na sequência, algumas células

(macrófagos, linfócitos B, linfócitos T e fibroblastos) se combinam formando glanulomas adjacentes aos macrófagos infectados (KAUR et al., 2016b). A infecção latente da tuberculose se caracteriza pela não formação dos glanulomas, sendo que a micobactéria permanece na sua forma inativa, podendo se converter na forma ativa em um momento oportuno (KAUR et al., 2016a).

As lesões secundárias da tuberculose podem ocorrer em qualquer parte do corpo, mas normalmente se apresentam nos pulmões, gânglios linfáticos periféricos, cérebro, rins e ossos, muito raramente também podem afetar o coração, pâncreas, músculos esqueléticos e tireóide (KAUR et al., 2016c).

A cada ano milhões de pessoas são contaminadas com esta doença, sendo que os habitantes de países em desenvolvimento são os mais afetados (ROSEMBERG, 1999). Em 2015, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que houve mais de 10,4 milhões de novos casos de tuberculose em todo o mundo, sendo 56% destes relatados em homens, 34% em mulheres e 10% em crianças. No mesmo ano, a tuberculose foi considerada como uma das principais causas de mortes infecciosas em todo o mundo, com uma estimativa de 1,4 milhões de mortes, o que a insere acima da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA - 1,1 milhões de óbitos) no *ranking* de mortes causadas por agentes infecciosos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Em portadores de SIDA, a tuberculose é considerada como uma das infecções mais oportunistas, debilitando rapidamente os pacientes nestas condições. Uma estimativa da OMS relata que em 2015, cerca de 1,2 milhão de pessoas portadores da SIDA foram infectadas com tuberculose, e adicionalmente 0,4 milhão vieram a óbito (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

No Brasil, foram registrados em 2015, mais de 63 mil novos casos de tuberculose, afetando 30,9 em cada 100 mil habitantes. Também neste ano, foi relatado um índice de cura de 74,2%, sendo que o número de óbitos foi de 4.374. Neste cenário, os estados mais afetados são Amazonas, Rio Grande do Sul, Pernambuco e Rio de Janeiro, onde suas capitais correspondem a 36,6% do total de novos casos diagnosticados no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

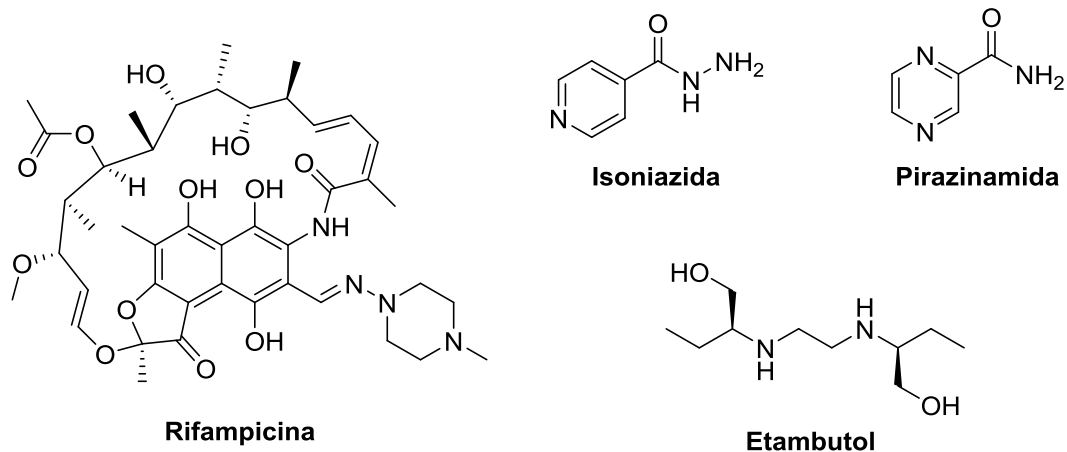
#### 1.4.1 Tratamento e desenvolvimento de novos fármacos contra a tuberculose

O primeiro medicamento relatado como eficaz frente ao

*Mycobacterium tuberculosis* foi a estreptomicina, isolada do fungo *Streptomyces griseus* na década de 1940. Apesar de fomentar a esperança de cura da tuberculose, em um curto período de tempo foi constatado que o uso isolado de estreptomicina induzia rapidamente a resistência micobacteriana, tornando o fármaco ineficaz após um período de aproximadamente 3 meses de administração (ZUMLA et al., 2013).

Na década de 1950 foi descoberta uma série de novos medicamentos contra a tuberculose, como o ácido *p*-aminosalicílico, isoniazida, pirazinamida, cicloserina e kanamicina, que abriu caminho para a terapia combinada. Sendo adotado como tratamento padrão até 1955, a administração concomitante de streptomicina, ácido *p*-aminosalicílico e isoniazida. Naquela época, com uma duração de cerca de 18 meses (KHAINAR et al., 2012).

Na década de 1960, a rifampicina foi introduzida na prática clínica, permitindo uma redução no tempo de tratamento para 9 meses. O tratamento atualmente preconizado pela OMS para novos casos de tuberculose utiliza isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida (Figura 16), por um período de seis meses, sendo que nos dois primeiros meses são administrados os quatro fármacos diariamente, para uma redução rápida da carga bacteriana, e nos últimos quatro meses, passa-se a administrar somente a izoniazida e rifampicina diariamente ou três vezes por semana, visando impedir a reativação da doença e eliminar os bacilos persistentes (KAUR et al., 2016a). Se seguido criteriosamente, as chances de sucesso deste regime de tratamento são de pelo menos 95% (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

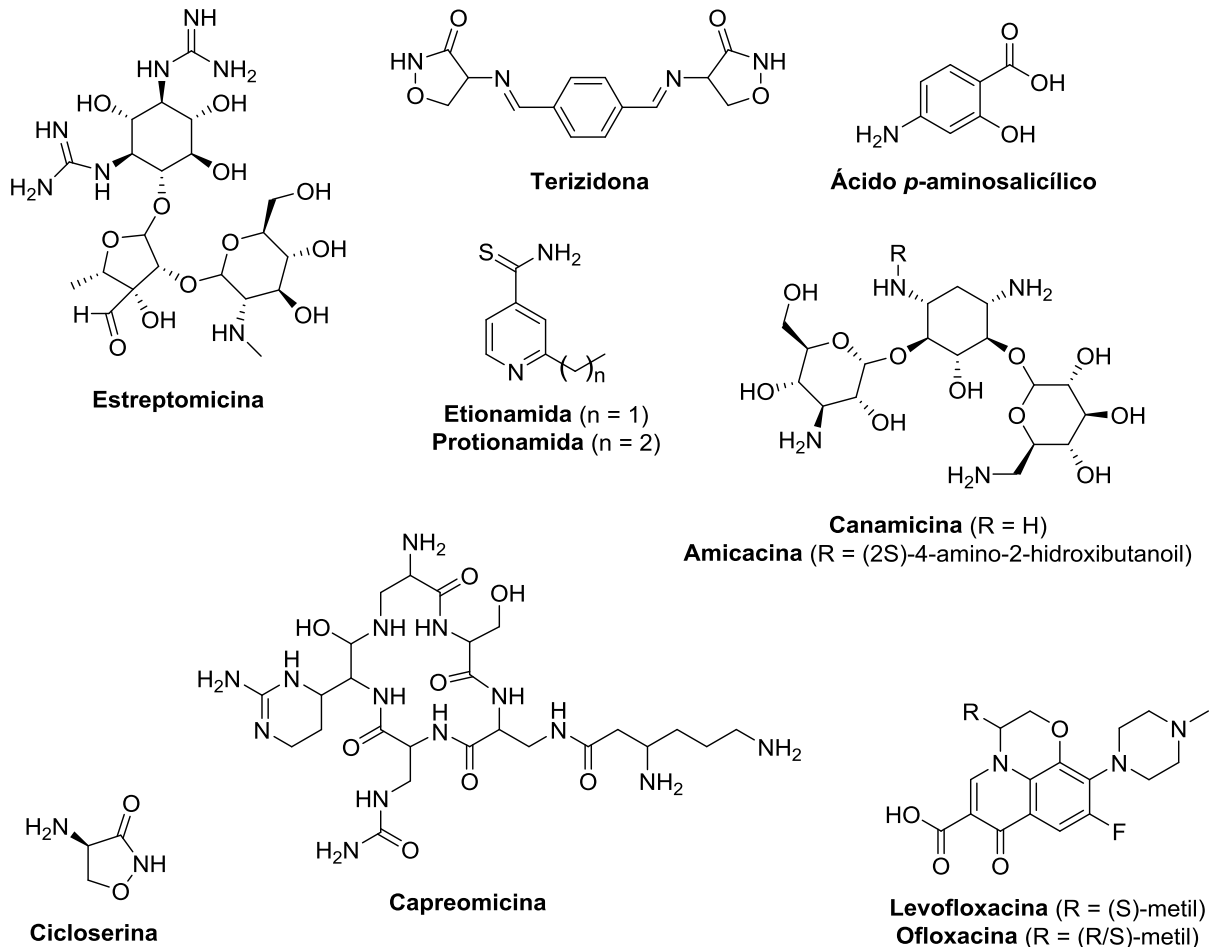


**Figura 16.** Fármacos de primeira escolha utilizados no tratamento de tuberculose pulmonar ativa.

Apesar da alta probabilidade de cura, a taxa de abandono do tratamento é relativamente elevada, sendo ocasionada principalmente pelo longo período de tratamento e efeitos adversos causados pelos medicamentos. Esta informação se revela como preocupante, pois é considerada como o principal causador da resistência do *Mycobacterium* frente aos fármacos (SOUZA, 2009).

Os primeiros casos de tuberculose resistente foram relatados no final da década de 1940, entretanto apenas após 1990 a resistência bacilar foi tratado como um problema de saúde pública, devido ao aparecimento de surtos de tuberculose multirresistentes (TB-MDR) aos fármacos de primeira escolha. As maiores taxas de multiresistência ocorrem para a rifampicina e isoniazida, que são justamente os fármacos mais eficientes no tratamento de tuberculose (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

O tratamento de tuberculose restitente a rifampicina (TB-RR) e TB-MDR é mais longo e requer fármacos mais tóxicos, de alto custo e na maioria dos casos menos eficientes. Até o início de 2016, a OMS preconizava um período de 20 meses para o tratamento de TB-MDR pulmonar, utilizando inicialmente quatro fármacos de segunda escolha (Figura 17), sendo que na fase de continuação poderia ser reduzido para três, entretanto, a partir de maio de 2016 emitiu uma orientação atualizada recomendando um regime de 9-12 meses (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).



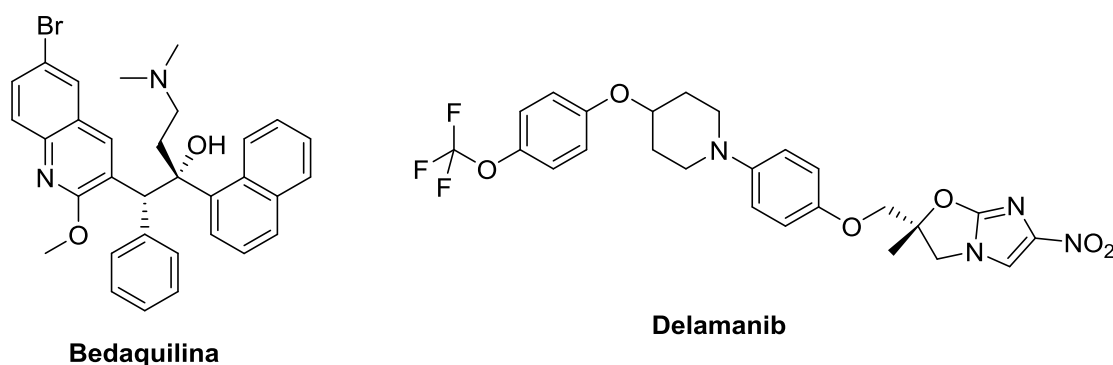
**Figura 17.** Fármacos de segunda escolha utilizados no tratamento de tuberculose resistente.

Quando um bacilo TB-MDR adquire resistência também às fluoroquinolonas (levofloxacina e ofloxacina) e fármacos injetáveis de segunda escolha (canamicina, amicacina e capreomicina) geram-se as cepas denominadas de TB extremamente resistentes (TB-XDR), cujos índices de cura são de 50 a 60% (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Dependendo do nível de resistência aos fármacos de segunda escolha, as infecções podem ser intratáveis e fatais em casos de SIDA concomitante (MATTEELLI, 2014). Em 2015, 7.579 casos de tuberculose extremamente resistente foram diagnosticados em 74 países (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016), revelando a extensão deste problema.

Apesar dos dados revelarem uma situação preocupante, nenhuma nova classe de fármacos antituberculose prima-infecção foi inserida no mercado nos últimos 50 anos. Isto é devido principalmente ao desinteresse da indústria farmacêutica em desenvolver estes fármacos, que necessitam altos investimentos e, normalmente, geram baixos retornos financeiros. Entretanto, após o ano de 2000,

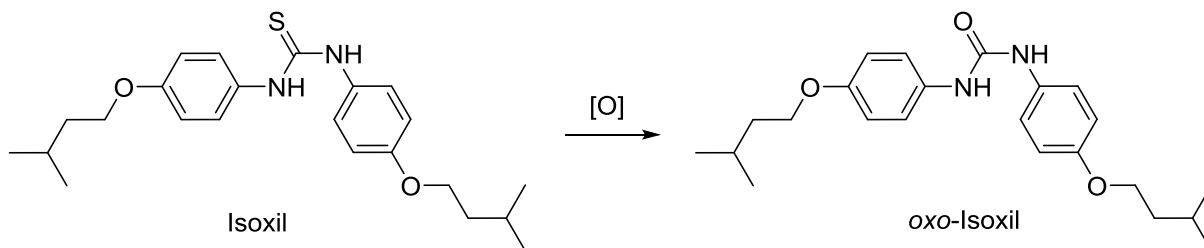
uma série de agentes anti-infecciosos, desenvolvidos para tratamento de diversas doenças, tem sido avaliados para o tratamento da tuberculose. Neste sentido destacam-se algumas fluoroquinolonas, rifamicinas, oxazolidinonas e beta-lactâmicos (ZUMLA et al., 2013).

Esses esforços culminaram no licenciamento e autorização para comercialização de dois novos fármacos, sendo estes o delamanib e a bedaquilina (Figura 18), destinados inicialmente ao tratamento de TB-MDR/XDR em adultos. No entanto, a toxicidade destes fármacos é relativamente elevada e existem algumas incertezas quanto à segurança destes medicamentos, que devem ser sanadas através de estudos a longo prazo (COX e LAESSIG, 2014; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2013).



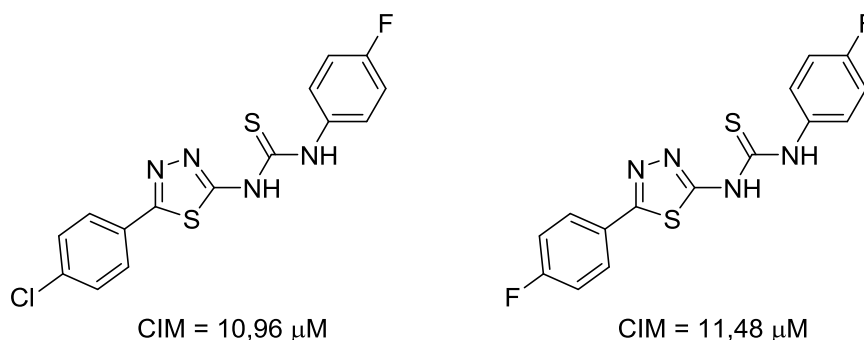
**Figura 18.** Estrutura de novos fármacos anti-tuberculose: bedaquilina e delamanib.

O isoxil ou tiocarlida é uma tioureia que apresenta uma estrutura simétrica e é reconhecido como um potente fármaco para o tratamento da tuberculose multirresistente, sendo sua atividade revelada na década de 1950. Entretanto, seu uso no tratamento clínico da tuberculose foi descontinuado, aparentemente devido à sua baixa solubilidade em meio polar que por consequência reduz a biodisponibilidade do fármaco (WANG e HICKEY, 2010). Estudos sugerem que o isoxil é oxidado em meio biológico formando sua ureia correspondente (Figura 19), que aparentemente possui uma maior atividade sobre a tuberculose (NISHIDA e MONTELLANO, 2011).



**Figura 19.** Representação da conversão do isoxil em oxo-isoxil.

Algumas séries de tioureias também são relatadas com relevante potencial antituberculose. Neste sentido, destacam-se os híbridos tiourea-tiadiazóis (Figura 20) planejados pela sua homologia com o isoxil, estes compostos apresentam inibição do crescimento de *Mycobacterium tuberculosis* (cepa H37Rv) com valores de concentração inibitória mínima (CIM) entre 170,7 a 10,96  $\mu\text{M}$  (KARAKUS e ROLLAS, 2002; TATAR et al., 2016).



**Figura 20.** Híbridos tioureias-tiadiazóis mais ativos frente ao *Mycobacterium tuberculosis*.

A atividade antituberculose apresentada para os derivados de tiourea (incluindo o isoxil), revelam um potencial para o desenvolvimento de novos compostos ativos frente ao *Mycobacterium tuberculosis*, sendo esta abordagem (baseada no núcleo tiourea) pouco explorada na literatura.

Diante do cenário atual, o desenvolvimento de novos fármacos mais potentes, seletivos e eficientes para combater a tuberculose, bem como suas cepas resistentes, se faz necessário para um controle da doença, que vem apresentando a cada ano novos casos de resistência.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de tioureias com atividade inibitória contra ureases de solo para aplicação como aditivo em formulações de fertilizante agrícola, bem como atividade antimicobacteriana, visando o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da tuberculose.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Síntese de benzoiltioureias, caracterização estrutural e avaliação de suas capacidades inibitórias *in vitro* contra urease proveniente de *Cannavalia ensiformis*.

Estudos cinéticos de inibição da urease de *Cannavalia ensiformis* utilizando-se de ensaios bioquímicos convencionais.

Avaliação da capacidade inibitória das benzoiltioureias frente a ureases presentes em amostras de solo.

Avaliar o potencial da técnica de STD como ferramenta para mapear as porções das benzoiltioureias que interagem com a urease de *Cannavalia ensiformis* e estabelecer se a técnica pode ser utilizada como parâmetro para orientar a triagem de compostos em busca de novos inibidores de ureases.

Planejamento racional, síntese e caracterização estrutural de benzoiltioureias com foco na avaliação do potencial antituberculose.

Estudo de relação estrutura-atividade (REA) das benzoiltioureias sintetizadas frente ao *Mycobacterium tuberculosis*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

Os solventes de grau análise foram utilizados sem nenhum tratamento prévio. A acetona foi seca sobre peneira molecular 3Å por 6-18 h antes do uso. Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho Microquímica MQAPF 302. Os espectros de infravermelho ( $400-4000\text{ cm}^{-1}$ ) foram obtidos em discos de KBr em um instrumento Shimadzu FT-IR modelo 8300. Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Bruker modelo Avance III operando a 400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$  equipado com sondas multinucleares de 5 mm. Estes espectros foram registrados utilizando  $\text{CDCl}_3$  ou  $\text{DMSO-}d_6$  como solventes e TMS como padrão interno. Para calibração dos espectros RMN de  $^1\text{H}$  foram adotados os valores de 0,00 ppm para TMS, 7,26 ppm para  $\text{CDCl}_3$  ou 2,50 ppm para  $\text{DMSO-}d_6$ . Para os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram adotados os valores de 77,16 ppm para  $\text{CDCl}_3$  ou 39,52 ppm para  $\text{DMSO-}d_6$ .

Os sinais observados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , foram descritos como simpleto (s), duplete (d), tripleto (t), quarteto (q) e multiplete (m). As constantes de acoplamento ( $J$ ) foram relatadas em Hz.

#### 3.2 MÉTODOS

##### 3.2.1 Síntese de tioureias $N,N'$ -substituídas

As tioureias  $N,N'$ -substituídas foram sintetizadas de acordo com a metodologia descrita por Otazo-Sánchez et al. (2001), com algumas modificações.

**Procedimento geral:** O cloreto de benzoíla adequado (11 mmol) foi adicionado a uma solução de tiocianato de amônio (11 mmol) em acetona seca (25 mL). A mistura de reação foi mantida sob agitação e refluxo por 15 minutos. Em seguida, esta foi resfriada até temperatura ambiente e, então, adicionou-se uma solução da amina (11 mmol) em acetona (10 mL). O meio reacional foi mantido sob refluxo por mais 30 minutos e, em seguida, esse foi vertido em um béquer contendo gelo picado sob

vigorosa agitação. O sólido resultante foi filtrado, lavado com água deionizada e em seguida recristalizado em etanol ou etanol/acetona.

### 3.2.2 Análise termogravimétrica

As medições termogravimétricas foram realizadas sob responsabilidade do Prof. Ângelo de Fátima na Universidade Federal de Minas Gerais (Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química) em um Analisador Termogravimétrico Shimadzu TGA-50, de acordo com Da Silva et al. (2013), utilizando um fluxo de ar comprimido ( $50 \text{ mL min}^{-1}$ ) e uma taxa de aquecimento de  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  por minuto. As curvas de variação de peso foram registradas entre  $30$  e  $500 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.2.3 Teste de inibição da urease de *Canavalia ensiformis*

O rastreio para identificação de potenciais inibidores de urease foi realizado sob responsabilidade da Prof<sup>a</sup> Pesquisadora Luzia Valentina Modolo na Universidade Federal de Minas Gerais (Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica).

Os testes de inibição da urease foram realizados utilizando o método indofenol (WEATHERBURN, 1967). Cada benzoiltioureia à concentração final de  $500 \text{ } \mu\text{M}$  foi incubada em um meio de reação tamponado com  $20 \text{ mM}$  de tampão fosfato ( $\text{pH } 7,4$ ) e suplementado com  $1 \text{ mM}$  de EDTA,  $10 \text{ mM}$  de ureia e  $12,5 \text{ mU}$  de urease *Canavalia ensiformis* tipo III (Sigma). As reações foram mantidas a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  por  $15$  minutos, seguido da adição de  $0,5$  volumes de solução  $1\% \text{ m/v}$  de fenol com  $5 \text{ ppm}$  de nitroprussiato de sódio (NPS) e  $0,7$  volumes de uma solução contendo  $0,5\% \text{ m/v}$  de NaOH com  $0,1\% \text{ v/v}$  NaOCl para interromper a atividade enzimática. Em seguida, as reações foram novamente incubadas a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  por  $5$  minutos antes do mensuramento da absorbância do meio a  $630 \text{ nm}$  para determinação da quantidade de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) formado. Hidroxiureia (HU) e tioureia (TU) foram utilizados como referência para inibidores de urease. A inibição de urease foi determinada em função da porcentagem de  $\text{NH}_4^+$  formado nas reações contendo as benzoiltioureas em relação à atividade total da urease nas reações desprovidas de inibidores.

### 3.2.4 Ensaio cinético com urease de *Canavalia ensiformis*

Os ensaios cinéticos foram realizados sob responsabilidade da Prof<sup>a</sup> Pesquisadora Luzia Valentina Modolo na Universidade Federal de Minas Gerais (Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica).

O efeito das benzoiltioureias sintetizadas nos parâmetros cinéticos de urease de *Canavalia ensiformis* tipo III foi investigado monitorando a formação de  $\text{NH}_4^+$  nas reações contendo ou não as benzoiltioureias em uma concentração necessária para inibir a atividade enzimática em 30-40% (250 a 500  $\mu\text{M}$ ) e aumentando a concentração de ureia (1 a 32 mM). O procedimento foi similar ao descrito no teste de inibição *in vitro*, exceto que o tempo de reação foi reduzido para 5 minutos. Os parâmetros cinéticos para o meio livre de inibidor e para os meios contendo inibidor foram (benzoiltioureias) obtidos utilizando o software Hyper32. O software OriginPro 8 foi utilizado para obter as hipérboles de Michaelis-Menten e plotar os gráficos de Lineweaver-Burk para verificar o mecanismo pelo qual as BTUs inibem a atividade ureolítica da urease.

### 3.2.5 Ensaio de atividade inibitória de ureases contidas em amostra de solo

O efeito das benzoiltioureias sintetizadas na atividade de ureases presente na microbiota do solo foi realizado sob responsabilidade da Prof<sup>a</sup> Pesquisadora Luzia Valentina Modolo na Universidade Federal de Minas Gerais (Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica). Os resultados foram obtidos utilizando o método de salicilato (KANDELER e GERBER, 1988). O latossolo vermelho distrófico utilizado foi coletado no Cerrado Brasileiro (19°28'01.2"S, 44°10'24.5"W) sendo que suas propriedades físico-químicas determinadas foram as seguintes: pH 5,3, 2,2  $\text{mg L}^{-1}$  P, 30,3  $\text{mg L}^{-1}$  K, 2,5  $\text{cmol}_c \text{L}^{-1}$  Ca, 0,2  $\text{cmol}_c \text{L}^{-1}$  Mg, 0,4  $\text{cmol}_c \text{L}^{-1}$  Al, 9,1  $\text{cmol}_c \text{L}^{-1}$  H+Al, com um somatório das bases de 2,7  $\text{cmol}_c \text{L}^{-1}$ , com base de saturação de 23,2% e matéria orgânica de 6,0  $\text{dag kg}^{-1}$ . O solo peneirado (0,5 g; partículas < 2 mm) foi incubado com 72 mM de ureia em presença ou ausência de cada benzoiltioureia (0,5 mM) a 37 °C por 1 h. A atividade de ureases da microbiota foi interrompido pela adição de uma solução de KCl 1 M/HCl 10 mM (5 mL). Após 30 minutos de incubação a 25 °C, a fração sobrenadante foi coletada e adicionada a uma mistura constituída de salicilato de sódio a 3,4%, citrato de sódio a 2,5%, tartarato de sódio a 2,5% e 120 ppm de nitroprussiato de sódio. O sistema foi

incubado por 15 minutos adicionais em ambiente escuro. Após, adicionou-se a cada sistema 0,1 volume de uma solução composta de NaOH a 3,0% e hipoclorito de sódio a 1,0% incubando em seguida em ambiente escuro por 1 hora a 25 °C sob agitação (600 rpm). As medidas espectroscópicas foram realizadas a 660 nm para estimar a quantidade de  $\text{NH}_4^+$  formada no meio reacional. NBPT foi utilizado como referência para inibição de urease contida na microbiota do solo.

Os dados obtidos nos experimentos realizados com solo foram analisados através do teste ANOVA seguido de teste de contraste passo a passo ( $P < 0.001$ ) utilizando o software R.

### 3.2.6 Experimentos de STD – Sistema modelo (BSA-Triptofano)

Uma solução contendo BSA (20  $\mu\text{M}$ ) e L-triptofano (2 mM) foi preparada em tampão fosfato (75 mM, pH 7,4) utilizando  $\text{D}_2\text{O}$  como solvente, totalizando 600  $\mu\text{L}$  de solução no tubo de RMN.

Os espectros de STD foram obtidos utilizando os parâmetros padrões da sequência de pulsos `stddiffesgp.3` fornecidos pela Bruker®, com as seguintes modificações: formato do pulso (Gaussian1.1000) com um comprimento de 50 ms, tempo de saturação entre 0,5 e 4,0 s, com  $d_1$  variando de 1,5 a 5,0 s. A lista de irradiações foi configurada com quatro frequências: 400 (1 ppm), 20000 (50 ppm), 400 (1 ppm) e 20000 Hz (50 ppm), em modo alternado. Para obtenção dos espectros de STD, foi realizado o somatório dos espectros em ressonância (irradiação em 400 Hz) e o somatório dos espectros fora de ressonância (irradiação em 20000 ppm), que após subtração forneceram os espectros de STD finais.

### 3.2.7 Experimentos de STD – Sistema UCE-BTUs

Uma solução estoque de urease de *Canavalia ensiformis* (44,44  $\mu\text{M}$ ) foi preparada em tampão fosfato (20 mM, pH 7,4), utilizando  $\text{D}_2\text{O}$  como solvente. As soluções estoque das BTUs **1**, **2**, **3**, e **10** (20 mM) foram preparadas em metanol- $d_6$ .

As soluções utilizadas nos experimentos de STD foram obtidas através da mistura da solução estoque de urease (450  $\mu\text{L}$ ) com a solução estoque do inibidor em quantidade necessária (2 a 20  $\mu\text{L}$ ) para atingir a concentração desejada (0,2 a 2 mM), estas foram então suplementadas com metanol- $d_6$  até 10%

v/v deste solvente na mistura final que foi fixada em 500  $\mu$ L de volume total no tubo de RMN. A concentração do ligante em relação à proteína foi mantida na faixa de 10 a 100 vezes maior.

Nos experimentos de STD, foi utilizado a sequência de pulsos *stdiffesgp.3*, fornecida pela Bruker®. Na saturação da enzima utilizou-se um trem de pulsos seletivos com largura de 10 a 50 ms (forma do pulso *Gaussian1.1000* ou *Eburp2*) previamente calibrados, com intervalos de 1 ms e tempos de saturação de 0,5 a 5,0 s. A supressão da proteína foi realizada utilizando um filtro *spin-lock* com 25 ms. A irradiação da proteína foi realizada utilizando uma lista com quatro frequências: 2 experimentos com saturação seletiva da proteína (experimentos em ressonância; irradiação entre -1 a 1 ppm) e 2 pontos referência (experimentos fora de ressonância, sem saturação das espécies envolvidas no estudo; irradiação em 125 ppm), sendo estes alternados. A supressão do sinal residual da água foi realizada utilizando o método de excitação moldada governada por gradientes (do inglês: *excitation sculpting with gradients*) com formato de pulsos *Sinc1.1000* com 2 ms de largura, sendo o pulso previamente calibrado antes da realização de cada experimento de STD. Os experimentos foram realizados com 16 *dummy scans* e número de *scans* variável, conforme indicado em cada espectro da seção resultados e discussão.

Os FID's foram obtidos de modo alternado (conforme a lista de frequências de irradiações), sendo o primeiro fora de ressonância, o segundo em ressonância, o terceiro fora de ressonância e o quarto em ressonância. Para obtenção dos espectros de STD, os dois experimentos em ressonância foram somados e o resultado salvo; os outros dois espectros fora de ressonância também foram somados e salvos, e na sequência o espectro somatório fora de ressonância, foi subtraído do espectro somatório em ressonância (onde ocorre o efeito de transferência de saturação), para fornecer o espectro de STD final.

Todos os espectros de STD obtidos foram calibrados em relação ao sinal residual do metanol- $d_6$  (3,34 ppm).

### 3.2.8 Avaliação da atividade antituberculose

Os testes de atividade antituberculose foram realizados sob responsabilidade da pesquisadora Maria Cristina da Silva Lourenço no

Departamento de Bacteriologia do Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas (IPEC/FIOCRUZ – Rio de Janeiro), conforme procedimento descrito em Reis *et al.* (2004).

O *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 27294 (American Type Culture Collection, Rockville, Md.) foi inicialmente subculturado em meio agar Middlebrook 7H10 (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Md.). Na sequência, foi preparada uma suspensão da subcultura em uma solução contendo 0,04% (vol/vol) de Tween 80, e 0,2% de albumina isolada de soro bovino (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) e, em seguida, ajustada para uma turbidez escala 1 de McFarland. Depois, realizou-se uma diluição 1:25 em meio 7H9GC (meio Middlebrook 7H9 como base, contendo casitana como suplemento; Difco, Detroit, Mich).

As soluções dos compostos teste, foram primeiramente preparadas em DMSO e, em seguida, diluídas em meio 7H9GC até duas vezes o máximo da concentração final desejada no teste, antes da adição às microplacas. Então, foram adicionados 200 µL de água deionizada e esterilizada em todo o perímetro exterior das placas de micropoços esterilizados (Nuncclon™; Nunc A/S, Roskilde, Denmark), a fim de minimizar a evaporação do meio durante o período de incubação dos testes.

As microplacas contendo 96 poços foram organizadas pelas linhas B a G, com colunas numeradas de 2 a 11, para receber 100 µL de meio 7H9GC. Então 100 µL de solução dos 55 compostos teste foram adicionados nos poços das linhas B a G, nas colunas 2 e 3, utilizando uma pipeta de multicanal, sendo o conteúdo de cada poço homogeneizado em seguida. As diluições idênticas de 1:2 em série foram realizadas através das colunas restantes (com exceção da coluna 11). Os intervalos de concentração final de composto foram de 100 a 3,2 µg/mL.

A inoculação do *Mycobacterium tuberculosis* foi realizada através da adição de cem microlitros de inóculo aos poços nas filas B a G nas colunas 2 a 11 utilizando uma pipeta de repetição, originando um volume final de 200 µL por poço. As placas (realizadas em triplicata) foram na sequência seladas com Parafilm® e incubadas a 37 °C durante 5 dias.

O reagente de Alamar Blue e 10% de Tween 80 foram adicionados à coluna B11 (controle de viabilidade celular) e as placas reincubadas a 37 °C por 24h. Se o poço B11 adquiriu a coloração rosa, a mistura do reagente foi adicionada a todos os poços restantes das microplacas, sendo novamente vedadas

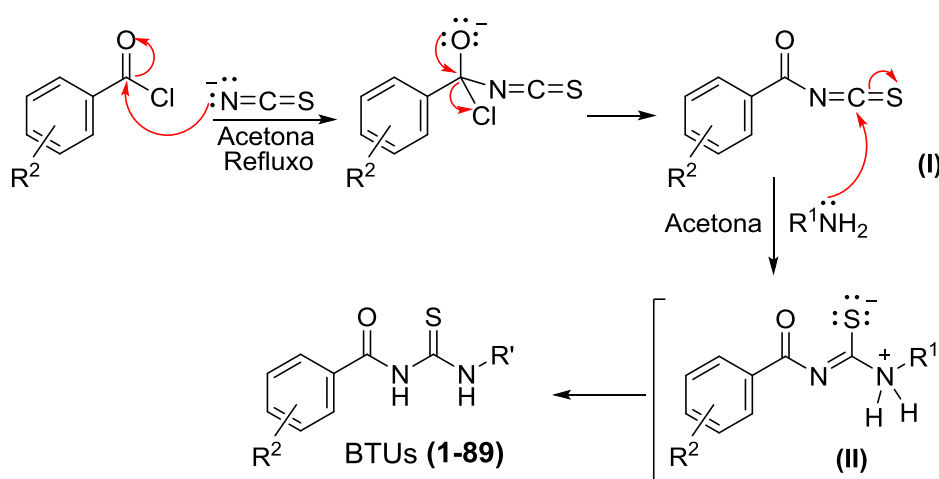
com Parafilm® e incubadas durante mais 24 h a 37° C. Após este período, as cores de todos os poços registradas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de substância-teste que impediu uma mudança de cor de azul para rosa.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS BENZOILTIOUREIAS

As tioureias *N,N'*-dissubstituídas foram preparadas através da reação de diferentes aminas primárias com os correspondentes benzoil isotiocianatos produzidos *in situ* a partir de uma reação entre cloreto de benzoíla (substituídos ou não) e tiocianato de amônio para fornecer as benzoiltioureias (BTUs) **2-89** (Tabelas 1 e 2).

O mecanismo envolvido na síntese das benzoiltioureias (Figura 21) ocorre através de um processo de adição-eliminação, onde inicialmente o ânion tiocianato reage com o carbono eletrofílico do cloreto de benzoíla. Em seguida ocorre a eliminação do ânion cloreto (que precipita na forma de cloreto de amônio), com a conseqüente formação do isotiocianato de benzoíla. Finalmente, a amina adicionada posteriormente reage com o carbono *sp* altamente eletrofílico do isotiocianato (I), formando assim um intermediário estabilizado (II), que se converte na benzoiltioureia de interesse.



**Figura 21.** Mecanismo de reação envolvido na síntese das benzoiltioureias.

Os compostos **4-89** foram obtidos após 30 minutos, a partir do isotiocianato de benzoíla correspondente, em acetona sob refluxo. Os adutos **2** e **3** foram formados após 3 horas de reação à temperatura ambiente. As BTUs sintetizadas foram obtidas com rendimentos moderados a altos (Tabela 1 e 2). A

BTU **1** foi sintetizada de maneira similar aos **2** e **3**, exceto que foi utilizado uma solução aquosa de  $\text{NH}_4\text{OH}$  em vez de uma amina.

**Tabela 1.** Benzoiltioureias obtidas a partir do cloreto de benzoíla.

| Composto  | R <sup>1</sup>                                                   | Rend. (%) <sup>a</sup> | P.F. (°C) | Ref. utilizada para comparação dos dados obtidos |
|-----------|------------------------------------------------------------------|------------------------|-----------|--------------------------------------------------|
| <b>1</b>  | H                                                                | 50                     | 170       | BUDESINSKY et al., 1959                          |
| <b>2</b>  | CH <sub>3</sub>                                                  | 38                     | 147       | BRINDLEY et al., 1987                            |
| <b>3</b>  | CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                  | 58                     | 125       | NR                                               |
| <b>4</b>  | <sup>t</sup> Bu                                                  | 58                     | 124       | BRINDLEY et al., 1987                            |
| <b>5</b>  | C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>                                   | 90                     | 64        | ELMORE e OGLE, 1958                              |
| <b>6</b>  | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>                                    | 79                     | 146       | RAUF et al., 2009                                |
| <b>7</b>  | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>                    | 80                     | 121       | KAYE e PARRIS, 1952                              |
| <b>8</b>  | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>    | 86                     | 105       | KATRITZKY et al., 2003                           |
| <b>9</b>  | 4-OMe-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                              | 92                     | 145       | UPADHYAYA et al., 1983                           |
| <b>10</b> | 4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 96                     | 160       | VENKATESH e PANDEYA, 2009                        |
| <b>11</b> | 4-(CH <sub>3</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 94                     | 156       | UPADHYAYA et al., 1983                           |
| <b>12</b> | 4-(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 79                     | 114       | NR                                               |
| <b>13</b> | 4-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                 | 93                     | 179       | SARKIS e FAISAL, 1985                            |
| <b>14</b> | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 97                     | 136       | RAUF et al., 2009                                |
| <b>15</b> | 4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 85                     | 144       | VENKATESH e PANDEYA, 2009                        |
| <b>16</b> | 3-OMe-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                              | 87                     | 105       | UPADHYAYA et al., 1983                           |
| <b>17</b> | 3-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 70                     | 184       | ABOSADIYA et al., 2007                           |
| <b>18</b> | 3-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                 | 89                     | 158       | SARKIS e FAISAL, 1985                            |
| <b>19</b> | 3-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 99                     | 125       | UPADHYAYA et al., 1983                           |
| <b>20</b> | 3-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 85                     | 129       | GUPTA et al., 1983                               |
| <b>21</b> | 2-OMe-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                              | 92                     | 150       | SARKIS e FAISAL, 1985                            |
| <b>22</b> | 2-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                 | 64                     | 146       | SARKIS e FAISAL, 1985                            |
| <b>23</b> | 2-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 74                     | 142       | RAUF et al., 2009                                |
| <b>24</b> | 2-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 86                     | 134       | BARNIKOW e KUNZEK, 1965                          |
| <b>25</b> | 2-piridinil                                                      | 71                     | 137       | SARKIS e FAISAL, 1985                            |
| <b>26</b> | 2-pirimidinil                                                    | 73                     | 176       | HURST et al., 1988                               |

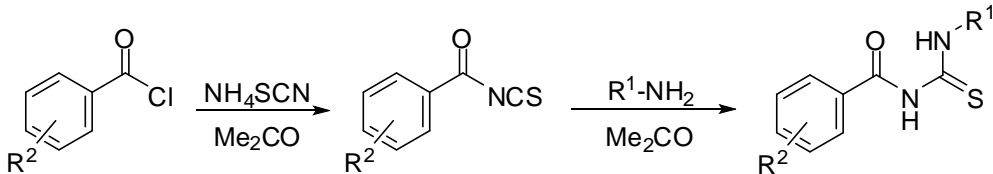
<sup>a</sup>Os valores correspondem ao rendimento global. **P.F.**, pontos de fusão reportados foram comparados aos encontrados na literatura (se disponíveis). **NR**, não relatados até o momento.

As BTUs derivadas de cloreto de benzoíla e aminas alifáticas ou hidróxido de amônio (**1** a **4**) foram obtidas em 38-58% de rendimento (Tabela 1). As reações envolvendo cloreto de benzoíla e aminas aromáticas levaram à formação das BTUs **5** a **26**, com rendimentos bons a excelentes, variando de 64% a 99% (Tabela 1). Cloretos de benzoíla substituídos, na presença de uma variedade de aminas aromáticas ou benzilamina, forneceram as demais BTUs (**27** a **89**; Tabela 2) com rendimentos moderados a excelentes, na faixa de 40% a 99%.

**Tabela 2.** Benzoiltioureas obtidas a partir de cloretos de benzoíla monossustituídos.

| Composto | R <sup>1</sup>                                   | R <sup>2</sup>    | Rend. (%) <sup>a</sup> | P.F. (°C)            | Ref. utilizada para comparação dos dados obtidos |
|----------|--------------------------------------------------|-------------------|------------------------|----------------------|--------------------------------------------------|
| 27       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>    | 4-NO              | 49                     | 143                  | UHER et al., 1980                                |
| 28       | 4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>              | 4-NO <sub>2</sub> | 76                     | 149                  | GOLOVINSKII et al., 1963                         |
| 29       | 4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 4-NO <sub>2</sub> | 68                     | 172                  | NR                                               |
| 30       | 4-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 4-NO <sub>2</sub> | 95                     | 192                  | SHI et al., 2007                                 |
| 31       | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 4-NO <sub>2</sub> | 83                     | 173                  | NR                                               |
| 32       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>                    | 3-NO <sub>2</sub> | 73                     | 149                  | NR                                               |
| 33       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>    | 3-NO <sub>2</sub> | 73                     | 104                  | NR                                               |
| 34       | 4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>              | 3-NO <sub>2</sub> | 77                     | 156                  | NR                                               |
| 35       | 4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 3-NO <sub>2</sub> | 81                     | 195                  | NR                                               |
| 36       | 4-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 3-NO <sub>2</sub> | 89                     | 173                  | NR                                               |
| 37       | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 3-NO <sub>2</sub> | 89                     | 155                  | NR                                               |
| 38       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>                    | 2-NO <sub>2</sub> | 82                     | 172                  | NR                                               |
| 39       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>    | 2-NO <sub>2</sub> | 60                     | 156                  | NR                                               |
| 40       | 4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>              | 2-NO <sub>2</sub> | 76                     | 179                  | NR                                               |
| 41       | 4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 2-NO <sub>2</sub> | 73                     | 215                  | LIN et al., 2009                                 |
| 42       | 4-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 2-NO <sub>2</sub> | 43                     | 216                  | NR                                               |
| 43       | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 2-NO <sub>2</sub> | 77                     | 202                  | NR                                               |
| 44       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>                    | 4-Cl              | 99                     | 144                  | NR                                               |
| 45       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>    | 4-Cl              | 77                     | 120                  | YAVARI et al., 2007                              |
| 46       | 4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>              | 4-Cl              | 99                     | 146                  | ZHOU et al., 2004                                |
| 47       | 4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 4-Cl              | 99                     | 186                  | NR                                               |
| 48       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>                    | 3-Cl              | 68                     | 135                  | NR                                               |
| 49       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>    | 3-Cl              | 72                     | 126                  | NR                                               |
| 50       | 4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>              | 3-Cl              | 79                     | 128                  | NR                                               |
| 51       | 4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 3-Cl              | 75                     | 182                  | NR                                               |
| 52       | 4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 2-Cl              | 78                     | 198                  | NR                                               |
| 53       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>                    | 4-OMe             | 98                     | 123                  | NR                                               |
| 54       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>    | 4-OMe             | 94                     | 126                  | NR                                               |
| 55       | 4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 4-OMe             | 81                     | 170                  | NR                                               |
| 56       | 4-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 4-OMe             | 95                     | 180                  | NR                                               |
| 57       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>                    | 3-OMe             | 82                     | 103                  | NR                                               |
| 58       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>    | 3-OMe             | 76                     | 85                   | NR                                               |
| 59       | 4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 3-OMe             | 94                     | 177                  | NR                                               |
| 60       | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 3-OMe             | 96                     | 123                  | NR                                               |
| 61       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>                    | 2-OMe             | 78                     | 139                  | NR                                               |
| 62       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>    | 2-OMe             | 69                     | 96                   | NR                                               |
| 63       | 4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>              | 2-OMe             | 95                     | 116                  | NR                                               |
| 64       | 4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 2-OMe             | 82                     | 184                  | NR                                               |
| 65       | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 2-OMe             | 76                     | 145                  | NR                                               |
| 66       | 4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 2-Cl              | 54                     | 174-176 <sup>b</sup> | NR                                               |
| 67       | 4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 3-Cl              | 71                     | 173-175 <sup>b</sup> | NR                                               |
| 68       | 4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 4-Br              | 64                     | 195-196              | NR                                               |

Tabela 2 continuação ...



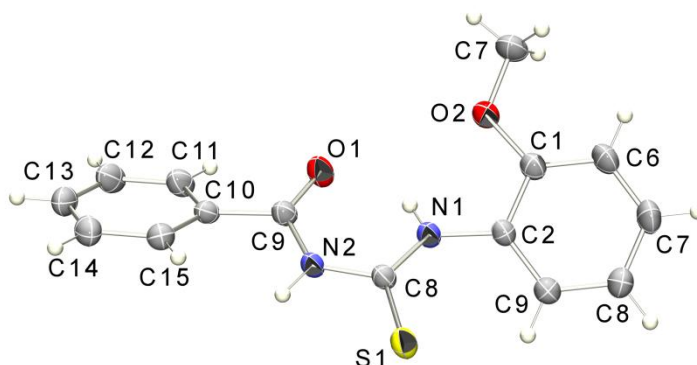
| Composto | R <sup>1</sup>                                                   | R <sup>2</sup>    | Rend. (%) <sup>a</sup> | P.F.                 | Ref. utilizada para comparação dos dados obtidos |
|----------|------------------------------------------------------------------|-------------------|------------------------|----------------------|--------------------------------------------------|
| 69       | 4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 2-OMe             | 52                     | 132-133              |                                                  |
| 70       | 4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 3-OMe             | 60                     | 144-146              |                                                  |
| 71       | 4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 4-OMe             | 73                     | 192                  |                                                  |
| 72       | 4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 2-NO <sub>2</sub> | 50                     | 213-215 <sup>b</sup> | NR                                               |
| 73       | 4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 3-NO <sub>2</sub> | 53                     | 173-175 <sup>b</sup> | NR                                               |
| 74       | 4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 4-NO <sub>2</sub> | 56                     | 185-186              | NR                                               |
| 75       | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 2-Cl              | 88                     | 177-178              | NR                                               |
| 76       | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 3-Cl              | 77                     | 162-163              | NR                                               |
| 77       | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 4-Cl              | 99                     | 194                  | NR                                               |
| 78       | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 4-Br              | 81                     | 183-185              | NR                                               |
| 79       | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 4-OMe             | 85                     | 146                  | NR                                               |
| 80       | 4-(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 2-Cl              | 58                     | 115-117              |                                                  |
| 81       | 4-(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 3-Cl              | 69                     | 154-155              |                                                  |
| 82       | 4-(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 4-Cl              | 68                     | 149-151              |                                                  |
| 83       | 4-(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 4-Br              | 70                     | 151-152              |                                                  |
| 84       | 4-(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 2-OMe             | 55                     | 103-104              |                                                  |
| 85       | 4-(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 3-OMe             | 70                     | 145-146              |                                                  |
| 86       | 4-(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 4-OMe             | 63                     | 149-151              |                                                  |
| 87       | 4-(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 2-NO <sub>2</sub> | 49                     | 190-192              |                                                  |
| 88       | 4-(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 3-NO <sub>2</sub> | 72                     | 197-198              |                                                  |
| 89       | 4-(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 4-NO <sub>2</sub> | 60                     | 184-186              |                                                  |

<sup>a</sup>Os valores correspondem ao rendimento global. <sup>b</sup>Foi observado decomposição do composto. **P.F.**, pontos de fusão reportados foram comparados aos encontrados na literatura (se disponíveis). **NR**, pontos de fusão não relatados até o momento. **I**, compostos inéditos na literatura.

Os pontos de fusão das BTUs sintetizadas foram obtidos e comparados aos valores da literatura quando disponíveis (Tabelas 1 e 2), estando de acordo com os dados encontrados. As estruturas das benzothioamidas foram confirmadas através dos respectivos espectros de IV e RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. Nos espectros de infravermelho de todas as BTUs, foi verificada a presença de uma banda intensa entre 1700-1660 cm<sup>-1</sup> característica de estiramento C=O. Bandas fracas ou moderadas observadas entre 3419-3011 cm<sup>-1</sup> foram atribuídas a deformações axiais N-H. Um conjunto complexo de bandas entre 700 e 1500 cm<sup>-1</sup> características da porção tioamida também foram observadas e estão de acordo com os dados relatados em outros trabalhos (SAEED et al., 2011). A banda relacionada ao estiramento C=S também foi observada entre 1291-1236 cm<sup>-1</sup>.

Todos os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  observados indicam de forma coerente a presença dos grupos alifáticos e aromáticos da estrutura esperada para cada BTU obtida. Os sinais dos hidrogênios CON-H e CSN-H foram observados como simpletos largos entre  $\delta_{\text{H}}$  8,69-12,35 e 9,85-13,60, respectivamente. Verificou-se nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  um sinal característico de tiocarbonila (C=S) entre  $\delta_{\text{C}}$  176,8-182,1. Além disto, o sinal de RMN de  $^{13}\text{C}$  da carbonila foi observado entre  $\delta_{\text{C}}$  164,9-168,6. Estes valores são descritos na literatura para benzoiltioureas (OTAZO-SÁNCHEZ et al., 2001 e 2002).

As benzoiltioureas *N*-monossubstituídas adotam uma conformação preferencial de um pseudo-anel de seis membros (ABOSADIYA et al., 2007; CASTRO et al., 2013; SAEED et al., 2014), formado a partir de uma ligação de hidrogênio intramolecular entre o grupamento NH tioamídico e a carbonila do grupo benzoil, o que também foi verificado para a BTU **21**, através da determinação da estrutura cristalina por difratometria de raios-X de monocristal (Figura 22).



**Figura 22.** Estrutura cristalina da BTU **21**, determinada por RX de monocristal.

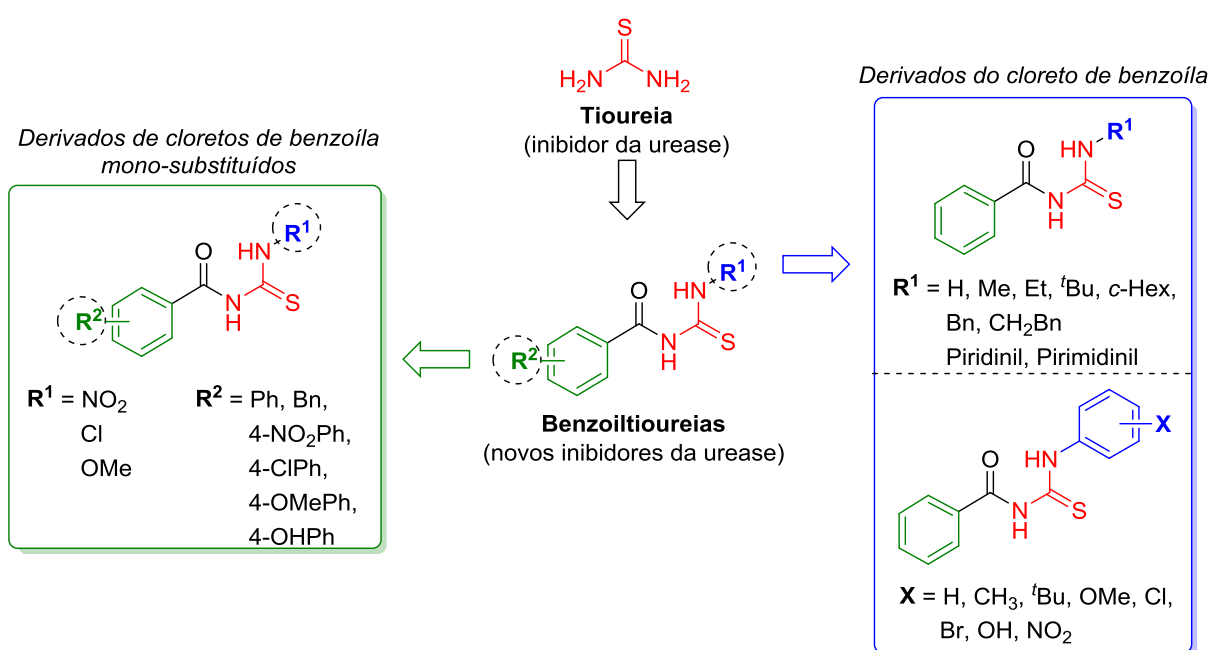
## 4.2 AVALIAÇÃO DE BENZOILTIOUREIAS COMO INIBIDORES DE UREASE

### 4.2.1 Efeito inibitório de BTUs na atividade de urease de *Canavalia ensiformis*

Inicialmente, 65 BTUs (**1-65**) foram avaliadas em ensaio preliminar quanto suas atividades inibitórias da enzima urease purificada de *Canavalia ensiformis* tipo III.

A escolha por avaliar BTUs como inibidores de urease se deve ao fato de que a tiourea é um inibidor conhecido (KRAJEWSKA, 2009). As

benzoiltiureias *N*-substituídas em R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup> com grupos de diferentes características eletrônicas e estéricas foram selecionadas com o objetivo de avaliar se as modificações estruturais aumentariam a capacidade da tiourea em inibir ureases (Figura 23). Para os derivados do cloreto de benzoíla, foram selecionados como substituintes (R<sup>1</sup>) uma série de grupos alifáticos, aromáticos, heteroaromáticos, benzílicos e homobenzílicos. Para os derivados de cloretos de benzoíla mono-substituídos (R<sup>2</sup>) foram selecionados os grupos nitro, cloro e metoxi nos três padrões de substituição: *orto*, *meta* e *para*.

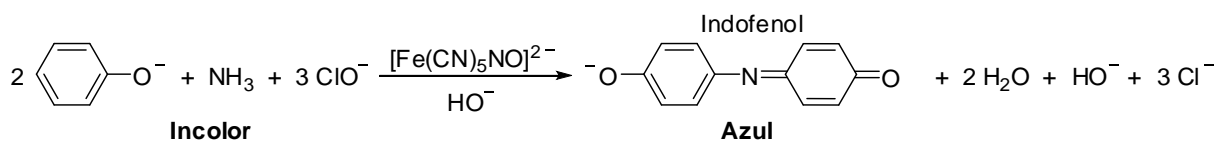


**Figura 23.** Estratégia utilizada para a concepção de inibidores de urease de interesse agrícola baseados na porção benzoiltiureia.

Hidroxiureia e tiourea foram utilizadas como inibidores de referência nos experimentos *in vitro* (GALE, 1965; FISHBEIN e CARBONE, 1965; KHAN et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014).

Os testes de inibição de urease de *Canavalia ensiformis* foram realizados conforme metodologia descrita por Khan et al. (2014), com algumas modificações. Neste ensaio, a amônia liberada foi monitorada e quantificada utilizando o método indofenol (inicialmente descrito por WEATHERBURN, 1967). Este método baseia-se na quantificação do produto de cor azul (indofenol), formado pela reação da amônia com fenol e hipoclorito de sódio, sob catálise de nitroprussiato de sódio (Esquema 2). A absorbância da solução, detectada em 630

nm, fornece de forma indireta a quantidade de amônia formada e a porcentagem de inibição da enzima (SERWAR et al., 2009; KHAN et al., 2014).



**Esquema 2.** Reação de formação de indofenol pela reação do fenol com amônia, hipoclorito de sódio e nitroprussiato de sódio.

Os resultados do ensaio de inibição enzimática revelaram que 51 das 65 BTUs testadas inibiram em diferentes extensões a atividade da urease em um meio de reação contendo 500  $\mu\text{M}$  da BTU e 10 mM de ureia (Tabelas 3 e 4). Os compostos **3**, **4**, **6**, **10-12**, **14**, **16**, **19-22**, **37**, **45**, **57**, **59** e **60** foram as BTUs mais ativas frente à urease de *Canavalia ensiformis*, de acordo com as porcentagens de inibição enzimática, com valores iguais ou maiores que 40% (Tabela 3 e 4). Notavelmente, o efeito da BTU **14** sobre a urease de *Canavalia ensiformis* foi comparável ao inibidor de referência **HU** e 3,2 vezes maior que o verificado para o inibidor **TU**. Por outro lado, inibições menores que 10% categorizam as BTUs **15**, **30**, **36** e **41** como inibidores fracos desta enzima, com resultados de inibições inferiores a **TU** (22,6 %).

Dentre as dezessete BTUs encontradas como mais ativas frente a urease de *Canavalia ensiformis* tipo III, os derivados de cloreto de benzoíla não substituídos (BTUs **3**, **4**, **6**, **10-12**, **14**, **16**, **19-22**) inibiram a urease em até 73,9% enquanto os derivados de cloreto de benzoíla substituídos (BTUs **45**, **57**, **59** e **60**) causaram um máximo de 50% de inibição da enzima. O composto **37** que possui os grupos *p*-Cl fenil e *m*-NO<sub>2</sub> benzoil, inibiu a atividade de urease em 67%. Para as BTUs derivadas do cloreto de benzoíla não substituído, a presença de anel fenila contendo grupos *p*-terc-butil (**12**), *o*-NO<sub>2</sub> (**22**), *m*-Cl (**19**), *p*-Cl (**14**) ou *m*-Br (**20**) parecem contribuir para a eficiência das BTUs contra a urease de *Canavalia ensiformis*. Estes resultados corroboram os obtidos por Rauf et al. (2013), em que a presença de substituinte halogênio no anel fenila ocasionou uma melhora na atividade da BTU contra a urease (RAUF et al., 2013. Relatos anteriores também demonstram que BTUs contendo *p*-OCOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> fenil como substituinte (R<sup>1</sup>) e grupos *p*-

OCH<sub>3</sub> ou *m,p*-diOCH<sub>3</sub> benzoil são potentes inibidores de urease (Figura 12) (SAEED et al., 2014).

**Tabela 3.** Atividade inibitória de urease de *Canavalia ensiformis* frente às benzoiltioureias (0,5 mM) sintetizadas a partir do cloreto de benzoíla, em reações contendo 10 mM de ureia.

| Composto | R <sup>1</sup>                                                   | Inibição da urease (%) |
|----------|------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1        | H                                                                | 32,0                   |
| 2        | CH <sub>3</sub>                                                  | 11,2                   |
| 3        | CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                  | 43,8                   |
| 4        | <sup>t</sup> Bu                                                  | 44,0                   |
| 5        | C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>                                   | 24,2                   |
| 6        | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>                                    | 47,4                   |
| 7        | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>                    | 27,0                   |
| 8        | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>    | 17,7                   |
| 9        | 4-OMe-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                              | 31,7                   |
| 10       | 4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 40,7                   |
| 11       | 4-(CH <sub>3</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 51,7                   |
| 12       | 4-(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 64,2                   |
| 13       | 4-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                 | 27,3                   |
| 14       | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 73,9                   |
| 15       | 4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 6,4                    |
| 16       | 3-OMe-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                              | 49,1                   |
| 17       | 3-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 24,1                   |
| 18       | 3-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                 | 32,2                   |
| 19       | 3-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 60,0                   |
| 20       | 3-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 65,2                   |
| 21       | 2-OMe-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                              | 51,0                   |
| 22       | 2-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                 | 57,2                   |
| 23       | 2-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 33,4                   |
| 24       | 2-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 19,7                   |
| 25       | 2-piridinil                                                      | NA                     |
| 26       | 2-pirimidinil                                                    | NA                     |
| TU       | -                                                                | 22,6                   |
| HU       | -                                                                | 73,6                   |

**NA**, não ativo com respeito à habilidade de inibir a atividade de urease quando testada em nossas condições experimentais. Hidroxiureia (**HU**) e tioureia (**TU**) foram utilizadas como referencias para inibidores de urease.

**Tabela 4.** Atividade inibitória de urease de *Canavalia ensiformis* frente às benzoiltioureias (0,5 mM) sintetizadas a partir de cloretos de benzoíla mono-substituídos, em reações contendo 10 mM de ureia.

| Composto | R <sup>1</sup>                                   | R <sup>2</sup>    | Inibição da urease (%) |
|----------|--------------------------------------------------|-------------------|------------------------|
| 27       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>    | 4-NO              | 17,9                   |
| 28       | 4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>              | 4-NO <sub>2</sub> | NA                     |
| 29       | 4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 4-NO <sub>2</sub> | NA                     |
| 30       | 4-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 4-NO <sub>2</sub> | 5,1                    |
| 31       | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 4-NO <sub>2</sub> | 28,3                   |
| 32       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>                    | 3-NO <sub>2</sub> | NA                     |
| 33       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>    | 3-NO <sub>2</sub> | 16,3                   |
| 34       | 4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>              | 3-NO <sub>2</sub> | NA                     |
| 35       | 4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 3-NO <sub>2</sub> | NA                     |
| 36       | 4-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 3-NO <sub>2</sub> | 8,7                    |
| 37       | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 3-NO <sub>2</sub> | 66,9                   |
| 38       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>                    | 2-NO <sub>2</sub> | NA                     |
| 39       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>    | 2-NO <sub>2</sub> | 29,2                   |
| 40       | 4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>              | 2-NO <sub>2</sub> | NA                     |
| 41       | 4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 2-NO <sub>2</sub> | 3,8                    |
| 42       | 4-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 2-NO <sub>2</sub> | NA                     |
| 43       | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 2-NO <sub>2</sub> | NA                     |
| 44       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>                    | 4-Cl              | 17,7                   |
| 45       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>    | 4-Cl              | 47,6                   |
| 46       | 4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>              | 4-Cl              | NA                     |
| 47       | 4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 4-Cl              | NA                     |
| 48       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>                    | 3-Cl              | 13,8                   |
| 49       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>    | 3-Cl              | 37,5                   |
| 50       | 4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>              | 3-Cl              | NA                     |
| 51       | 4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 3-Cl              | 28,4                   |
| 52       | 4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 2-Cl              | 26,5                   |
| 53       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>                    | 4-OMe             | 33,0                   |
| 54       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>    | 4-OMe             | 20,1                   |
| 55       | 4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 4-OMe             | 39,1                   |
| 56       | 4-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 4-OMe             | 17,6                   |
| 57       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>                    | 3-OMe             | 43,5                   |
| 58       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>    | 3-OMe             | 30,6                   |
| 59       | 4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 3-OMe             | 41,6                   |
| 60       | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 3-OMe             | 49,3                   |
| 61       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>                    | 2-OMe             | 22,3                   |
| 62       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>    | 2-OMe             | 12,6                   |
| 63       | 4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>              | 2-OMe             | 15,2                   |
| 64       | 4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 2-OMe             | 29,6                   |
| 65       | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 2-OMe             | 10,8                   |
| TU       | -                                                | -                 | 22,6                   |
| HU       | -                                                | -                 | 73,6                   |

**NA**, não ativo com respeito à habilidade de inibir a atividade de urease quando testada em nossas condições experimentais. Hidroxiureia (**HU**) e tioureia (**TU**) foram utilizadas como referencias para inibidores de urease.

#### 4.2.2 Estudo do mecanismo de inibição da urease provocada pelas BTUs

Para entender as propriedades cinéticas de uma enzima, devemos ter em mente o processo de catálise envolvido, que ocorre na forma de um equilíbrio (Equação 3). Neste sistema, a enzima (E) inicialmente se combina com o substrato (S) formando o complexo ES, com uma velocidade  $k_1$ . Na sequência o complexo ES pode se dissociar, retornando ao estado inicial (E + S), com uma velocidade  $k_{-1}$ , ou pode prosseguir em direção à formação do produto e regeneração da enzima (E + P), com uma velocidade  $k_2$ , que pode também retornar para a etapa anterior, reconstituindo o complexo ES a partir de E + P, sendo a velocidade expressa como  $k_{-2}$  (BERG et al., 2008).



Para simplificar o equilíbrio, considera-se a velocidade de reação em um tempo próximo de zero ( $V_0$ ), onde a formação do produto será muito baixa e conseqüentemente a constante  $k_{-2}$  será aproximadamente zero (Equação 4) (BERG et al., 2008).



A partir da Equação 4, pode-se então expressar a velocidade de catálise correlacionada à concentração de substrato e de enzima e também às velocidades das etapas individuais do equilíbrio (Equação 5). Neste caso, assume-se que E e S se combinarão rapidamente formando o complexo ES e portanto a concentração das outras espécies será irrelevante (BERG et al., 2008).

$$V_0 = k_2 [ES] \quad (5)$$

Em termos quantitativos, pode-se expressar [ES] em relação às taxas de formação e quebra de ES conforme as equações 6 e 7 (BERG et al., 2008).

$$\text{Velocidade de formação de ES} = k_1 [E] [S] \quad (6)$$

$$\text{Velocidade de quebra de ES} = (k_{-1} + k_2) [ES] \quad (7)$$

Quando as velocidades de quebra e formação de ES são iguais, tem-se um suposto estado estacionário e as equações 6 e 7 podem ser igualadas, conforme a Equação 8 (BERG et al., 2008).

$$k_1 [E] [S] = (k_{-1} + k_2) [ES] \quad (8)$$

Rearranjando a Equação 8, temos que  $(k_{-1} + k_2) / k_1 = K_M$ , sendo que  $K_M$ , ou *constante de Michaelis* (Equação 9) é a concentração de substrato na qual metade dos centros catalíticos da enzima estão ocupados e por consequência, nos fornece um quantitativo da concentração necessária do substrato para que a catálise ocorra de forma significativa (BERG et al., 2008).

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} = K_M \quad (9)$$

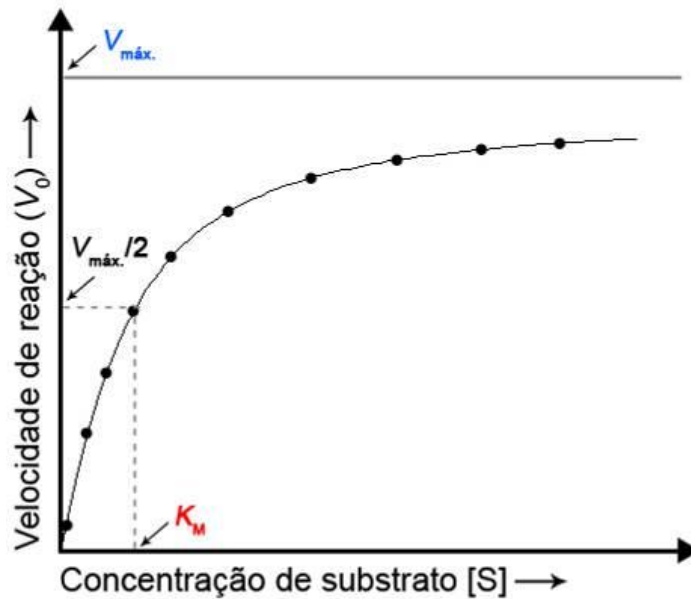
Outra importante característica de reações enzimáticas é a velocidade máxima ( $V_{max}$ ), que é atingida quando todos os sítios catalíticos da enzima estão saturados com substrato, sendo  $[ES] = [E]_T$  (Equação 10), onde  $[E]_T$  é a concentração total da enzima (BERG et al., 2008).

$$V_{max.} = k_2 [E]_T \quad (10)$$

A equação de Michaelis-Menten (Equação 11) nos fornece uma explicação do comportamento cinético da maioria das enzimas. Quando a  $[S]$  é muito menor que  $K_M$ , tem-se que  $V_0 = (V_{max.} / K_M) \times [S]$ , uma reação de primeira ordem, com velocidade diretamente proporcional à concentração de substrato. A altas concentrações de substrato,  $[S]$  é muito maior que  $K_M$  e  $V_0 = V_{max.}$ , a reação será de ordem zero, ou seja, independente de  $[S]$  (BERG et al., 2008).

$$V_0 = V_{m\acute{a}x.} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (11)$$

A relação entre  $V_0$  e  $[S]$  pode ser expressa graficamente (Figura 24), fornecendo uma curva hiperbólica (para a maioria das enzimas) de onde pode se extrair os valores de  $K_M$  e  $V_{max.}/2$  (BERG et al., 2008).



**Figura 24.** Relação entre  $V_0$  e  $[S]$  na cinética de Michaelis-Menten (adaptado de BERG et al., 2008).

Nos ensaios realizados para mensurar o efeito de BTUs na cinética da reação promovida por urease de *Canavalia ensiformis* foram utilizadas uma concentração fixa de cada BTU (250 a 500  $\mu\text{M}$ ) e ureia em concentração variável de 1-32 mM. Este ensaio foi realizado para expandir o conhecimento do tipo de inibição enzimática exercida pelas BTUs mais ativas. As BTUs que causaram inibição da urease maior que 50%, nomeadamente **11, 12, 14, 19-22 e 37** (Tabela 3 e 4), foram selecionadas para este estudo do mecanismo de inibição da urease. Reações livres de inibidor também foram realizadas como controle em cada experimento, nas mesmas condições, uma vez que pequenas mudanças nas condições de reação podem afetar os parâmetros cinéticos.

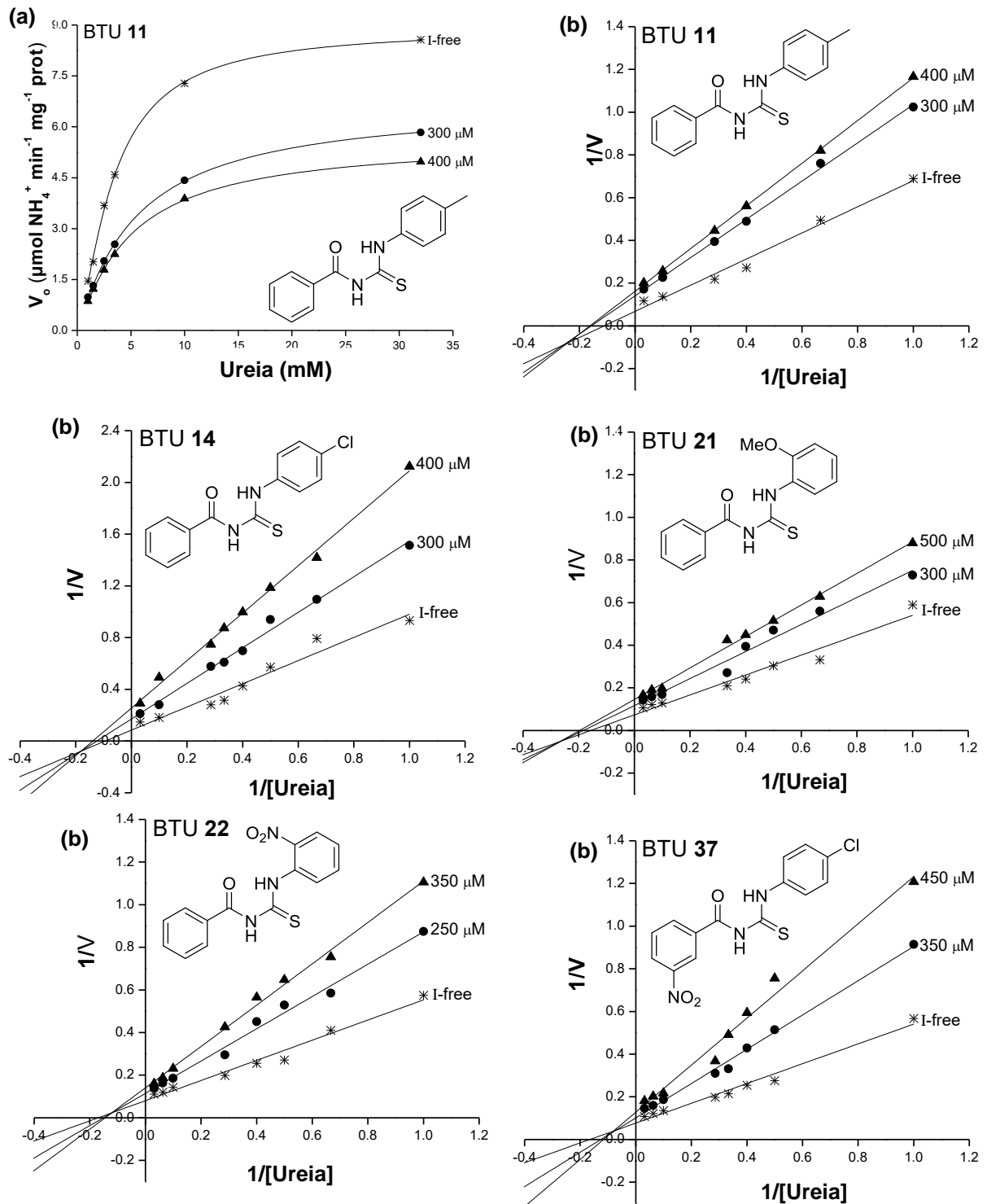
Um gráfico de  $V_0$  versus concentração de ureia foi obtido, a partir de dados dos experimentos com a BTU **11** (Figura 25a), para exemplificar o comportamento da *catálise Michaeliana* para a urease. Comportamento semelhante foi observado em ensaios realizados com as outras sete BTUs.

A concentração média de ureia ( $K_M$  ou  $K_S$ ) que permite que a velocidade de urease chegue a  $0,5 V_{max}$  em reações tamponadas com fosfato (pH 7,4) foi  $4,2 \pm 0,3$  mM e a  $V_{max}$  média para a urease foi encontrada como sendo  $10,1 \pm 0,3 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína.

Os gráficos de Lineweaver-Burk obtidos (Figura 25b) indicam que todas as BTUs testadas atuam como inibidores de tipo misto frente à urease, como

as linhas se cruzam umas com as outras no segundo quadrante. Inibidores de tipo misto são definidos por serem capazes de ligar-se tanto a enzima livre (formação de complexo EI) como ao complexo enzima-substrato (formação de complexo ESI), sendo, por conseguinte, associado a duas constantes de equilíbrio de dissociação ( $K_i$  para o primeiro e  $K_i'$  para o último complexo). De fato, as constantes de equilíbrio de dissociação relacionadas aos complexos formados entre urease e cada uma das BTUs individualmente (valores de  $K_i$ ) foram menores do que as constantes de equilíbrio de dissociação para os complexos formados entre urease, ureia e a correspondente BTU (valores de  $K_i'$ ) (Tabela 5).

Os resultados obtidos indicam que a afinidade das BTUs para o sítio ativo da urease é mais elevada do que para o(s) sítio(s) alostérico(s). A BTU **12** foi a menos potente no que se refere à ligação, tanto ao sítio ativo quanto ao(s) sítio(s) alostérico(s) da urease. Algumas tioureias *N,N*-diaril substituídas de forma não simétrica, compostos estruturalmente semelhantes às BTUs, também foram, recentemente, descritas como inibidores mistos de urease de *Canavalia ensiformis* (KHAN et al., 2014).



**Figura 25.** Hipérbole representativa de Michaelis-Menten (a) e gráficos de Lineweaver-Burk (b) para reação de hidrólise de ureia promovida por urease de *Canavalia ensiformis* na presença das benzoiltioureas (BTUs). \*as reações com aumento gradual das concentrações de ureia foram incubadas durante 10 minutos contendo a urease na ausência de inibidor (i-free) ou presença de BTU em concentrações indicadas. O gráfico de  $v_o$  versus concentração de ureia obtidos a partir dos dados de ensaios com a BTU 11 é mostrado para exemplificar o comportamento michaeliano de catálise para a ureia.

**Tabela 5.** Efeito de benzoiltioureas (BTUs) nos parâmetros cinéticos de urease de *Canavalia ensiformis*. A ureia (1 a 32 mM) foi incubada por 5 minutos com urease em presença ou ausência de BTU (250 a 500  $\mu\text{M}$ ). Os valores de  $K_M$  (ou  $K_S$ ) e  $V_{\max}$  determinados foram, respectivamente,  $4,2 \pm 0,3$  mM e  $10,1 \pm 0,3$   $\mu\text{mol}$  de  $\text{NH}_4^+$ /min/g de proteína.

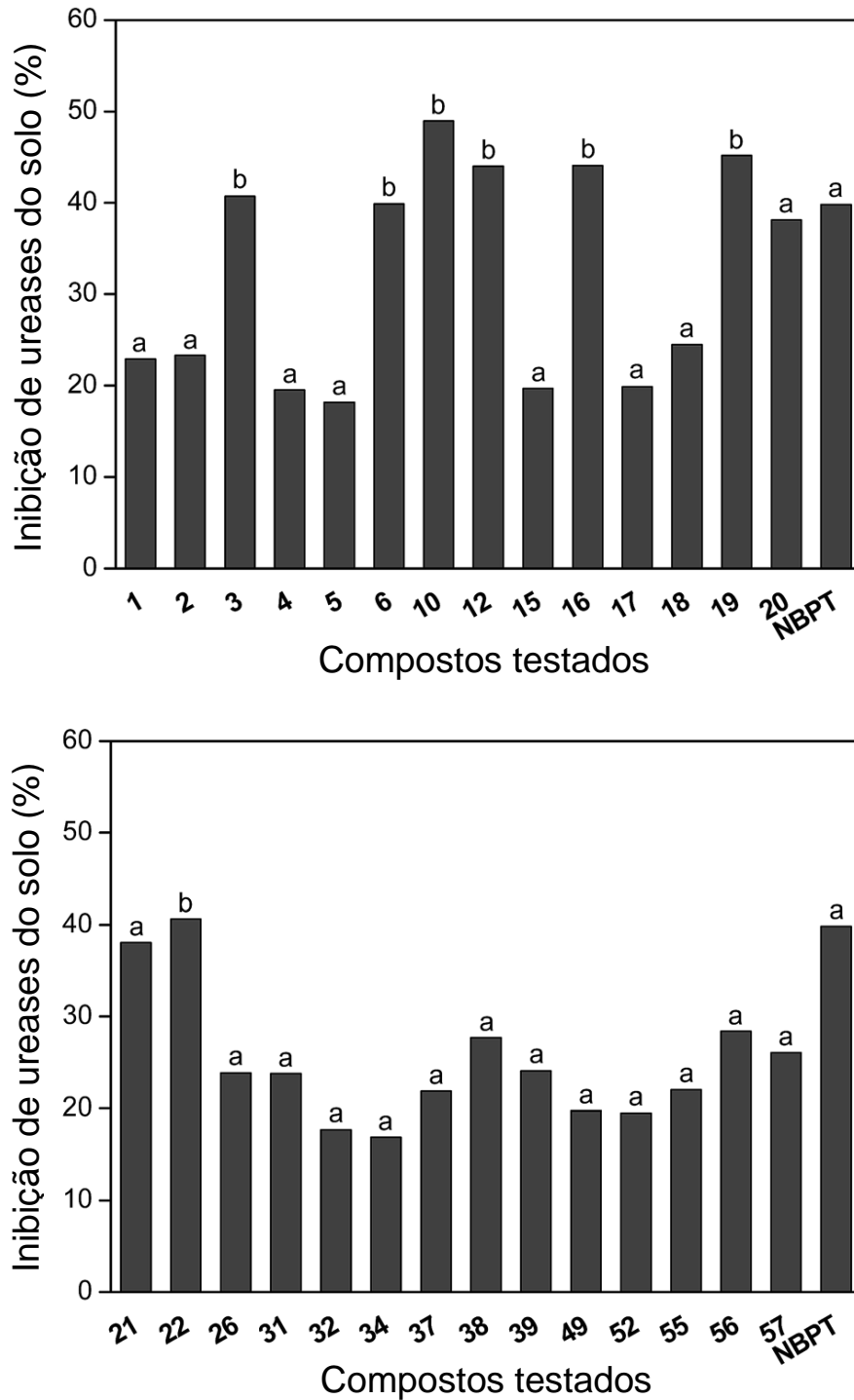
| BTU       | $K_i^a$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $K_i'^a$<br>( $\mu\text{M}$ ) |
|-----------|------------------------------|-------------------------------|
| <b>11</b> | $283,7 \pm 25,8$             | $631,4 \pm 65,1$              |
| <b>12</b> | $1776,6 \pm 670,0$           | $5170,8 \pm 524,0$            |
| <b>14</b> | $166,9 \pm 66,0$             | $380,2 \pm 83,2$              |
| <b>19</b> | $396,7 \pm 11,1$             | $1325,4 \pm 130,2$            |
| <b>20</b> | $475,2 \pm 166,0$            | $824,4 \pm 169,9$             |
| <b>21</b> | $795,6 \pm 90,4$             | $1211,9 \pm 117,1$            |
| <b>22</b> | $308,7 \pm 91,8$             | $1257,5 \pm 99,8$             |
| <b>37</b> | $416,9 \pm 100,1$            | $1349,9 \pm 379,6$            |

<sup>a</sup>  $K_i$  corresponde à constante de equilíbrio de dissociação para o complexo urease-BTU, enquanto  $K_i'$  é a constante de equilíbrio de dissociação para o complexo urease-ureia-BTU. Os valores são a média  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.2.3 Efeito inibitório de BTUs na atividade ureolítica em solo

Como os resultados dos ensaios de inibição *in vitro* revelaram um grande potencial das BTUs como inibidores de urease de *Canavalia ensiformis*, investigamos também, pioneiramente, o potencial de BTUs como inibidores de urease de interesse agrícola utilizando um solo fértil com manejo constante e cultivável, obtido no Cerrado brasileiro. Para estas experiências, o tiofosfato de *N*-(butil)triamida (NBPT) foi usada como uma referência de inibidor de ureases.

A Figura 26 apresenta os resultados para 28 BTUs testadas, estas inibiram a atividade de ureases contidas no solo em pelo menos 15%. A análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de contraste passo a passo permitiram separar as BTUs em dois grupos de inibidores, sendo que no primeiro (grupo **a**) foram incluídos 21 compostos (BTUs **1, 2, 4, 5, 15, 17, 18, 20, 21, 26, 31, 32, 34, 37-39, 49, 52, 55-57**) que se apresentaram tão potentes quanto o NBPT e no segundo (grupo **b**) foram incluídos os compostos mais potentes do que o NBPT (BTUs **3, 6, 10, 12, 16, 19 e 22**;  $P < 0,001$ ) (Figura 26). Outras 19 BTUs (BTUs **9, 11, 14, 24, 25, 27, 29, 30, 33, 35, 41-45, 48, 51, 53 e 54**) inibiram ureases do solo na faixa de 5% a 10%, enquanto os compostos **7, 8, 13, 23, 28, 36, 40, 46, 47, 50, 58-65** falharam em inibir a formação de amônia catalisada pelas ureases do solo.

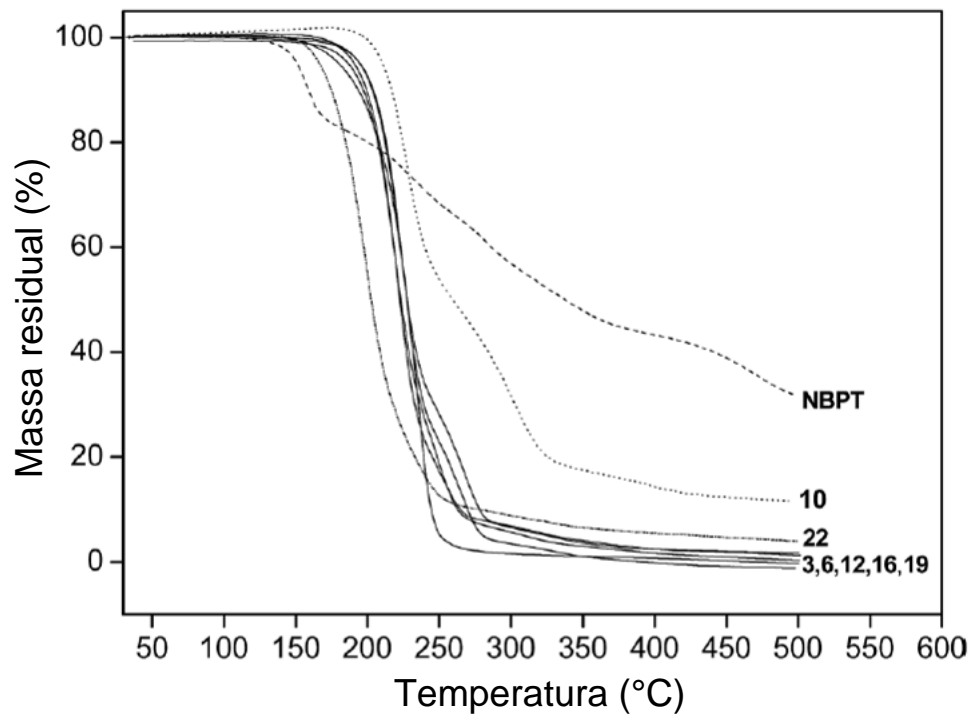


**Figura 26.** Inibição de ureases do solo desencadeada por benzoiltioureias (BTUs). \* Solo tratado (0,5 g) foi incubado com ureia (72 mM) em presença ou ausência dos compostos testados a 0,5 mM. Os resultados são representativos dos experimentos independentes, cada um realizado em quadruplicada ou quintuplicada. Os erros padrões foram menores que 11%. NBPT, inibidor de referência para ureases do solo. Letras distintas indicam uma diferença significativa ( $P < 0.001$ ) de acordo com a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de contraste.

Embora a urease de *Canavalia ensiformis* compartilhe uma elevada similaridade da sequência de aminoácidos com as ureases de outros organismos (KRAJEWSKA, 2009; BALASUBRAMANIAN e PONNURAJ, 2010), resultados contrastantes foram obtidos quando se comparam os resultados *in vitro* com os obtidos em solo. Por exemplo, enquanto as BTUs **26**, **32**, **34** e **38** apresentaram-se inativas nos ensaios *in vitro* (Tabela 3 e 4), estas foram tão eficazes quanto o NBPT em inibir as ureases do solo (Figura 26). Sugerindo que os resultados de ensaios *in vitro*, por si só, não são suficientes para garantir potenciais inibidores de ureases de interesse agrícola. No entanto, ensaios realizados com urease purificada são ferramentas importantes para gerar uma melhor compreensão do mecanismo de ação de um determinado inibidor, assim como fornecer informações estruturais importantes para a concepção de inibidores mais potentes. Além disso, a natureza físico-química e biológica complexa da matriz do solo pode culminar na metabolização de substâncias xenobióticas como é o caso de inibidores de urease sintéticos. Transformações químicas desencadeadas pela microbiota do solo também podem resultar em perda ou ganho de função de alguns xenobióticos.

#### 4.2.4 Estabilidade térmica das BTUs

As BTUs incluídas no grupo dos melhores inibidores de ureases em solo (**3**, **6**, **10**, **12**, **16**, **19** e **22**) foram avaliadas quanto as suas estabilidades térmicas, para comprovação de suas estabilidades em condições de exposição à temperaturas elevadas. As curvas termogravimétricas mostram claramente que todas as BTUs testadas são mais estáveis termicamente do que o NBPT (Figura 27). O evento de perda de massa para os compostos **10** (BTU mais estável) e **22** (BTU menos estável) começa a 210 °C e 166 °C, respectivamente, enquanto o NBPT começa a perder massa a 151 °C (Figura 27). As outras BTUs (**3**, **6**, **12**, **16** e **19**) mostram uma perda de massa na faixa de temperatura de 180 °C a 195 °C. Outras BTUs são referidas como sendo resistentes ao aquecimento (SAEED et al., 2014; MERDIVAN et al., 1999; DEL CAMPO et al., 2002).



**Figura 27.** Comportamento termogravimétrico das benzoiltioureas mais promissoras nos testes envolvendo inibição de ureases do solo. NBPT foi utilizado como inibidor referência para ureases do solo.

Cabe ressaltar que as BTUs sintetizadas possuem algumas características importantes para uma possível aplicação como aditivo em fertilizantes, como por exemplo: (i) os materiais de partida são disponíveis comercialmente, (ii) os produtos são obtidos em um só recipiente de reação realizada em apenas dois passos, sem necessidade de purificação adicional dos isotiocianatos de benzoíla formados como intermediários, (iii) os produtos são facilmente purificados a partir de recristalização e (iv) os produtos são sólidos e termicamente estáveis, facilitando o armazenamento e transporte. Estas propriedades das BTUs são particularmente interessantes quando comparados com os de NBPT, um pró-inibidor de ureases utilizado como aditivo em adubos à base de ureia. Diferentemente das BTUs, o NBPT é difícil de manusear porque é obtido como um material pegajoso e ceroso (SUTTON e THORNSBERRY, 2013).

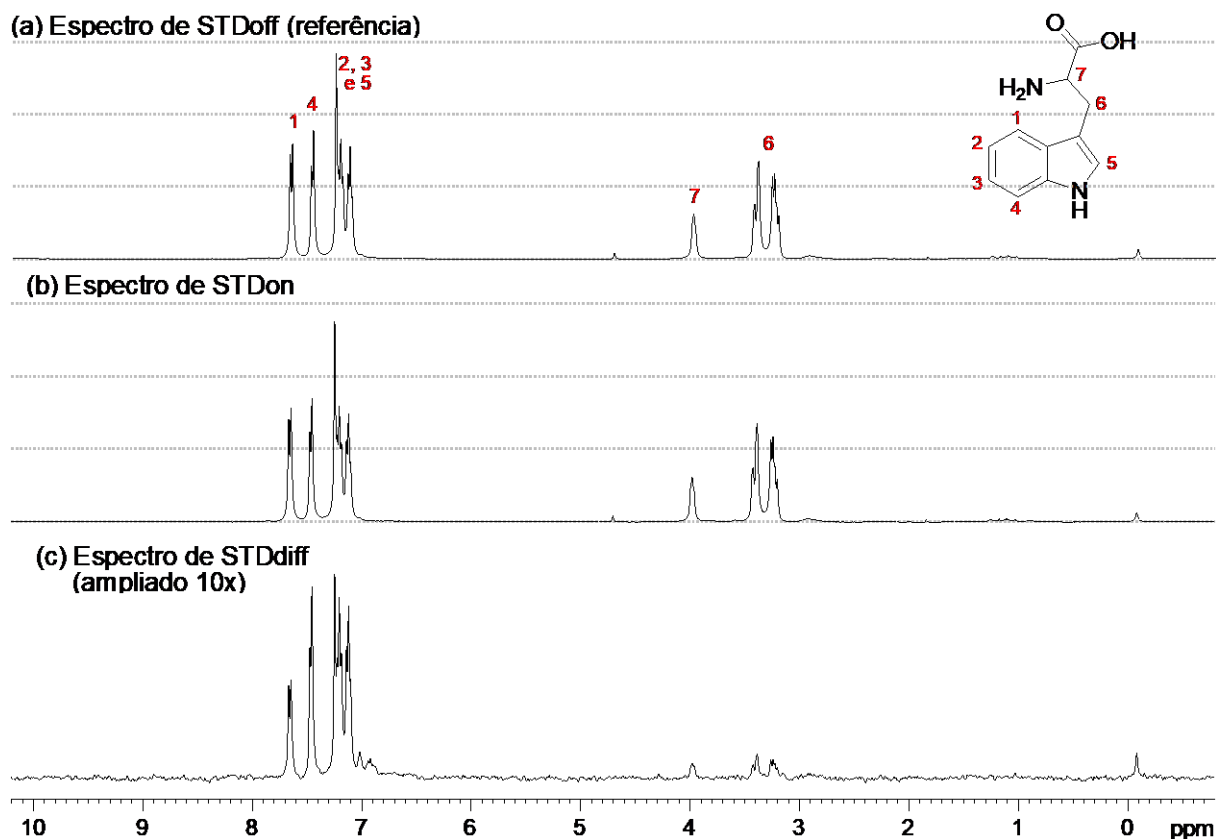
#### 4.3 ESTUDO DE INTERAÇÃO ENTRE BENZOILTIOUREIAS E UREASE DE *C. ENSIFORMIS* POR TÉCNICAS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

##### 4.3.1 Estudo modelo e implementação da técnica de STD no Laboratório Multiusuário de Espectroscopia da UEL

Experimentos envolvendo o uso de albumina isolada de soro humano (HSA) ou isolada de soro bovino (BSA) como macromolécula e triptofano ou seus derivados sintéticos como ligantes são relatados como modelos para implementação da técnica de STD (VIEGAS et al., 2011; ROWE et al., 2015). A investigação destes sistemas através de STD constitui uma forma eficaz de validar a implementação desta técnica em laboratórios de RMN.

Em nosso estudo modelo, foi utilizado uma solução de BSA (20  $\mu\text{M}$ ) contendo L-triptofano (2 mM) em tampão fosfato (pH 7,4) e solvente  $\text{D}_2\text{O}$ . O experimento de STD foi então configurado de acordo com a seção 3.2.6.

Após o processamento, foram obtidos dois espectros fora de ressonância ( $\text{STD}_{\text{off}}$ ) e dois espectros em ressonância ( $\text{STD}_{\text{on}}$ ) sendo seus pares somados gerando apenas um  $\text{STD}_{\text{off}}$  e um  $\text{STD}_{\text{on}}$ . O espectro de  $\text{STD}_{\text{off}}$  pode ser considerado como um controle negativo, sendo que as intensidades de sinais devem ser idênticas aos de um experimento de  $^1\text{H}$  convencional. No espectro de  $\text{STD}_{\text{on}}$  obtido (Figura 28b) verifica-se inicialmente uma tênue redução nas intensidades das ressonâncias do ligante, em comparação com o espectro de  $\text{STD}_{\text{off}}$  (Figura 28a), devido à transferência de saturação, indicando o caráter ligante do L-triptofano com a BSA. A subtração dos espectros  $\text{STD}_{\text{off}} - \text{STD}_{\text{on}}$  forneceu o espectro de  $\text{STD}_{\text{diff}}$  (Figura 28c), onde as intensidades das ressonâncias podem ser analisadas qualitativamente pela comparação com  $\text{STD}_{\text{off}}$ , neste sentido pode-se verificar que as ressonâncias dos hidrogênios do L-triptofano interagem de maneira claramente distinta.



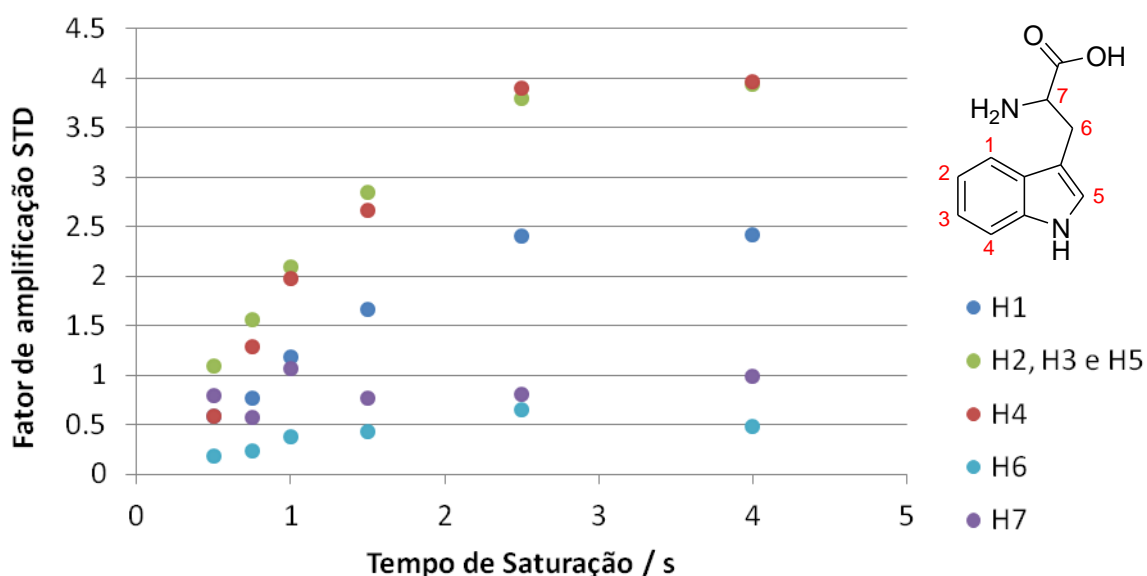
**Figura 28.** Representação dos espectros obtidos para o sistema L-triptofano/BSA, evidenciando: **(a)** Espectro de STD<sub>off</sub> (referência; adquirido com saturação fora de ressonância) e atribuição dos sinais de <sup>1</sup>H do L-triptofano; **(b)** Espectro de STD<sub>on</sub> (adquirido com saturação seletiva da proteína); **(c)** Espectro de STD<sub>diff</sub>. Parâmetros: [BSA] = 20 μM; [L-triptofano] = 2 mM; tampão fosfato deuterado pH 7,4; STD: t<sub>sat</sub> = 2,5 s; Gauss1.100 = 50 ms; Sinc1.1000 = 2 ms.

Com o objetivo de otimizar o tempo de saturação, foram obtidos uma série de espectros de STD variando o tempo de saturação de 0,5 a 4 s, totalizando 6 experimentos. Para uma análise quantitativa das saturações efetivamente transferidas para cada hidrogênio do ligante, calculou-se o fator de amplificação para cada ressonância dos espectros de STD obtidos, utilizando a seguinte fórmula,

$$A_{STD} = \left( \frac{I_0 - I_{SAT}}{I_0} \right) \times \left( \frac{[L]}{[P]} \right) = \left( \frac{I_{STDdiff}}{I_0} \right) \times \text{razão molar (L/P)} \quad (3)$$

onde as intensidades das ressonâncias nos espectros de STD<sub>off</sub>, STD<sub>on</sub> e STD<sub>diff</sub> são definidas como I<sub>0</sub>, I<sub>SAT</sub> e I<sub>STDdiff</sub>, respectivamente. Este cálculo também permite a correção das discrepâncias que possam ter sido geradas durante a aquisição de cada STD, corrigindo também os valores em função da razão molar ligante/proteína (VIEGAS et al., 2011).

O resultado dos cálculos de  $A_{STD}$  são expressos na Figura 29, onde se evidencia um aumento na saturação dos hidrogênios do L-triptofano com o aumento do tempo de saturação da proteína. A curva chega a um máximo em 2,5 s, evidenciando que um máximo efeito STD é alcançado neste tempo. Após 2,5 s os valores tornam-se constantes, com probabilidade de resaturação do ligante elevada e que por este motivo não se recomenda sua utilização para o cálculo do mapa de epítomos, que será demonstrado em seguida. Os sinais dos hidrogênios H2, H3 e H5 não puderam ser calculados separadamente, devido à sobreposição destes nos espectros.

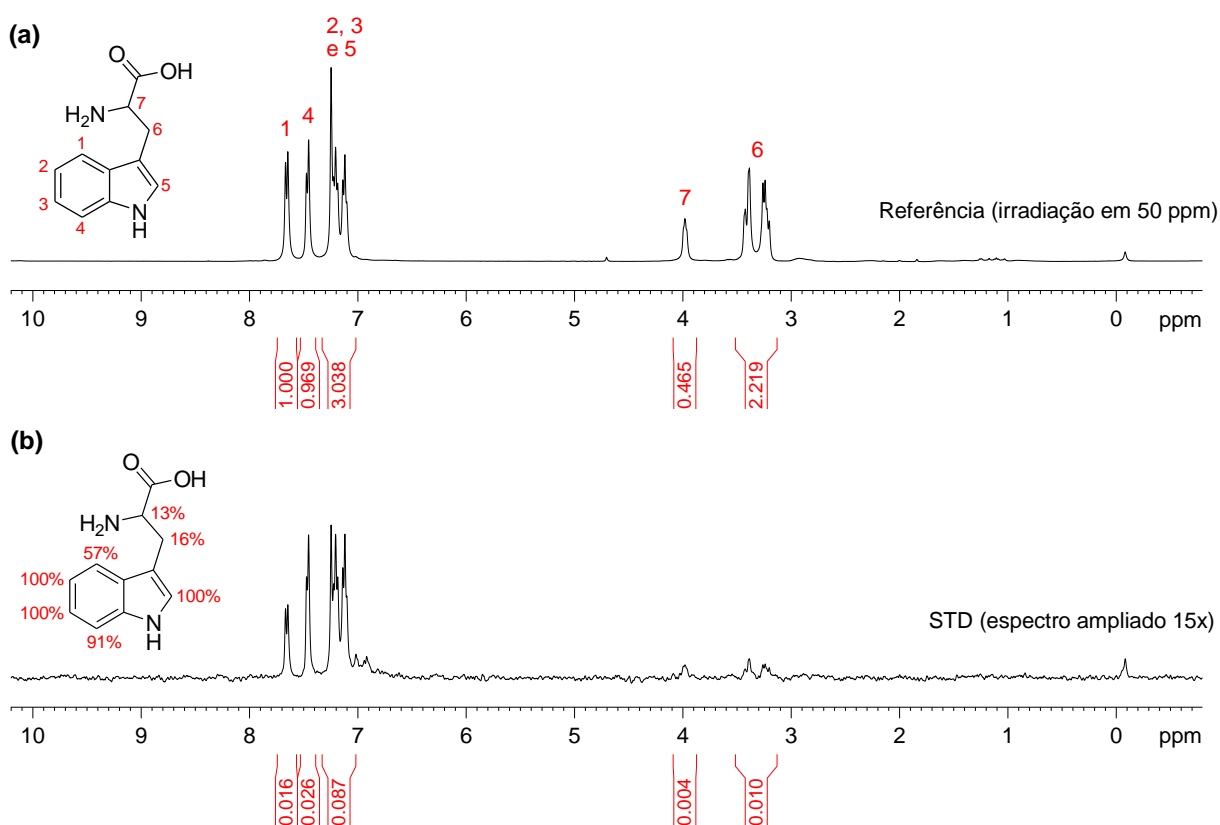


**Figura 29.** Fator de amplificação em função do tempo de saturação para o sistema BSA-Triptofano. [BSA] = 20  $\mu$ M; [Triptofano] = 2,0 mM; [EL] = 100; tampão fosfato (20 mM, pH 7,4). A proteína foi irradiada com um trem de pulsos Gaussianos em 0,5 ppm na obtenção dos espectros com transferência de saturação e em 50 ppm nos espectros controle.

Assumindo que todos os hidrogênios do ligante tenham uma relaxação similar, a diferença entre a resposta do efeito STD para cada hidrogênio do ligante (L-triptofano) reflete a relativa proximidade destes em relação ao sítio de ligação da macromolécula (albumina).

O termo epítomo é frequentemente utilizado na literatura para caracterizar os hidrogênios do ligante que estão mais próximos da proteína quando estes se ligam (ROWE et al., 2015). Para uma melhor interpretação do efeito STD, calculou-se então a intensidade relativa de efeito STD a partir dos valores de  $A_{STD}$  (mapa de epítomos considerando o fator de amplificação) utilizando o espectro de

STD com tempo de saturação de 1,5 s, pois este corresponde à máxima separação entre os sinais na Figura 30. O sinal com maior  $A_{STD}$  foi determinado como 100% (para os sinais de H2, H3 e H5), conforme equação 3, o que evidencia uma interação mais efetiva entre estes hidrogênios do ligante e a proteína, sendo o restante dos sinais calculados em função deste (Figura 30b). O resultado obtido confirma uma maior interação da porção aromática do ligante com a proteína e interação singela para a porção alifática (H7 e H6). Os dois hidrogênios diastereotópicos (H6) apresentaram um efeito STD ligeiramente diferentes, entretanto devido a uma baixa intensidade destes sinais no espectro de diferença, foram calculados em conjunto.



**Figura 30.** (a) Espectro referência e atribuição dos sinais de  $^1\text{H}$  do L-triptofano; (b) Espectro de STD e mapa de epítomos de L-triptofano interagindo com BSA, determinado através do fator de amplificação. Parâmetros:  $[\text{BSA}] = 20 \mu\text{M}$ ;  $[\text{L-triptofano}] = 2 \text{ mM}$ ; tampão fosfato deuterado pH 7,4; STD:  $t_{\text{sat}} = 1,5 \text{ s}$ ; Gauss1.100 = 50 ms; Sinc1.1000 = 2 ms.

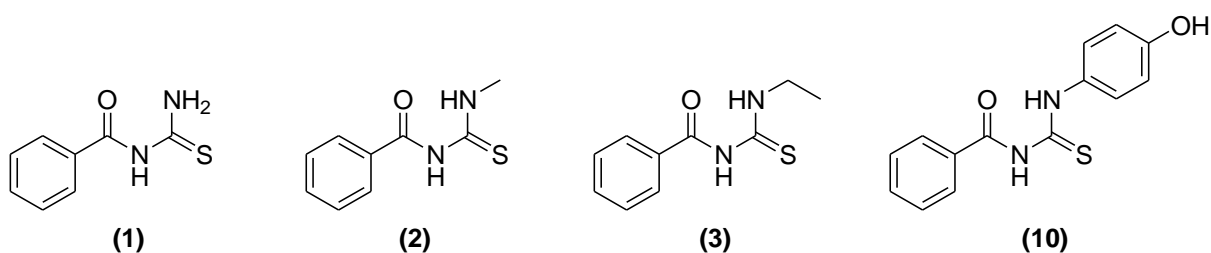
Todos os dados obtidos foram comparados com os relatados na literatura e estão de acordo com os valores descritos (ROWE et al., 2015). Esta evidência confirma o sucesso da implementação da técnica no equipamento Bruker Avance III operando a 400 MHz. Além disto, foram obtidos bons espectros de STD

com poucas modificações no experimento padrão (stdiffesgp.3, fornecido pelo fabricante do equipamento - Bruker®. Ver seção 3.2.6 para maiores detalhes). Entretanto, apesar do experimento de STD ser relativamente simples, a configuração adequada dos parâmetros deve ser cuidadosamente ajustada para cada sistema em estudo.

#### 4.3.2 Estudo de interação de BTUs com urease de *Canavalia ensiformis* por STD

Utilizando soluções de urease *Canavalia ensiformis* (20 ou 40  $\mu\text{M}$ ) contendo o inibidor BTU **1** (2 mM) (Figura 31) foram obtidos uma série de espectros de STD para otimização dos seguintes parâmetros: tempo de saturação, concentração da enzima, temperatura, forma e comprimento do pulso envolvido na saturação da proteína. O composto BTU **1** foi escolhido para realização destes experimentos, devido ao fato de este apresentar melhor solubilidade na solução da enzima tamponado em  $\text{D}_2\text{O}$ , contendo 10% de metanol deuterado. As concentrações acima de 15% de metanol podem ocasionar a inibição da enzima e comprometer os resultados (AWLLIA et al., 2015). Todos os espectros de STD relatados nesta seção foram obtidos utilizando a mesma sonda de 5 mm.

Uma das maiores limitações encontradas durante a realização dos espectros de STD diz respeito à solubilidade dos compostos no meio requerido. Entretanto, com o aumento da temperatura do experimento, de 25 °C para 35 °C, não foi observada formação de precipitado e foram obtidos bons espectros de STD quando utilizadas as BTUs **1**, **2**, **3** e **10** (Figura 31). Para alguns compostos a precipitação ocorreu instantaneamente após a adição do inibidor e em outros o composto precipitou durante a obtenção dos espectros, sendo os resultados descartados nestes casos.



**Figura 31.** Estrutura dos compostos utilizados nos estudos de STD.

Na sequência, os parâmetros foram otimizados para o sistema em estudo, sendo então calculados os fatores de amplificação das BTUs **1** e **2** e os mapas de epítomos dos compostos **1**, **2**, **3** e **10**, revelando quais hidrogênios de cada composto interagem mais eficientemente com a urease de *Canavalia ensiformis*.

Em todos os espectros de STD obtidos utilizando a urease de *Canavalia ensiformis* tipo III, foram verificados sinais entre 3,0 e 4,0 ppm, que são correspondentes à glicose, utilizada como estabilizante da formulação da enzima utilizada. A glicose não interage com a urease e portanto seus sinais não devem estar presentes nos espectros de STD<sub>diff</sub>. Este princípio foi adotado como um controle negativo em nossos estudos.

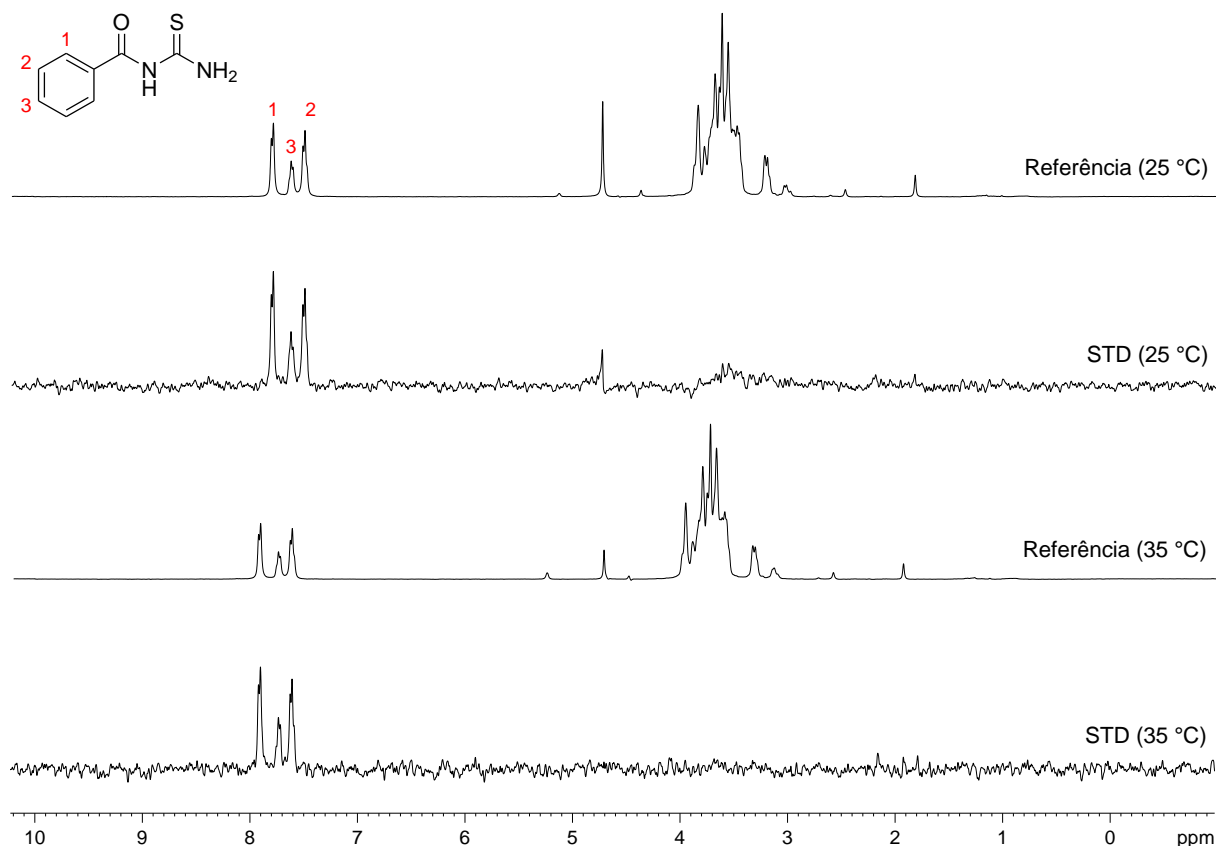
#### 4.3.2.1 Efeito da temperatura

A temperatura afeta a cinética do processo de equilíbrio e a dinâmica da proteína livre ou complexada com o ligante, gerando um aumento ou redução das taxas de  $k_{off}$  e/ou  $k_{on}$ . Devido a isto, a otimização da temperatura do experimento de STD de modo a se obter maior intensidade de sinal e, conseqüentemente, reduzir o tempo do experimento, deve ser previamente avaliada para verificar se o aumento ou redução da temperatura irá causar o efeito desejado (GROVES et al., 2007).

Groves e colaboradores (2007), avaliaram a influência da temperatura no efeito STD, utilizando seis sistemas distintos, relatando um aumento na intensidade dos sinais do espectro de STD através da redução da temperatura para os sistemas macromoléculas/ligantes: galectina7/lactose, anexinaA6/mistura de nucleotídeos e diidrofolato redutase/trimetoprima (a temperatura foi reduzida de 25 para 8 °C, 37 para 8 °C e 30 para 4 °C, respectivamente). Entretanto, utilizando a proteína-S como macromolécula e o peptídeo-S M13A, ocorreu uma redução no efeito STD quando a temperatura foi reduzida de 37 para 8 °C, com valores de  $k_{off}$  estimados em  $15\text{ s}^{-1}$  a 37°C e  $1,5\text{ s}^{-1}$  a 8 °C (GROVES et al., 2007).

A obtenção de espectros de STD envolvendo o sistema UCE-BTU **1** indicou ocorrer pouca variação de efeito STD quando a temperatura do experimento foi aumentada de 25 para 35 °C (Figura 32), entretanto este efeito pode variar dependendo do inibidor utilizado, devido aos fatores supracitados e também do tipo

de inibição provocada por este, sendo que no caso de inibidores mistos, por exemplo, a temperatura pode ocasionar mudanças no comportamento de ligação, favorecendo a inibição alostérica, por exemplo, e como consequência pode dificultar a comparação do efeito STD entre inibidores deste tipo.



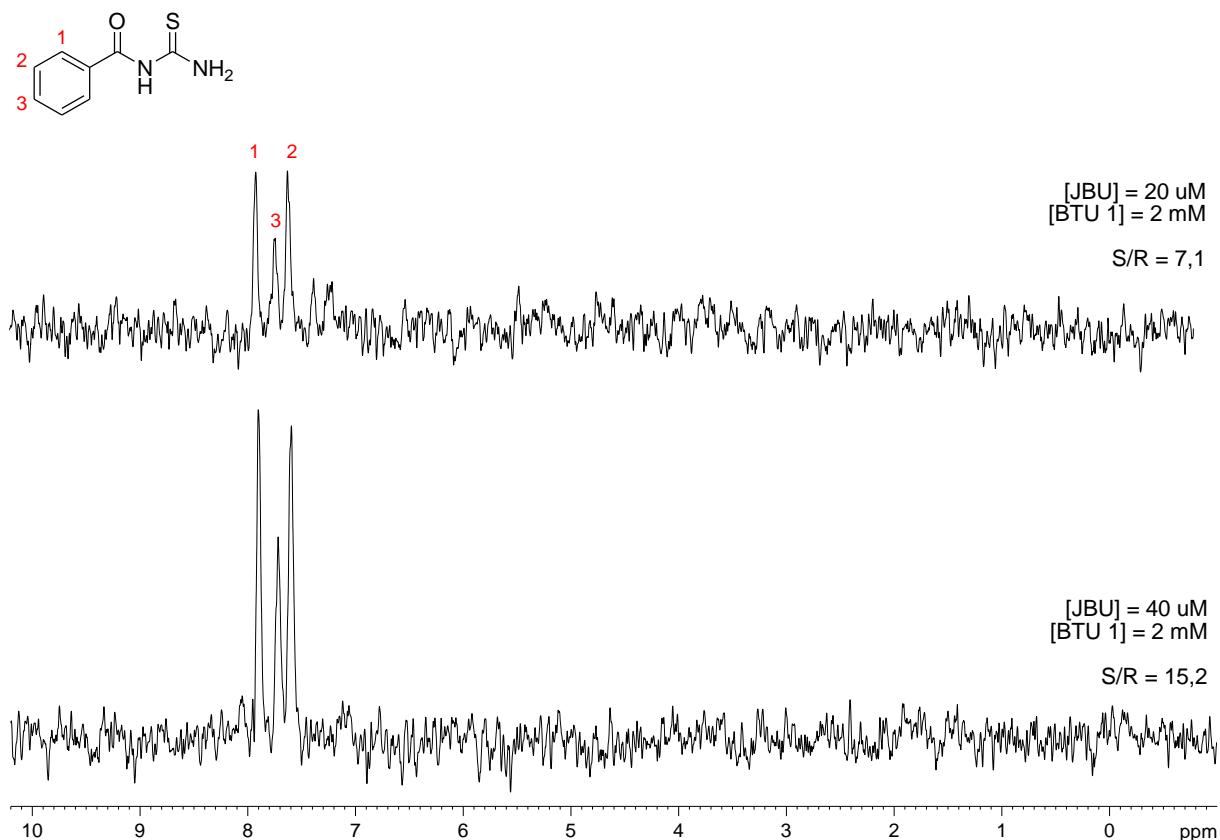
**Figura 32.** Espectros de STD obtidos em temperaturas de 25 e 35 °C. Parâmetros: [UCE] = 20  $\mu$ M; [BTU 1] = 2 mM; tampão fosfato deuterado, pH 7,4; STD:  $t_{\text{sat}}$  = 2,5 s; Gauss1.100 = 50 ms; Sinc1.1000 = 2 ms; número de *scans*: 64.

#### 4.3.2.2 Efeito da concentração da enzima

A concentração da proteína deve ser ajustada para se obter um máximo efeito STD, entretanto, o aumento da concentração da proteína pode favorecer a ligação em sítios não específicos (ROWE et al., 2015). Também deve-se manter sempre uma razão ligante/proteína na ordem de 10 a 100x, devido a fatos já citados anteriormente.

Para o nosso sistema, o aumento na concentração da UCE de 20 para 40  $\mu$ M, mantendo a concentração do inibidor BTU 1 em 2 mM, provou ser conveniente para a realização de experimentos robustos, fornecendo espectros de

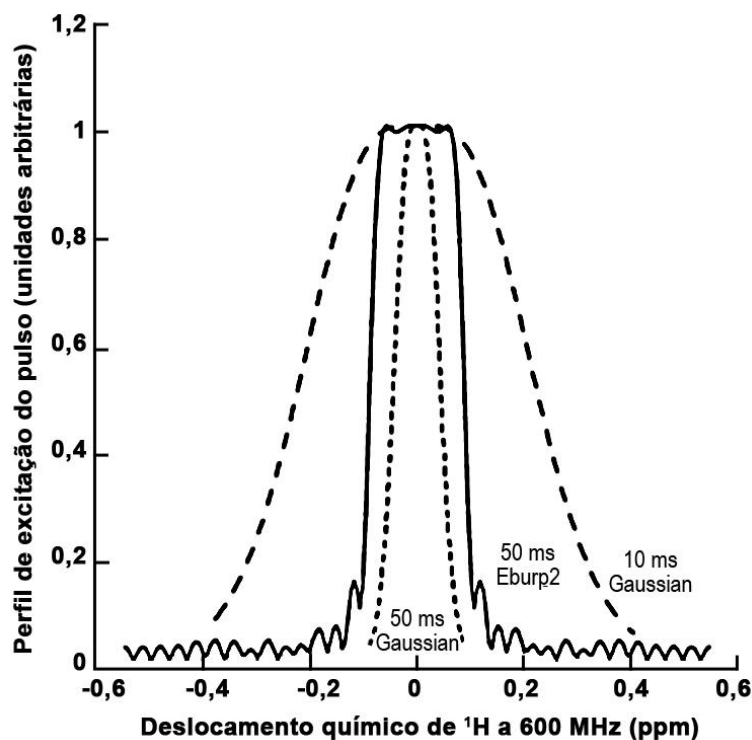
STD<sub>diff</sub> (Figura 33) com resoluções aproximadamente duas vezes maiores, o que possibilitou uma redução do número de acumulações e conseqüentemente do tempo de aquisição dos experimentos subsequentes.



**Figura 33.** Espectros de STD, utilizando duas concentrações diferentes de enzima urease (20 e 40  $\mu$ M), mantendo a concentração do ligante (2 mM). S/R = razão sinal ruído. Parâmetros: tampão fosfato deuterado, pH 7,4; STD:  $t_{\text{sat}} = 2,5$  s; Gauss1.1000 = 50 ms; Sinc1.1000 = 2 ms; número de scans: 32.

#### 4.3.2.3 Otimização da forma do pulso de excitação seletiva da proteína

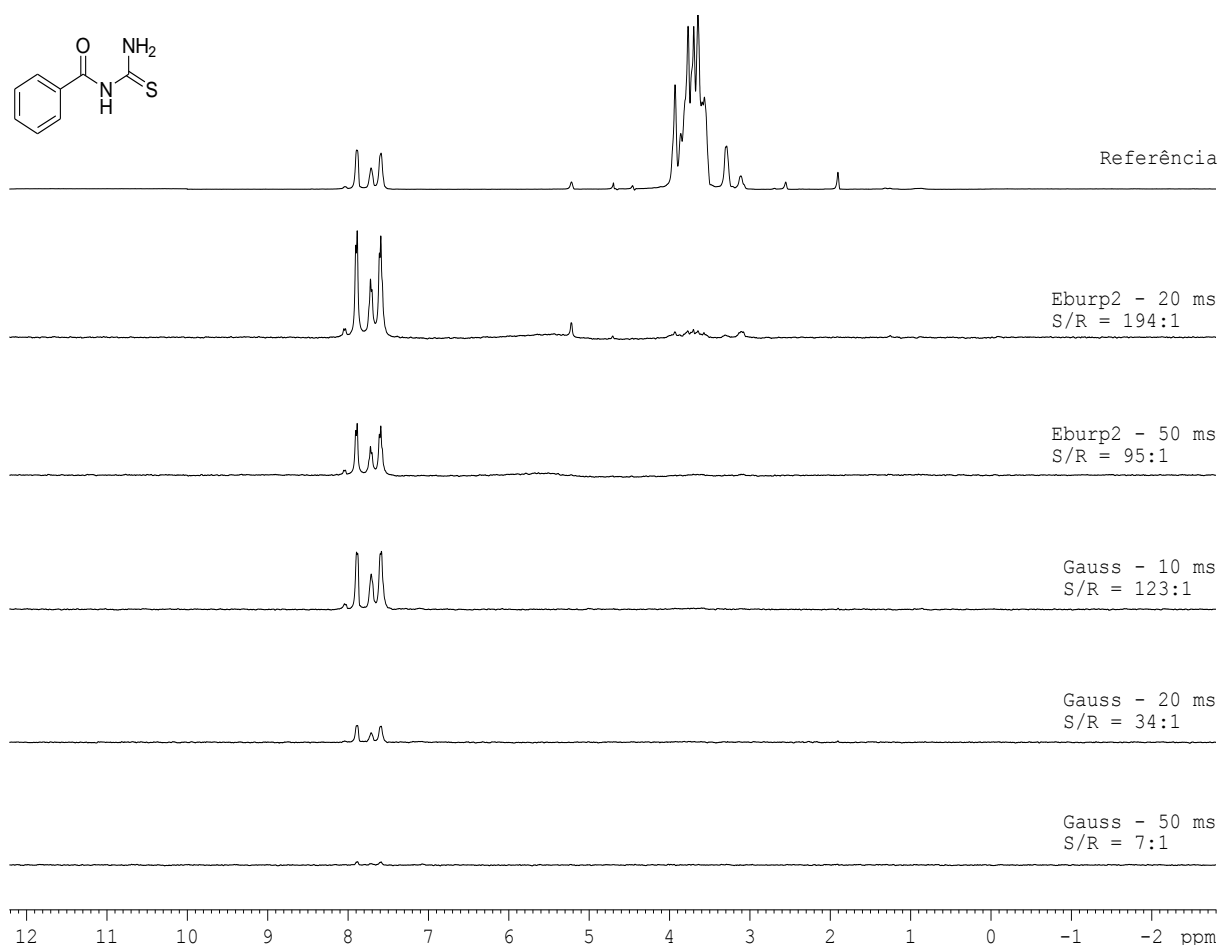
Alguns estudos sugerem que o formato do pulso seletivo de saturação da proteína produz melhores resultados quando se utiliza o Eburp2 em substituição ao tradicional Gaussian1 (LEY et al., 2014), que possuem diferentes perfis de excitação (Figura 34).



**Figura 34.** Perfil de excitação dos pulsos Gaussian1.1000 e Eburp2.1000 em função da largura de excitação em ppm, tendo como referência um espectrômetro Bruker operando a 600 MHz. (Modificado de ROWE et al., 2015).

Para nosso sistema, o pulso Eburp2, apesar de produzir espectros com melhor resolução e maiores relações sinal/ruído (Figura 35), aparentemente causou perturbações nas intensidades do sinal da glicose (que não é um inibidor da enzima) quando aplicados pulsos com comprimento entre 50 e 20 ms. Utilizando a forma de pulso Gaussian1 verificou-se uma alta relação sinal/ruído (123:1), sem atenuação aparente dos sinais da glicose, quando utilizado uma largura de pulso de 10 ms, sendo esta configuração adotada então nos experimentos descritos a seguir.

O efeito de atenuação dos sinais da glicose verificado nos espectros de STD obtidos utilizando um pulso Eburp2 (Figura 35), pode ser explicado através do seu perfil de excitação (Figura 34). Este formato de pulso gera pequenas regiões de excitação em torno da região central do pulso, que se propagam ao longo de alguns ppm's, entretanto a região de excitação máxima é alta, o que explica as melhores relações sinal-ruído obtidas comparando com o formato de pulso Gaussian, que por sua vez produz um máximo efeito de excitação com uma largura menor (em ppm's) e um decaimento uniforme após o valor máximo (ROWE et al., 2015).



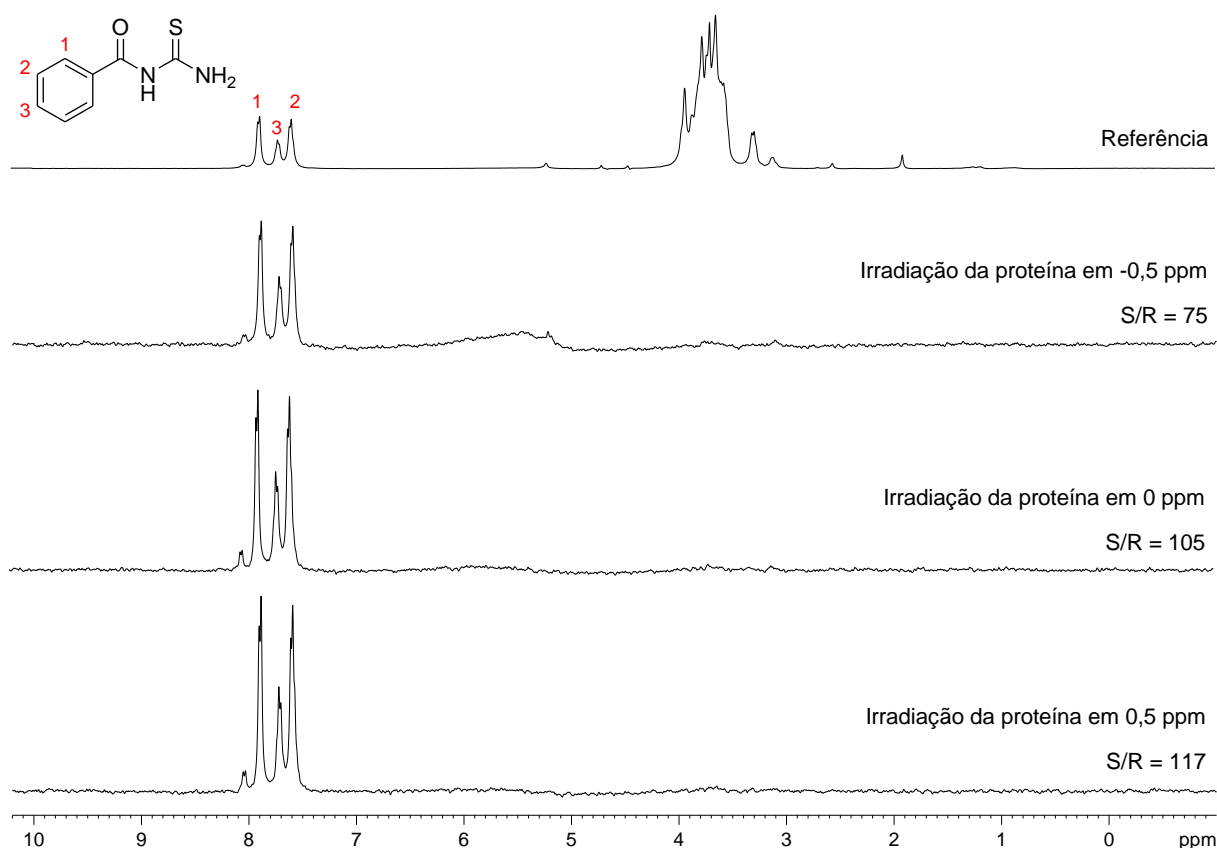
**Figura 35.** Espectro referência (superior) e espectros de STD obtidos utilizando perfis de excitação Eburp2 e Gauss com diferentes larguras de pulso (entre 50 e 20 ms), e respectiva razão sinal (S/R) ruído obtido em cada experimento. Parâmetros: [UCE] = 40  $\mu$ M; [BTU 1] = 2 mM; tampão fosfato deuterado, pH 7,4; STD:  $t_{\text{sat}}$  = 2,5 s; Sinc1.1000 = 2 ms; número de scans: 32.

#### 4.3.2.4 Otimização da frequência de irradiação seletiva da enzima

A frequência escolhida para a saturação da proteína é mais um dos fatores a ser otimizados, devendo-se considerar que apenas os sinais desta devem ser irradiados, para isto, a distância entre a região de irradiação e os sinais dos ligantes deve ser maior que 1 ppm, para evitar a saturação cruzada. Para uma saturação mais efetiva, recomenda-se que esta escolha seja feita com base em um espectro de  $^1\text{H}$  da proteína, devendo-se escolher uma região onde esta possua sinais de ressonância aparentes. Porém, no caso de macromoléculas com massa molecular elevada (> 100 kDa), como é o caso da UCE (272– 545 kDa), não são observados sinais da proteína, portanto a otimização deve ser realizada testando diferentes frequências de irradiação. Valores entre 1 e -2 ppm são os mais

comumente adotados, mas também pode-se saturar a proteína irradiando na região de aromáticos (entre 7 e 8 ppm) se o ligante não possuir sinais nesta região (ROWE et al., 2015).

Neste sentido, para a otimização da frequência de saturação da UCE, foram testadas três regiões de irradiação, 200, 0 e -200 Hz (-0,5, 0 e 0,5 ppm, respectivamente para espectrômetro de 400MHz). Os resultados (Figura 36) evidenciaram uma maior transferência de saturação da UCE para o inibidor BTU 1 quando o sistema foi irradiado em 200 Hz, fornecendo a melhor relação sinal/ruído (117:1) dentre os espectros de STD avaliados.



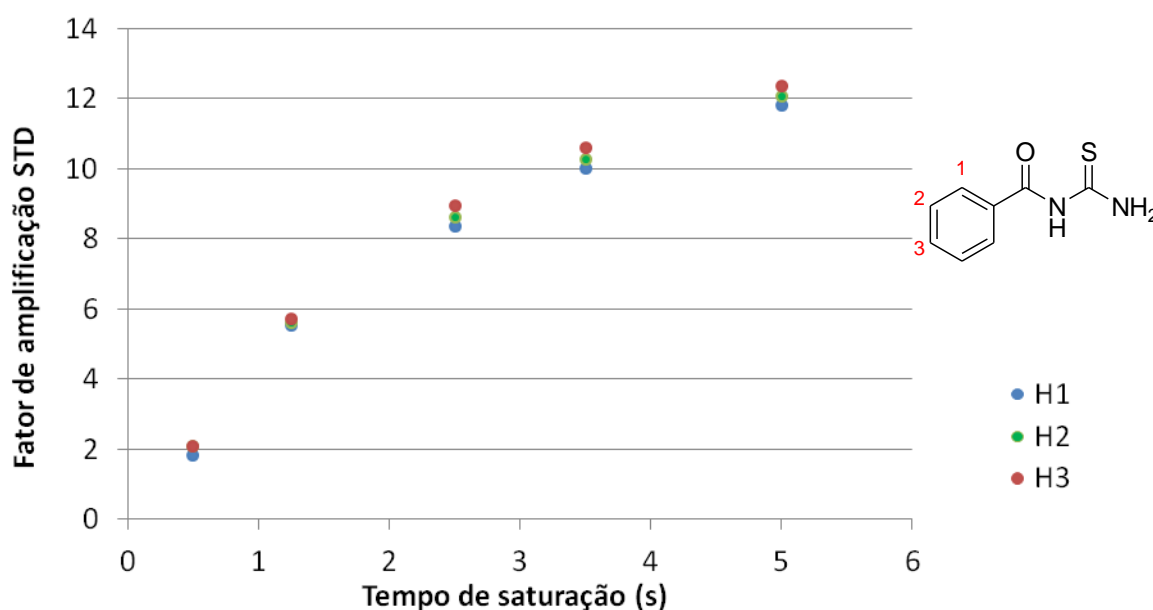
**Figura 36.** Espectro referência e STD obtidos variando a região de irradiação seletiva da proteína (-0,5 ppm; 0 ppm; 0,5 ppm) com seus respectivos valores calculados da relação sinal ruído (S/R). Parâmetros: [UCE] = 40  $\mu$ M; [BTU 1] = 2 mM; tampão fosfato deuterado, pH 7,4; STD:  $t_{\text{sat}}$  = 2,5 s; Gauss1.1000 = 10 ms; Sinc1.1000 = 2 ms; número de scans: 32.

No experimento com irradiação em -200 Hz (Figura 36), se observou uma redução na intensidade dos sinais do espectro de STD em comparação com os outros dois experimentos, revelando uma transferência de saturação da UCE para o inibidor cerca de duas vezes menor. A irradiação em 0 Hz, produziu espectros com

relação sinal/ruído de 105:1, e portanto, para uma melhor resolução dos sinais nos espectros de STD, a região de saturação seletiva da UCE ótima foi determinada como 200 Hz (razão sinal/ruído de 117:1).

#### 4.3.2.5 Fatores de amplificação e mapa de epítomos dos sistemas UCE-BTUs

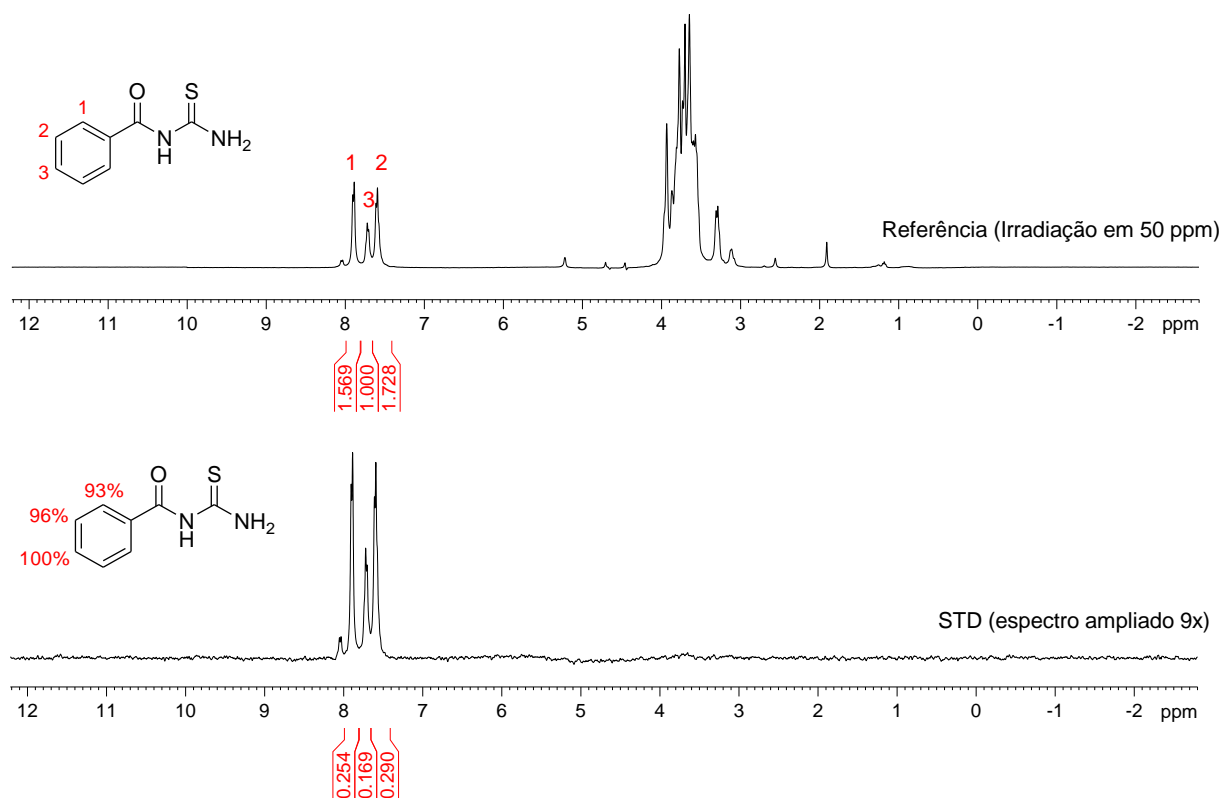
Para obtenção do fator de amplificação da BTU **1** (2 mM) em presença da UCE (40  $\mu$ M - razão L/E=50), foram obtidos espectros de STD com tempos de saturação entre 0,5 e 5,0 s, em um total de cinco pontos para composição da curva (Figura 37). Nestes experimentos, constatou-se que até o tempo de 5,0 s ainda não alcançou o equilíbrio (valores de  $A_{STD}$  constantes), entretanto não foram utilizados tempos de saturação maiores, devido aos riscos de ocorrer religação. Nos tempos de saturação de 2,5, 3,5 e 5,0 s, verificou-se uma melhor separação entre os fatores de amplificação, sendo o espectro obtido com 2,5 s de saturação utilizado para o cálculo do mapa de epítomos.



**Figura 37.** Gráfico do fator de amplificação em função do tempo de saturação para o sistema Urease-BTU **1** ([Urease] = 40  $\mu$ M; [BTU **1**] = 2,0 mM; [EL] = 50; pH 7,4 tampão fosfato). A proteína foi irradiada com um trem de pulsos Gaussianos em 0,5 ppm na obtenção dos espectros com transferência de saturação e em 50 ppm nos espectros controle.

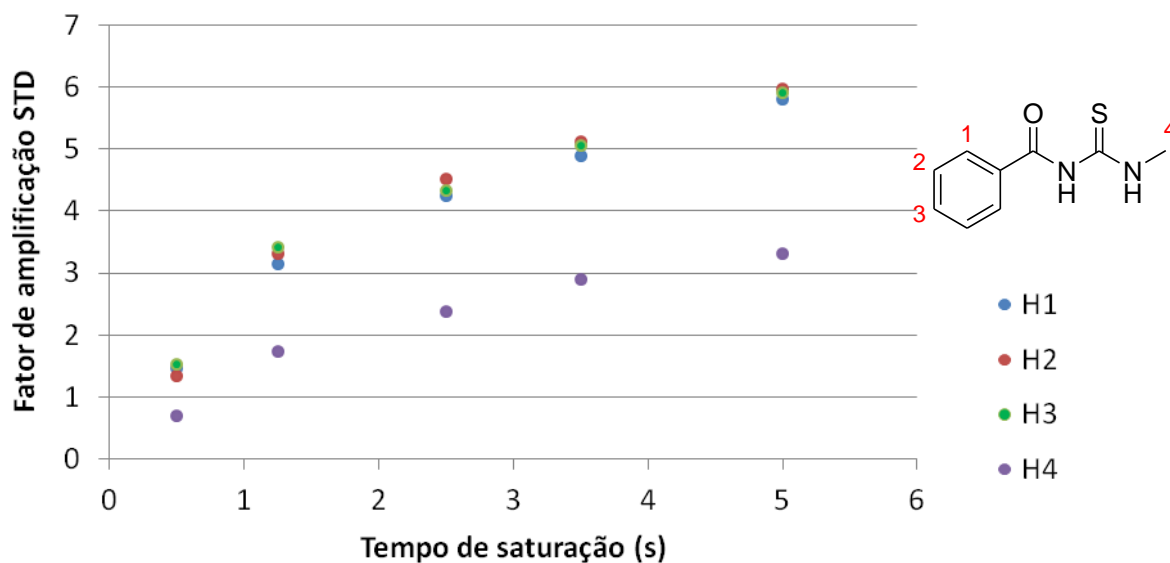
O mapa de epítomos calculado considerando o fator de amplificação (Figura 38) revelou uma interação similar para ambos os prótons do anel aromático,

neste caso sendo possível pressupor uma interação do tipo hidrofóbica, com máxima eficiência de transferência de saturação observada para o hidrogênio 3 do anel. No caso dos hidrogênios do núcleo tioureia, estes facilmente sofrem troca isotópica em presença de  $D_2O$ , o que impossibilitou mensurar a interação desta porção dos ligantes aqui estudados com a enzima.



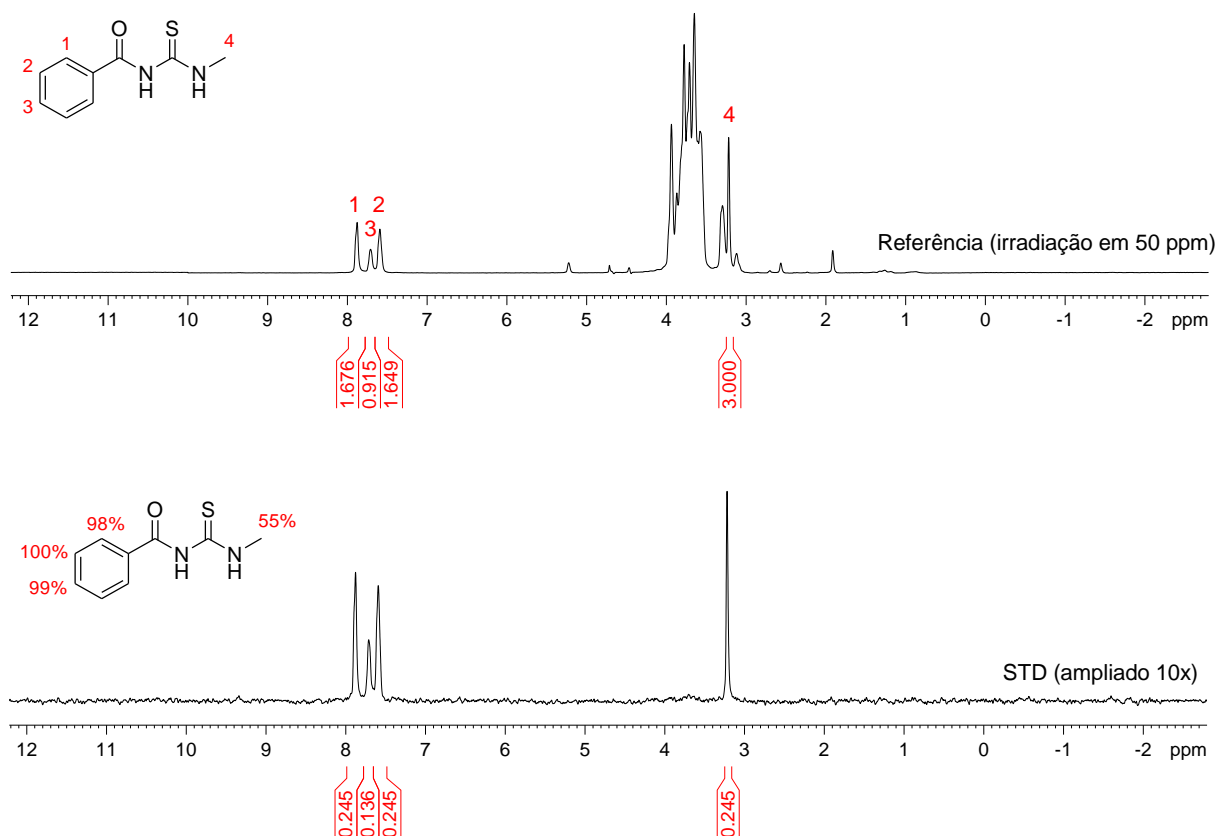
**Figura 38.** Espectro referência e atribuição dos sinais de  $^1H$  do inibidor BTU 1 (a) e mapa de epítomos da BTU 1 interagindo com a urease, determinado através do espectro de STD (b). Parâmetros: [UCE] = 40  $\mu$ M; [BTU 1] = 2 mM; tampão fosfato deuterado, pH 7,4; STD:  $t_{sat}$  = 2,5 s; Gauss1.1000 = 10 ms; Sinc1.1000 = 2 ms; número de scans: 32.

Na avaliação da interação do inibidor BTU 2 (1 mM) com a urease (UCE, 40  $\mu$ M - razão L/E=25), o fator de amplificação obtido a partir de cinco tempos de saturação diferentes (0,5, 1,25, 2,5, 3,5 e 5,0 s) (Figura 39), evidenciou uma diferença significativa de transferência de saturação entre os hidrogênios aromáticos e alifáticos. A melhor separação entre os valores de  $A_{STD}$  foi verificada em um tempo de 2,5 s, sendo este utilizado na determinação do mapa de epítomos.



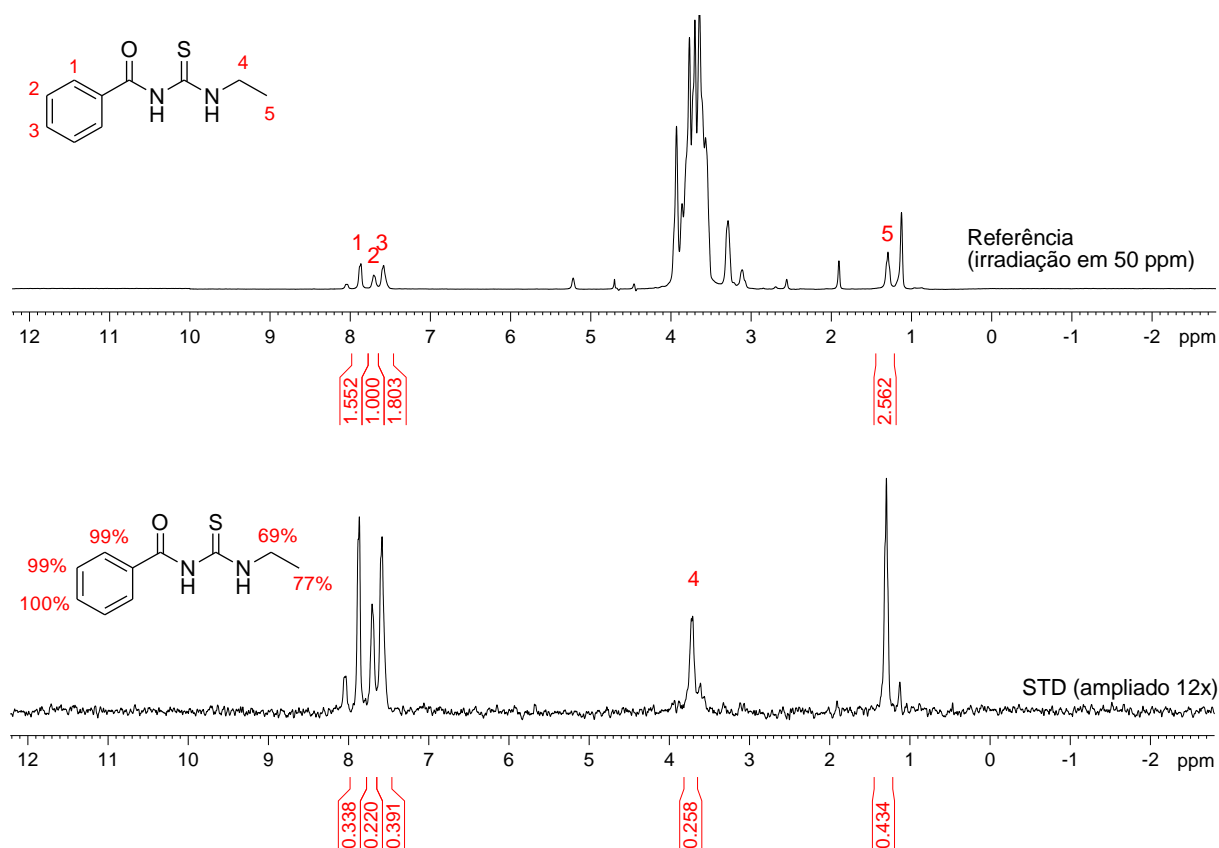
**Figura 39.** Gráfico do fator de amplificação em função do tempo de saturação para o sistema Urease-BTU 2 ([Urease] = 40 μM; [BTU 2] = 1,0 mM; pH 7,4 tampão fosfato). A proteína foi irradiada com um trem de pulsos Gaussianos em 0,5 ppm na obtenção dos espectros com transferência de saturação e em 50 ppm nos espectros controle.

O mapa de epítomos da BTU 2 (Figura 40), revela claramente uma maior saturação dos prótons aromáticos e menor para a metila em *N'*, indicando uma menor proximidade da metila com a enzima que possivelmente é efeito de uma interação mais fraca com a UCE.



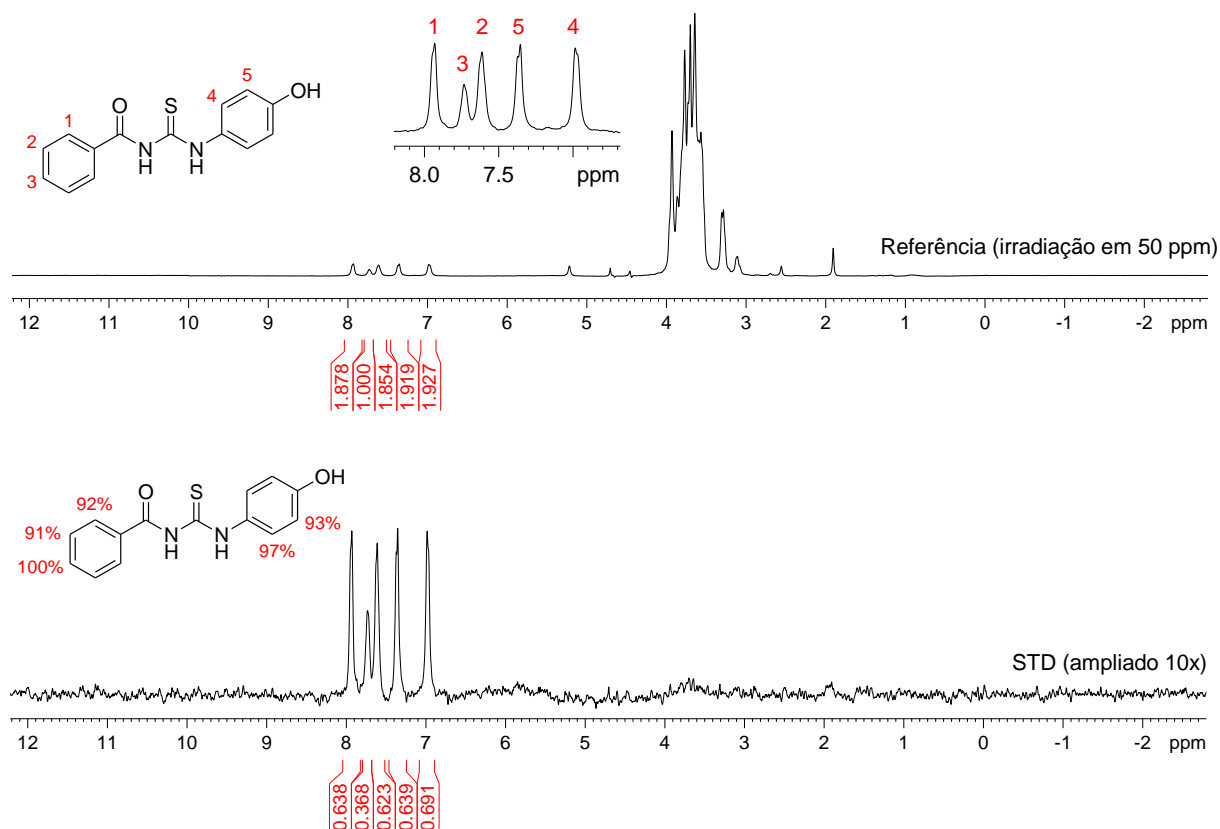
**Figura 40.** Espectro referência com atribuição dos sinais de <sup>1</sup>H do inibidor BTU 2 (superior) e mapa de epítomos da BTU 2 interagindo com a urease, determinado através do espectro de STD (inferior). Parâmetros: [UCE] = 20 μM; [BTU 2] = 1 mM; tampão fosfato deuterado, pH 7,4; STD:  $t_{\text{sat}}$  = 2,5 s; Gauss1.1000 = 10 ms; Sinc1.1000 = 2 ms; número de scans: 32.

O espectro de STD, e os cálculos para obtenção do mapa de epítomos do inibidor BTU 3 (Figura 41) obtido nas mesmas condições revelou uma interação praticamente idêntica para todos os hidrogênios aromáticos, e uma menor transferência para os hidrogênios alifáticos, com 69% para os metilênicos e 77% para os metílicos. Entretanto, em comparação com os resultados expressos para a BTU 2 (55% de efeito STD para a metila) o grupo etila apresentou maiores valores de efeito STD, evidenciando uma maior contribuição da porção alifática para ligação com a UCE.



**Figura 41.** Espectro referência com atribuição dos sinais de <sup>1</sup>H do inibidor BTU 3 (superior) e mapa de epítomos da BTU 3 interagindo com a urease, determinado através do espectro de STD (inferior). Parâmetros: [UCE] = 40 μM; [BTU 3] = 0,4 mM; tampão fosfato deuterado, pH 7,4; STD:  $t_{\text{sat}}$  = 2,5 s; Gauss1.1000 = 10 ms; Sinc1.1000 = 2 ms; número de scans: 32.

Para a BTU 10, o mapa de epítomos considerando o fator de amplificação (Figura 42), revelou uma interação similar para ambos os prótons aromáticos, com maior intensidade para o hidrogênio 3, padronizado com 100% de efeito STD. Para os prótons do anel fenólico (4 e 5), os altos valores de efeito STD observados (97 e 93% respectivamente) evidenciam a importância da presença de um grupo aromático em *N*, visto que nos testes *in vitro* os inibidores que demonstraram maior eficácia antiureolítica foram justamente os compostos que possuem esta configuração (inibições acima de 50% para os compostos 11, 12, 14, 19-22 e 37), diferindo entre estes, apenas o substituinte e padrão de substituição no grupo fenila.



**Figura 42.** Espectro referência com atribuição dos sinais de  $^1\text{H}$  do inibidor BTU 10 (superior) e mapa de építos da BTU 10 interagindo com a urease, determinado através do espectro de STD (inferior). Parâmetros: [UCE] = 40  $\mu\text{M}$ ; [BTU 10] = 0,4 mM; tampão fosfato deuterado, pH 7,4; STD:  $t_{\text{sat}}$  = 2,5 s; Gauss1.1000 = 10 ms; Sinc1.1000 = 2 ms; número de scans: 32.

Para comparação do efeito STD provocado nas BTUs 1, 3 e 10 (a 400 $\mu\text{M}$  - razão L/E=10) com os resultados obtidos nos ensaios de inibição *in vitro* foi calculado a porcentagem de efeitos STD relativos para H3 de cada composto através do seguinte cálculo:  $(I/I_0) \cdot 100\%$ . Os valores obtidos (Tabela 6) revelam uma concordância com os valores relatados para a inibição da UCE e de ureases contidas em amostra de solo.

**Tabela 6.** Comparação dos valores do efeito STD observado das BTUs 1, 3 e 10 e a respectiva inibição.

| Composto | Inibição da UCE (%) | Inibição da urease contida em amostra de solo (%) | Efeito STD (%)* |
|----------|---------------------|---------------------------------------------------|-----------------|
| 1        | 32,0                | 23,0                                              | 16,9            |
| 3        | 43,8                | 41,0                                              | 22,0            |
| 10       | 40,7                | 49,0                                              | 36,8            |

\*Efeito STD (%), calculado através da divisão do efeito STD observado para o H3, que recebeu maior saturação (100% do mapa de építos) pela integral do espectro de STD<sub>off</sub>, sendo o resultado então convertido para porcentagem.

Entretanto, uma análise de correlação de três pontos, realizada através do complemento análise de dados do software Microsoft Excel®, mostrou haver uma melhor correlação de dados entre as colunas inibição da urease contida em amostra de solo e efeito STD (correlação de 88%) do que quando comparadas às colunas inibição da UCE e efeito STD (correlação de 49%). Indicando que provavelmente as diferenças de temperatura na qual foram realizados os experimentos (inibição da UCE a 25 °C, inibição da urease contida em amostras de solo a 37 °C e efeito STD a 35 °C), exerceram maior influência na eficiência de inibição, o que pode explicar a melhor correlação observada para os experimentos com amostra de solo e efeito STD.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DE BENZOILTIOUREIAS

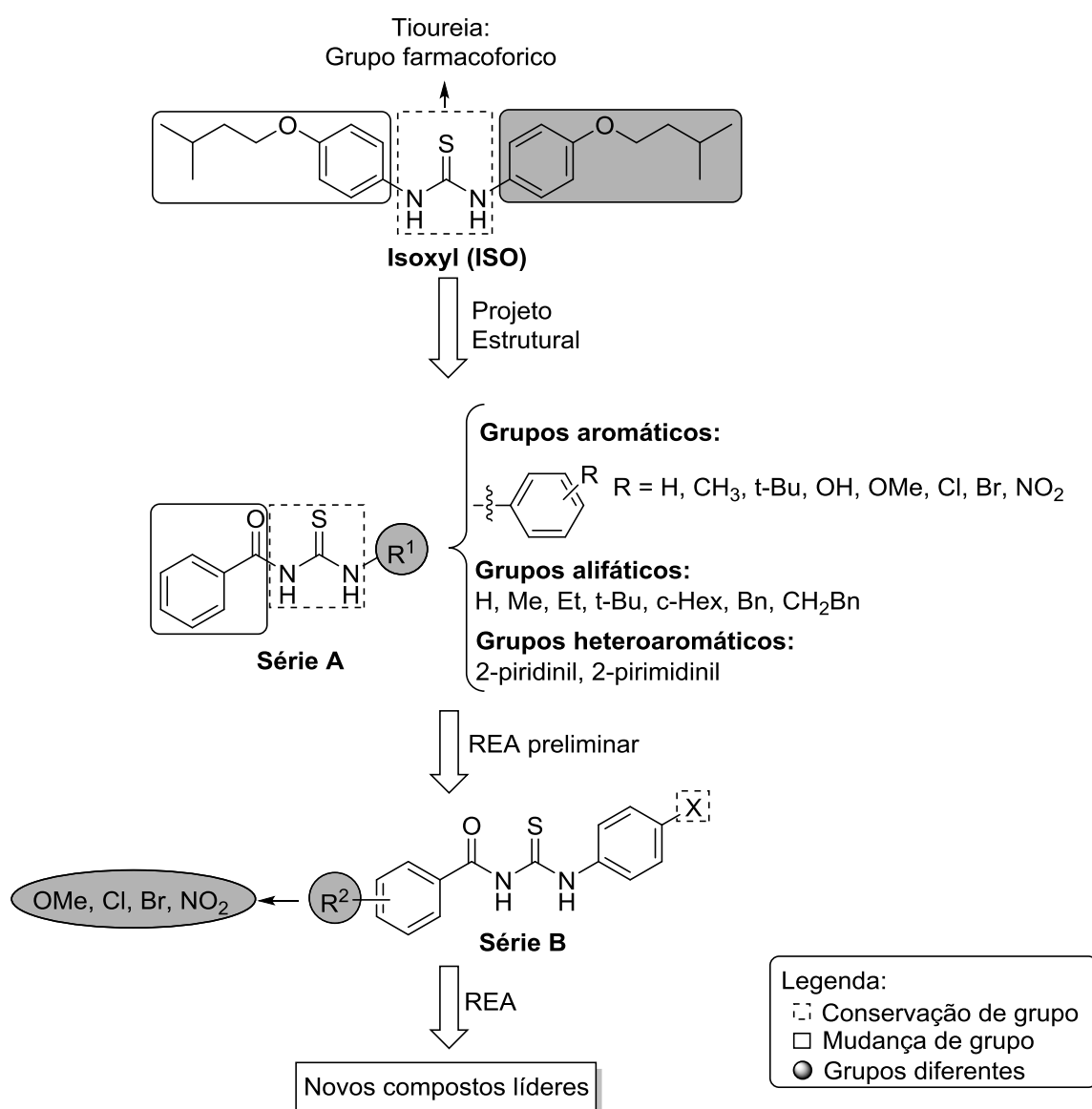
A busca de novos protótipos de fármacos para combater a tuberculose é necessária, tendo em vista os constantes aumentos da resistência dos microorganismos frente aos fármacos comercializados (ZUMLA et al., 2013).

O isoxyl (ISO) é uma droga de segunda escolha que foi utilizado no tratamento da tuberculose nos anos 1960, este possui em sua estrutura uma tioureia como grupo farmacofórico (Figura 43). O ISO apresenta alta atividade antimicobacteriana (concentração inibitória mínima (MIC) de 2,5 µg.mL<sup>-1</sup>) e eficiência comprovada contra cepas multirresistentes aos medicamentos rifampicina e isoniazida (MIC de 1-10 µg.mL<sup>-1</sup>) (PHETSUKSIRI et al., 1999; WANG e HICKEY, 2010).

Apesar das relevantes propriedades antimicobacterianas do ISO, o uso desta droga foi abandonado a cerca de quarenta anos atrás, devido ao baixo desempenho em testes de triagem clínica (TOUSEK, 1970; KAMPELMANN, 1970). A baixa solubilidade do ISO em água é a explicação mais plausível para este acontecimento, uma vez que este parâmetro leva a uma baixa dissolução e consequentemente uma baixa bioavaliabilidade oral (WANG et al., 2012). Entretanto, devido às suas importantes propriedades antimicobacterianas o ISO pode ser utilizado como protótipo no desenvolvimento de novos compostos líderes com maiores atividades antimicobacterianas e melhores propriedades farmacológicas.

Devido aos fatores supracitados, as benzoiltioureas foram planejadas pela sua analogia com o isoxil (ISO), sendo subdivididas em duas séries

(Figura 43). A série A é constituída por benzoiltioureas substituídas em R<sup>1</sup> por grupos aromáticos, alifáticos e heteroaromáticos, avaliando assim as influências estéricas e eletrônicas desta porção da molécula na atividade antimicrobacteriana dos compostos protótipos. As BTUs mais eficientes da série A foram, na sequência, selecionadas para o planejamento da série B, onde foram mantidos em R<sup>1</sup> substituintes aromáticos e modificou-se R<sup>2</sup> com grupos de diferentes características eletrônicas (MeO, NO<sub>2</sub>, Cl, Br).



**Figura 43.** Planejamento estrutural das duas séries de benzoiltioureas.

O potencial antimicrobacteriano das BTUs foi determinado através do método MABA (*Microplate Alamar Blue Assay*), que faz uso do sal de resazurina, um indicador de viabilidade celular, que intracelularmente é reduzido na forma de

resorufina (fluorescente). Essa conversão ocorre no citosol e é provocada pela atividade enzimática mitocondrial por captação de elétrons (VEGA-AVILA e PUGSLEY, 2011). De uma forma resumida, no ensaio em questão, o sal de resazurina (azul, não fluorescente) age como um indicador, sendo que em presença da micobactéria em seu estado viável, é então reduzido a resorufina, que apresenta uma coloração rosa com propriedade fluorescente. Em presença da micobactéria em seu estado não viável mantém sua coloração azul inicial, não fluorescente (VEGA-AVILA e PUGSLEY, 2011).

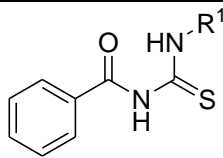
Neste sentido, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM), que é definida como a menor concentração do composto em estudo capaz de inibir o crescimento celular, neste caso, do *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATTC27294) (CANNETI et al., 1963). A CIM do isoxil (6,2  $\mu\text{M}$ ), izoniazida (1,46  $\mu\text{M}$ ) e etambutol (17,1  $\mu\text{M}$ ) foram utilizados como referência, sendo estes dados obtidos da literatura (PHETSUKSIRI et al., 1999), onde foi utilizado o mesmo tipo de ensaio (método MABA). Os valores obtidos foram relatados em  $\mu\text{g/mL}$  e  $\mu\text{M}$ , sendo que este último permite estabelecer um comparativo mais apurado em relação ao composto de referência.

Entre os vinte seis compostos utilizados na triagem inicial (série A - Tabela 7), os derivados contendo anéis heteroaromáticos (BTUs **25** e **26**) não apresentaram atividade significativa. Entre as oito substâncias alifáticas (**1-5**, **7** e **8**), duas delas mostraram valores de concentração inibitória mínima (CIM) de 190,0 (BTU **5**) e 87,9  $\mu\text{M}$  (BTU **8**).

Os melhores resultados foram obtidos no subconjunto de derivados aromáticos (BTUs **9-24**), onde quatro deles apresentaram valores de CIM variando de 183,6 a 37,3  $\mu\text{M}$ . Neste caso, observa-se que existe uma relação entre a posição do substituinte no anel aromático e a atividade antimicobacteriana, uma vez que alguns derivados *para*-substituídos (**10**, **12**, **14** e **15**) foram ativos contra o *Mycobacterium tuberculosis*, enquanto que todos os compostos *orto* e *meta*-substituídos não apresentaram nenhuma atividade. Além disso, as características estereo-eletrônicas dos substituintes podem ser importantes para a atividade biológica, uma vez que o derivado menos potente (**10**) possui uma hidroxila ligado ao grupo fenila, sendo este um grupo polar que promove uma diminuição da lipofilicidade ( $\text{clogP} = 2,64$ ) quando comparado a **14** (4-Cl,  $\text{clogP} = 3,60$ ), **15** (4-Br,  $\text{clogP} = 3,71$ ) e **12** (4-t-Bu,  $\text{clogP} = 4,57$ ). Além disso, o volume desses substituintes

e suas deficientes capacidades em atuar como grupos doadores de elétrons podem contribuir para aumentar a atividade antimicobacteriana.

**Tabela 7.** Primeira série de benzoiltioureas e respectivas atividades frente ao *Mycobacterium tuberculosis*.

| Composto   | R <sup>1</sup>                                                   |  |             |                    |
|------------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------------|
|            |                                                                  | CIM<br>(µg/mL) <sup>a</sup>                                                       | CIM<br>(µM) | clogP <sup>b</sup> |
| 1          | H                                                                | Res                                                                               | -           | 0,93               |
| 2          | CH <sub>3</sub>                                                  | Res                                                                               | -           | 1,28               |
| 3          | CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                  | Res                                                                               | -           | 1,69               |
| 4          | <sup>t</sup> Bu                                                  | Res                                                                               | -           | 2,43               |
| 5          | C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>                                   | 50                                                                                | 190,6       | 3,50               |
| 6          | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>                                    | Res                                                                               | -           | 2,99               |
| 7          | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>                    | Res                                                                               | -           | 3,00               |
| 8          | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>    | 25                                                                                | 87,9        | 3,13               |
| 9          | 4-OMe-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                              | Res                                                                               | -           | 2,92               |
| 10         | 4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 50                                                                                | 183,6       | 2,64               |
| 11         | 4-(CH <sub>3</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | Res                                                                               | -           | 3,33               |
| 12         | 4-(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 12,5                                                                              | 40,0        | 4,57               |
| 13         | 4-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                 | Res                                                                               | -           | 2,07               |
| 14         | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 12,5                                                                              | 43,0        | 3,60               |
| 15         | 4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 12,5                                                                              | 37,3        | 3,71               |
| 16         | 3-OMe-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                              | Res                                                                               | -           | 2,92               |
| 17         | 3-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | Res                                                                               | -           | 2,64               |
| 18         | 3-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                 | Res                                                                               | -           | 2,07               |
| 19         | 3-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | Res                                                                               | -           | 3,60               |
| 20         | 3-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | Res                                                                               | -           | 3,71               |
| 21         | 2-OMe-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                              | Res                                                                               | -           | 2,92               |
| 22         | 2-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                 | Res                                                                               | -           | 2,07               |
| 23         | 2-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | Res                                                                               | -           | 3,60               |
| 24         | 2-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | Res                                                                               | -           | 3,71               |
| 25         | 2-piridinil                                                      | Res                                                                               | -           | 2,34               |
| 26         | 2-pirimidinil                                                    | Res                                                                               | -           | 1,80               |
| Isoniazida | -                                                                | -                                                                                 | 1,46        | -1,02              |
| Etambutol  | -                                                                | -                                                                                 | 17,1        | -0,21              |
| ISO        | -                                                                | 2,5                                                                               | 6,2         | 6,12               |

<sup>a</sup>A concentração máxima de cada composto testado foi de 100 µg/mL, sendo qualquer valor acima deste considerado com resistente (Res). <sup>b</sup>Calculado utilizando o software OSIRIS DataWarrior. **ISO**: Isoxil.

Revelado o potencial das BTUs em inibir o crescimento do *Mycobacterium tuberculosis* e determinados os substituintes (R<sup>1</sup>) mais ativos foi planejada uma segunda série de derivados (série B). Onde foram sintetizados 29 compostos, fixando os substituintes R<sup>1</sup> em 4-<sup>t</sup>BuPh, 4-ClPh e 4-BrPh e variados os

substituintes em R<sup>2</sup>. Grupos estes possuidores de diferentes características estereoeletrônicas (MeO, NO<sub>2</sub>, Cl, Br) e padrões de substituição (*orto*, *meta* e *para*).

Os testes de atividade antituberculose da segunda série de BTUs (Tabela 8) revelaram 10 compostos com atividades relevantes frente ao *Mycobacterium tuberculosis*, sendo que a BTU **77** apresentou a melhor atividade relatada para as BTUs, com um CIM de 9,6 µM, valor este muito próximo ao obtido para o isoxil (6,2 µM). Os compostos **68**, **78**, **81** e **89** também apresentaram valores próximos ao ISO, com CIM's de 15,1, 16,9, 18,0 e 17,5 µM, respectivamente. Os compostos **66**, **67**, **69-72**, **74-76**, **65**, **60**, **43** e **83-88** apresentaram-se como não ativos nas concentrações testadas. O composto **82** apresentou-se como insolúvel nos testes e, portanto, sua avaliação não foi possível.

Analisando a estrutura dos compostos ativos (Tabela 8), é possível verificar que a inclusão de um substituinte na porção benzoil ocasionou um aumento na atividade dos protótipos **12**, **14** e **15** (CIM de 40, 43, 37,3 µM, respectivamente), sendo que na segunda série de BTUs, 6 compostos foram mais ativos do que estes.

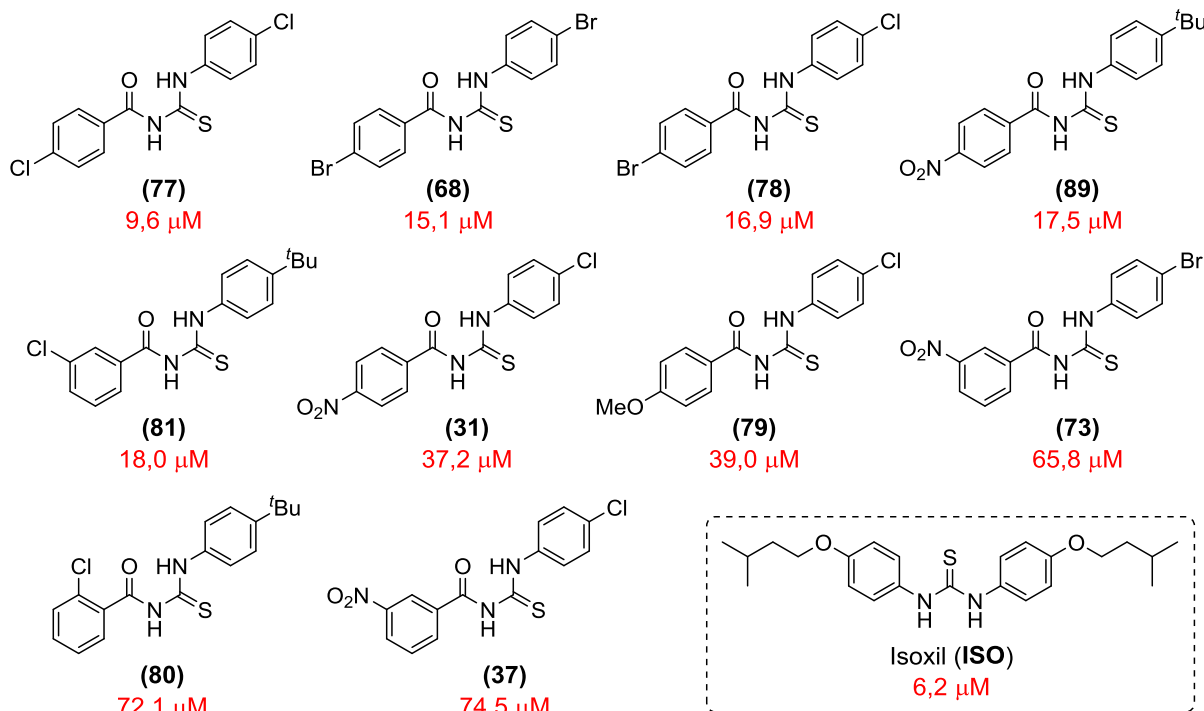
O subconjunto de derivados contendo o substituinte (R<sup>1</sup>) 4-clorofenila (BTUs **31**, **37**, **43**, **60**, **65** e **75-79**) foi mais promissor que os derivados de 4-bromofenila (BTUs **66-74**) e 4-<sup>t</sup>Bu-fenila (BTUs **80-89**), uma vez que o primeiro subconjunto apresentou cinco compostos ativos (**31**, **37**, **77-79**) enquanto nos outros subconjuntos apenas dois derivados de 4-bromofenila (**68** e **73**) e três derivados de 4-<sup>t</sup>Bu-fenila (**80**, **81** e **89**) apresentaram atividades expressivas. Comparando os subconjuntos de 4-clorofenil e 4-bromofenil, é possível verificar que a presença de alguns grupos retiradores de elétrons, como 4-Cl, 4-Br, 3-NO<sub>2</sub> e 4-NO<sub>2</sub> no anel benzoíla, contribuem positivamente para a atividade biológica. Além disso, dentre todos os compostos da série B substituídos em R<sup>2</sup> por grupo doador de elétrons (**60**, **65**, **69-71**, **79**, **84-86**), apenas a BTU **79** (4-OMe) apresentou atividade biológica, sugerindo que substituintes doadores de elétrons possam desempenhar um papel relevante na atividade.

**Tabela 8.** Segunda série de benzoiltioureas e respectivas atividades frente ao *Mycobacterium tuberculosis*.

| Composto   | R <sup>1</sup>                                                   | R <sup>2</sup>    | CIM<br>(µg/mL) <sup>a</sup> | CIM<br>(µM) | clogP <sup>b</sup> |
|------------|------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------------|-------------|--------------------|
| 66         | 4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 2-Cl              | Res                         | -           | 4,32               |
| 67         | 4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 3-Cl              | Res                         | -           | 4,32               |
| 68         | 4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 4-Br              | 6,25                        | 15,1        | 4,44               |
| 69         | 4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 2-OMe             | Res                         | -           | 3,64               |
| 70         | 4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 3-OMe             | Res                         | -           | 3,64               |
| 71         | 4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 4-OMe             | Res                         | -           | 3,64               |
| 72         | 4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 2-NO <sub>2</sub> | Res                         | -           | 2,79               |
| 73         | 4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 3-NO <sub>2</sub> | 25                          | 65,8        | 2,79               |
| 74         | 4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 4-NO <sub>2</sub> | Res                         | -           | 2,79               |
| 75         | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 2-Cl              | Res                         | -           | 4,20               |
| 76         | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 3-Cl              | Res                         | -           | 4,20               |
| 77         | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 4-Cl              | 3,12                        | 9,6         | 4,20               |
| 78         | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 4-Br              | 6,25                        | 16,9        | 4,32               |
| 65         | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 2-OMe             | Res                         | -           | 3,53               |
| 60         | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 3-OMe             | Res                         | -           | 3,53               |
| 79         | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 4-OMe             | 12,5                        | 39,0        | 3,53               |
| 43         | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 2-NO <sub>2</sub> | Res                         | -           | 2,67               |
| 37         | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 3-NO <sub>2</sub> | 25                          | 74,5        | 2,67               |
| 31         | 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | 4-NO <sub>2</sub> | 12,5                        | 37,2        | 2,67               |
| 80         | 4-(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 2-Cl              | 25                          | 72,1        | 5,18               |
| 81         | 4-(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 3-Cl              | 6,25                        | 18,0        | 5,18               |
| 82         | 4-(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 4-Cl              | Insolúvel                   | -           | 5,18               |
| 83         | 4-(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 4-Br              | Res                         | -           | 5,30               |
| 84         | 4-(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 2-OMe             | Res                         | -           | 4,50               |
| 85         | 4-(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 3-OMe             | Res                         | -           | 4,50               |
| 86         | 4-(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 4-OMe             | Res                         | -           | 4,50               |
| 87         | 4-(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 2-NO <sub>2</sub> | Res                         | -           | 3,65               |
| 88         | 4-(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 3-NO <sub>2</sub> | Res                         | -           | 3,65               |
| 89         | 4-(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 4-NO <sub>2</sub> | 6,25                        | 17,5        | 3,65               |
| Isoniazida | -                                                                | -                 | 1,46                        | -1,02       | -1,02              |
| Etambutol  | -                                                                | -                 | 17,1                        | -0,21       | -0,21              |
| ISO        | -                                                                | -                 | 2,5                         | 6,2         | 6,12               |

<sup>a</sup>A concentração máxima de cada composto testado foi de 100 µg/mL, sendo qualquer valor acima deste considerado com resistente (Res). <sup>b</sup>Calculado utilizando o software OSIRIS DataWarrior. **ISO**: Isoxil.

Organizando os compostos em ordem de atividade (Figura 44), é possível verificar que a maioria (com exceção de **89**) possuem pelo menos um halogênio (Cl ou Br) em sua estrutura, sendo os mais ativos as BTUs contendo dois átomos desta classe como substituintes (**77**, **68** e **78**), um na porção fenil e outro na porção benzoil, ambos na posição *para*.



**Figura 44.** Estrutura das benzoiltioureas da segunda série, e respectivo CIM frente ao *Mycobacterium tuberculosis*.

Através dos dados obtidos, é possível observar que o comportamento eletrônico dos substituintes do grupo benzoil influencia na inibição do crescimento do *M. tuberculosis*, sendo que dentre os compostos ativos, apenas um composto possui um grupo doador de elétrons substituindo o grupo benzoil (79) e outros onze compostos possuem como substituinte do grupo benzoila, grupos retiradores de elétrons (77, 68, 78, 89, 81, 31, 73, 80 e 37). Nesta série, também não foi possível verificar uma dependência da lipofilicidade ( $\text{clogP}$ ) com valor de CIM frente ao *M. tuberculosis*.

O composto mais potente (77) é 1,7 vezes mais ativo do que o fármaco anti-tuberculose de primeira linha etambutol e 0,65 vezes menos ativo do que o isoxil, podendo então ser considerado como um bom protótipo para ser submetido a novas modificações estruturais na busca de novos medicamentos anti-TB.

Outra característica importante das benzoiltioureas é a reconhecida capacidade quelante desta classe de compostos frente a íons metálicos, que são importantes para o crescimento bacteriano, podendo influenciar também no potencial de inibição do crescimento (OTAZO-SÁNCHEZ et al., 2001). Este fator também pode

ter contribuído para dificultar a análise de relação estrutura-atividade, devido às diferentes capacidades quelantes de cada BTU que podem estar atuando em conjunto com outros mecanismos responsáveis pela inibição do crescimento do *M. tuberculosis*.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos pelo estudo de inibição *in vitro* da atividade ureolítica demonstram que benzoiltioureas *N*-substituídas (BTUs) são promissores inibidores da urease purificada de *C. ensiformis* e da atividade ureolítica presente em solo *in natura*. As variações na estrutura dos substituintes das BTUs afetam fortemente os níveis de sua inibição, verificado em ambos os ensaios *in vitro* (com enzima purificada e enzima contida em amostras de solo), sendo que grupos fenila substituídos na posição *para* do anel, se mostraram cruciais para uma inibição satisfatória. A inclusão de um substituinte no anel aromático da porção benzoíla acarretou uma redução da atividade inibitória das benzoiltioureas, provavelmente devido à redução da solubilidade destes compostos.

Os estudos cinéticos para um grupo representativo de BTUs sugerem que o mecanismo de inibição para esta classe de compostos frente a urease seja do tipo misto. A extensão da inibição em experimentos utilizando urease purificada nem sempre se correlaciona com os resultados de inibição obtidos com amostras de solo, evidenciando a necessidade de cuidados com o tratamento destes dados: (i) os experimentos envolvendo o uso de urease purificada permitem a compreensão da relação estrutura-atividade para a concepção de inibidores mais potentes e também podem ser utilizados para prever o mecanismo de ação de tais moléculas; (ii) experimentos com amostras de solo são importantes para o desenvolvimento de um inibidor de ureases eficiente para sua utilização como aditivo em formulações de fertilizantes agrícolas a base de ureia.

Os resultados obtidos através da técnica de RMN STD, confirmam a otimização dos parâmetros envolvidos na sequência de pulsos do experimento de STD aplicado para sistemas envolvendo a urease (UCE), além dos fatores externos, como temperatura e concentração da proteína. Em nossos estudos, quando os experimentos foram realizados com os parâmetros originais da sequência de pulsos e um tempo de saturação de 2,5 s, o tempo médio de cada experimento era de cerca de 8h, após as otimizações este tempo foi reduzido para cerca de 2h. Estas otimizações resultaram em espectros de STD com ótima razão sinal/ruído mesmo quando adquirido em sonda de 5mm de detecção direta.

A técnica de STD também provou ser uma ferramenta útil para estudos de interação entre as benzoiltioureas e urease purificada de *C. ensiformis*

com as porções aromáticas dos inibidores **1**, **2**, **3** e **15** interagindo mais eficientemente com a enzima. Além disso, o efeito STD observado sugere uma correlação com as inibições verificadas nos experimentos envolvendo o uso de solo *in natura*.

A avaliação de 55 BTUs frente ao microrganismo *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, revelou uma potente atividade para quatro BTUs, sendo observados melhores resultados para as BTUs com substituintes halogenados nas posições *para* de ambos os grupos benzoíla e fenila, das tioureias. Além disto, um protótipo apresentou-se tão potente quanto o isoxil e melhor do que o etambutol (fármaco de primeira escolha utilizado no tratamento da tuberculose). Estes resultados evidenciam o potencial desta classe para o desenvolvimento de novos coadjuvantes no tratamento de tuberculose.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, S. Y.; EL-SHARIEF, M. A. M. S.; BASYOUNI, W. M.; FAKHR, I. M. I.; EL-GAMMAL, E. W. Thiourea derivatives incorporating a hippuric acid moiety: Synthesis and evaluation of antibacterial and antifungal activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, 2013, p. 111-120.

ABOSADIYA, H. M.; YAMIN, B.; NGAH, N. N-Benzoyl-N'-(3-hydroxyphenyl)thiourea. **Acta Crystallographica, Section E: Structure Reports Online**, v. E63, n. 5, 2007, p. o3183.

ATIA-TUL-WAHAB; KHAN, A.; MARASINI, B. P.; LODHI, M. A.; ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY, M. I. Discovery and Study of the Binding Epitopes of Novel Urease Inhibitors by STD-NMR Spectroscopy and Biochemical Analyses. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 10, 2013, p. 515-521.

AWLLIA, J. A. J.; SARA, A.; ATIA-TUL-WAHAB; AL-GHAMDI, M.; RASHEED, S.; HUWAIT, E.; CHOUDHARY, M. I. Discovery of New Inhibitors of Urease Enzyme: A Study Using STD-NMR Spectroscopy. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 12, n. 10, 2015, p. 819-827.

BALASUBRAMANIAN, A.; PONNURAJ, K. Crystal structure of the first plant urease from Jack bean: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure. **Journal of Molecular Biology**, v. 400, 2010, p. 274-283.

BARNIKOW, G.; KUNZEK, H. Hegershoff reaction. III. Synthesis of 2-benzothiazolyl-malonic esters from the monothioanilide derivatives of diethyl methanetricarboxylate. **Journal fuer Praktische Chemie (Leipzig)**, 1965, v. 30, n. 1, p. 67.

BARRIOS, A. M.; LIPPARD, S. J. Interaction of urea with a hydroxide-bridged dinuclear nickel center: an alternative model for the mechanism of urease. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, 2000, p. 9172-9177.

BENINI, S.; RYPNIEWSKI, W. R.; WILSON, K. S.; CIURLI, S.; MANGANI, S. The complex of *Bacillus pasteurii* urease with  $\beta$ -mercaptoethanol from X-Ray data at 1.65- $\text{\AA}$  resolution. **The Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 3, n. 3, 1998, p. 268-273.

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, 1999, p. 205-216.

BENINI, S.; RYPNIEWSKI, W. R.; WILSON, K. S.; MILETTI, S.; CIURLI, S.; MANGANI, S. The complex of *Bacillus pasteurii* urease with acetohydroxamate anion from X-ray data at 1.55  $\text{\AA}$  resolution. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 5, n. 1, 2000, p. 110-118.

BENINI, S.; RYPNIEWSKI, W. R.; WILSON, K. S.; MANGANI, S.; CIURLI, S. Molecular Details of Urease Inhibition by Boric Acid: Insights into the Catalytic Mechanism. **Journal of American Chemical Society**, v. 126, 2004, p. 3714–3715.

BENONI, R.; PERTINHEZ, T. A.; SPYRAKIS, F.; DAVALLI, S.; PELLEGRINO, S.; PAREDI, G.; PEZZOTTI, A.; BETTATI, S.; CAMPANINI, B.; MOZZARELLI, A. Structural insight into the interaction of O-acetylserine sulfhydrylase with competitive, peptidic inhibitors by saturation transfer difference-NMR. **FEBS Letters**, v. 590, 2016, p. 943–953.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 215-240.

BOER, J. L.; MULROONEY, S. B.; HAUSINGER, R. P. Nickel-dependent metalloenzymes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 544, 2014, p. 142-152.

BUDESINSKY, Z.; EMR, A.; MUSIL, V.; PERINA, Z.; ZIKMUND, E. Synthetic antidiabetics. I. Derivatives of urea, thiourea, and guanidine. **Cesko-Slovenska Farmacie**, v. 8, 1959, p. 129.

BURGESSON, J. R.; MOORE, A. L.; BOUTILIER, J. K.; CERRUTI, N. R.; GHARAIBEH, D. N.; LOVEJOY, C. E.; AMBERG, S. M.; HRUBY, D. E.; TYAVANAGIMATT, S. R.; ALLEN III, R. D.; DAI, D. SAR analysis of a series of acylthiourea derivatives possessing broad-spectrum antiviral activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 13, 2012, p. 4263-4272.

BRANDÃO, E.; SILVA, M. S.; GARCÍA-ESTÉVES, I.; MATEUS, N.; DE FREITAS, V.; SOARES, S. Molecular study of mucin-procyanidin interaction by fluorescence quenching and Saturation Transfer Difference (STD)-NMR. **Food Chemistry**, v. 228, 2017, p.427–434.

BRINDLEY, J. C.; CALDWELL, J. M.; MEAKINS, G. D.; PLACKETT, S. J.; PRICE, S. J. N'-Substituted N-acyl- and N-imidoylthioureas. Preparation and conversion of N',N'-disubstituted compounds into 2-(N,N-disubstituted-amino)-5-thiazolyl ketones. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry**, 1987, v. 5, p. 1153-1158.

BRITO, T. O.; SOUZA, A. X.; MOTA, Y. C. C.; MORAIS, V. S. S.; DE SOUZA, L. T.; DE FÁTIMA, A.; MACEDO JR., F.; MODOLO, L. V. Design , syntheses and evaluation of benzoylthioureas as urease inhibitors of agriculture interest. **RSC Advances**, v. 5, 2015, p. 44507-44515.

BRITO, T. O. **Síntese e avaliação da atividade inibitória de benzoitioureas e benzoilguanidinas frente a ureases**. Dissertação de Mestrado em Química - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013, pp. 121.

BROWN, B. T., HARRIS, R. L. N. Derivatives of N-(pyrid-2-yl)thiourea as root growth inhibitors. **Pesticide Science**, n. 4, v. 2, 1973, p. 215-225.

CANTARELLA, H.; MARCELINO, R. O uso de inibidor de urease para aumentar a eficiência da ureia. Palestra apresentada no 1º Simpósio sobre informações recentes para otimização da produção agrícola, 2006, INPI - Piracicaba.

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, 2008, p. 397-401.

CANETTI, G.; RIST, N.; GROSSET, J. [Measurement of sensitivity of the tuberculous bacillus to antibacillary drugs by the method of proportions. Methodology, resistance criteria, results and interpretation]. **Revue de Tuberculose et de Pneumologie**, v. 27, 1963, p. 217-272.

CARLSSON, H.; NORDLANDER, E. Computational modeling of the mechanism of urease. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2010, 2010, p. 1-8.

CASTRO, R. P.; MACEDO JR., F. C.; BRITO, T. O.; DE FÁTIMA, A.; SABINO, J. R. 3-benzoyl-1-[4-(methylsulfanyl)phenyl]-thiourea. **Acta Crystallographica, Section E: Structure Reports Online**, v. E69, 2013, p. o293.

CHIEN, S. H.; PROCHNOW, L. I.; CANTARELLA, H. Chapter 8: Recent developments of fertilizer production and use to improve nutrient efficiency and minimize environmental impacts. **Advances in Agronomy**, v. 102, 2009, p. 267-322.

COVACCI, A.; TELFORD, J. L.; GIUDICE, G. D.; PARSONNET, J.; RAPPUOLI, R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. **Science**, v. 284, 1999, p. 1328-1333.

COX, E.; LAESSIG, K. FDA approval of bedaquiline – The benefit-risk balance for drug-resistant tuberculosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 8, 2014, p. 689-691.

DA SILVA, V. R.; MOSIEWICKI, M. A.; YOSHIDA, M. I.; DA SILVA, M. C.; STEFANI, P. M.; MARCOVICH, N. E. Polyurethane foams based on modified tung oil and reinforced with rice husk ash I: Synthesis and physical chemical characterization. **Polymer Testing**, v. 32, n. 2, 2013, p. 438-445.

DEL CAMPO, R.; CRIADO, J. J.; GARCÍA, E.; HERMOSA, M. R.; JIMÉNEZ-SANCHÉZ, A.; MANZANO, J. L.; MONTE, E.; RODRIGUEZ-FERNÁNDEZ, E.; SANZ, F. Thiourea derivatives and their nickel(II) and platinum(II) complexes: antifungal activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 89, 2002, p. 74-82.

DIXON, N. E.; GAZZOLA, C.; BLAKELEY, R. L.; ZERNER, B. Jack Bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel?. **Journal of the American Chemical Society**, v. 97, n. 14, 1975, p. 4131-4133.

DIXON, N. E.; RIDDLES, P. W.; GAZZOLA, C.; BLAKELEY, R. L.; ZERNER, B. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). V. On the mechanism of action of urease on urea, formamide, acetamide, N-methylurea, and related compounds. **Canadian Journal of Biochemistry**, v. 58, n. 12, 1980, p. 1335-1344.

ELMORE, D. T.; OGLE, J. R. Acyl isothiocyanates. II. Reactions of aroyl isothiocyanates with amines and amino acids in aqueous solution. **Journal of the Chemical Society**, 1958, p. 1141-1145.

ERICKSON, J. Reactions of long-chain amines. VI. Preparation of thioureas. **Journal of Organic Chemistry**, v. 21, n. 4, 1956, p. 483-484.

ERISMAN, J. W.; SUTTON, M. A.; GALLOWAY, J.; KLIMONT, Z.; WINIWARTE, W. How a century of ammonia synthesis changed the world. **Nature Geoscience**, n. 1, 2008, p. 636-639.

European Medicines Agency. European Medicines Agency recommends two new treatment options for tuberculosis, 2013. Disponível em: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news\\_and\\_events/news/2013/11/news\\_detail\\_001972.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2013/11/news_detail_001972.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1). Acessado em: 20/02/17.

FERREIRA, M. L.; BORGES, R. S.; NOGUEIRA, T. C. M.; ROCHA, L. C.; DE SOUZA, M. V. N. Tuberculose infantil: tratamento e problemas relacionados. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 1, 2007, p. 38-44.

FERTBRASIL. Projetos e redes do macroprograma 1, 2010. Disponível em: <http://www.macroprograma1.cnptia.embrapa.br/redefertbrasil/projeto-1> Acesso em: 20 set. 2016.

FISHBEIN, W. N.; CARBONE, P. P. Urease catalysis: II. Inhibition of the enzyme by hydroxyurea, hydroxylamine, and acetohydroxamic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 240, 1965, p. 2407-2414.

FIGUEIREDO, I. M.; MARSAIOLI, A. J. Mapeamento das interações proteína-ligante através de técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  utilizando detecção do ligante. **Química Nova**, v. 30, n. 7, 2007, p. 1597-1605.

FONT, M.; DOMÍNGUES, M. J.; SANMARTÍN, C.; PALOP, J. A.; SANFRANCISCO, S.; URRUTIA, O.; HOUDUSSE, F.; GARCÍA-MINA, J. M. Structural characteristics of phosphoramidate derivatives as urease inhibitors. requirements for activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, 2008, p. 8451-8460.

GALE, G. R. Inhibition of urease by hydroxyurea. **Biochemistry Pharmacology**, v. 14, 1965, p. 693-698.

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. **Biology and Fertility of Soils**, v. 36, 2002, p. 129-135.

GUPTA, K. A.; SAXENA, A. K.; JAIN, P. C.; DUA, P. R.; PRASAD, C. R.; ANAND, N. Synthesis and biological activity of 2,6-disubstituted 3-aryl-4(3H)-pyrimidinones as potential CNS agents. **Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry**, v. 22b, n. 8, 1983, p. 789.

GROVES, P.; KOVÉR, K. E.; ANDRÉ, S.; BANDOROWICZ-PIKULA; BATTA, G.; BRUIX, M.; BUCHET, R.; CANALES, A.; CAÑADA, F. J.; GABIUS, H. -J.; LAURENTS, D. V.; NARANJO, J. R.; PALCZEWSKA, M.; PIKULA, S.; RIAL, E.;

STRZELECKA-KILISZEK, A.; JIMÉNEZ-BARBERO, J. Temperature dependence of ligand–protein complex formation as reflected by saturation transfer difference NMR experiments. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 45, 2007, p. 745-748.

HA, N.-C.; OH, S.-T.; SUNG, J. Y.; CHA, K. A.; LEE, M. H.; OH, B.-H. Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. **Nature Structural Biology**, v. 8, n. 6, 2001, p. 505-509.

HAUSINGER, R. P. **Biochemistry of Nickel**. 1<sup>a</sup> Ed. New York: Plenum Press, 1993.

HENDRIKSON, L. L.; DOUGLASS, E. A. Metabolism of the urease inhibitor N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (NBPT) in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, 1993, p. 1613-1618.

HURST, D. T.; STACEY, A. D.; NETHERCLEFT, M.; RAHIM, A.; HARNDEN, M. R. The synthesis of some pyrimidinyI and thiazolyI ureas and thioureas and some related compounds. **Australian Journal of Chemistry**, v. 41, n. 8, 1988, p. 1221-1229.

JABRI, E.; CARR, M. B.; HAUSINGER, R. P.; KARPLUS, P. A. The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. **Science**, v. 268, n. 5213, 1995, p. 998-1004.

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. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 18, 2011, p. 3504-3514.

KAMPELMANN, F. Results of monotherapy with Isoxyl in untreated pulmonary tuberculosis cases of different difficulties and Isoxyl in routine-therapy. **Antibiotic Chemotherapy**, v. 16, 1970, p. 96–104.

KANDELER, E.; GERBER, H. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. **Biology Fertility Soils**, v. 6, 1988, p. 68-72.

KARAKUS, S.; ROLLAS, S. Synthesis and antituberculosis activity of new N-phenyl-N'-[4-(5-alkyl/arylamino-1,3,4-thiadiazole-2-yl)phenyl]thioureas. **II Farmaco**, v. 57, 2002, p. 577-581.

KARPLUS, P. A.; PEARSON, M. A.; HAUSINGER, R. P. 70 years of crystalline urease: what have we learned? **Accounts of chemical research**, v. 30, n. 8, 1997, p. 330-337.

KATRITZKY, A. R.; CAI, X.; ROGOVOY, B. V. Solid Phase Synthesis and Application of Trisubstituted Thioureas. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 5, n. 4, 2003, p. 392-399.

KATRITZKY, A. R.; LEDOUX, S.; WITEK, R. M.; NAIR, S. K. (Alkyl/Arylthiocarbamoyl)benzotriazoles as Stable Isothiocyanate Equivalents: Synthesis of Di- and Trisubstituted Thioureas. **Journal of Organic Chemistry**, v. 69, 2004, p. 2976-2982.

KAUR, M.; GARG, T.; NARANG, R. K. A review of emerging trends in the treatment of tuberculosis. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, n. 2, 2016a, p. 478-484.

KAUR, R.; GARG, T.; GUPTA, U. D.; GUPTA, P.; RATH, G.; GOYAL, A. K. Preparation and characterization of spray-dried inhalable powders containing nanoaggregates for pulmonary delivery of anti-tubercular drugs. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, n. 1, 2016b, p. 182-187.

KAUR, R.; GARG, T.; MALIK, B.; GUPTA, U. D.; GUPTA, P.; RATH, G.; GOYAL, A. K. Development and characterization of spray-dried porous nanoaggregates for pulmonary delivery of anti-tubercular drugs. **Drug Delivery**, v. 23, n. 3, 2016, p. 882-887.

KAYE, I. A.; PARRIS, C. L. Preparation of secondary and tertiary 2-thiazolylamines. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, 1952, p. 2271-2273.

KELLER, G. D.; MENGEL, D. E. Ammonia volatilization from nitrogen fertilizers surface applied to no-till corn. **Soil Science Society of America Journal**, v. 50, 1986, p. 1060-1063.

KHAINAR, H. OSWAL, R. J.; ANTRE, R. V. A review on: Antituberculosis agents. **Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research**, v. 2, n. 2, 2012, p. 40-48.

KHAN, K. M.; IQBAL, S.; LODHI, M. A.; MAHARVI, G. M.; ULLAH, Z.; CHOUDHARY, M. I.; RAHMAN, A. U.; PERVEEN, S. Biscoumarin: new class of urease inhibitors; economical synthesis and activity. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v. 12, 2004, p. 1963-1968.

KHAN, K. M.; NAZ, F.; TAHA, M.; KHAN, A.; PERVEEN, S.; CHOUDHARY, M. I.; VOELTER, W. Synthesis and in vitro urease inhibitory activity of N,N'-disubstituted thioureas. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 74, 2014, p. 314-323.

KISS, S.; SIMIHAIAN, M.; **Improving efficiency of urea fertilizers by inhibition of soil urease activity**. 1<sup>a</sup> Ed. Dordrecht – Países Baixos: Springer Netherlands, 2002.

KOT, M.; ZABORSKA, W. Irreversible inhibition of Jack bean urease by pyrocatechol. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 5, 2003, p. 413-417.

KRAJEWSKA, B.; ZABORSKA, W.; LESZKO, M. Inhibition of chitosan-immobilized urease by slow-binding inhibitors: Ni<sup>+2</sup>, F<sup>-</sup> and acetohydroxamic acid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 14, 2001, p. 101-109.

KRAJEWSKA, B.; ZABORSKA, W. jack bean urease: The effect of active-site binding inhibitors on the reactivity of enzyme thiol groups. **Bioorganic Chemistry**, v. 35, 2007, p. 355-365.

KRAJEWSKA, B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, 2009, p. 9-21.

LARA CABEZAS, W. A. R.; TRIVELIN, P. C. O. Eficiência de um coletor semi-aberto estático na quantificação de amônia-N volatilizado da ureia aplicada ao solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 14, 1990, p. 345-352.

LEVITT, M. H. **Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance**. 2<sup>a</sup> Ed. New York: John Wiley & Sons, 2008, p. 450-455.

LEY, N. B.; ROWE, M. L.; WILLIAMSON, R. A.; HOWARD, M. J. Optimising selective excitation pulses to maximize saturation transfer difference NMR spectroscopy. **RSC Advances**, v. 4, 2014, p. 7347-7351.

LIN, Q., YAO, H., WEI, T.-B., ZHANG, Y.-M. Synthesis and plant growth regulatory activity of o-nitrobenzoylthiourea derivatives. **Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry**, v. 48B, n. 1, 2009, p. 124-127.

LIPPARD, S. J. At last—the crystal structure of urease. **Science**, v. 268, n. 5213, 1995, p. 996-997.

MAYER, M.; MEYER, B. Characterization of ligand binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, n. 12, 1999, p. 1784-1788.

MAYER, M.; MEYER, B. Group Epitope Mapping by Saturation Transfer Difference NMR to Identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, 2001, p. 6108-6117.

MEYER, B.; PETERS, T. NMR Spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, n. 8, 2003, p. 864-890.

MACOMBER, L.; MINKARA, M. S.; HAUSINGER, R. P.; KENNETH, M. M. JR. Reduction of urease activity by interaction with the flap covering the active site. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, 2015, p. 354-361.

MADAN, V. K.; TANEJA, A. D.; KUDESIA, V. P. Preparation and spectral studies of some carboxyalkyl substituted thioureas as potential fungicides and nematicides. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 68, n. 3, 1991, p. 162-163.

MADDANI, M. R.; PRABHU, K. R. A. Concise synthesis of substituted thiourea derivatives in aqueous medium. **Journal of Organic Chemistry**, v. 75, 2010, p. 2327-2332.

MALHI, S. S.; GRANT, C. A.; JOHNSTON, A. M.; GILL, K. S. Nitrogen fertilization management for no-till cereal production in the Canadian Great Plains: a review. **Soil and Tillage Research**, v. 60, 2001, p. 101-122.

MANUNZA, B.; DEIANA, S.; PINTORE, M.; GESSA, C. The binding mechanism of urea, hydroxamic acid and N-(N-butyl)-phosphoric triamide to the urease active site. A comparative molecular dynamics study. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, 1999, p. 789-796.

MERDIVAN, M.; KARIPCIN, F.; KULCU, N.; AYGUN, R. S. Study of the thermal decompositions on n,n-dialkyl-n'-benzoylthiourea complexes of Cu(II), Ni(II), Pd(II), Pt(II), Cd(II), Ru(III) and Fe(III). **Journal of Thermal Analysis Calorimetry**, v. 58, 1999, p. 551-557.

Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância em Saúde. Perspectivas brasileiras para o fim da tuberculose como problema de saúde pública. **Boletim Epidemiológico**, v. 47, n. 13, 2016, p. 1-15.

MOBLEY, H. L.; ISLAND, M. D.; HAUSINGER, R. P. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 59, n. 3, 1995, p. 451-480.

NISHIDA, C. R.; MONTELLANO, P. R. O. Bioactivation of antituberculosis thioamide and thiourea prodrugs by bacterial and mammalian flavin monooxygenases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 192, 2011, p. 21-25.

OLIVEIRA, M. W.; GAVA, G. J. C.; VITTI, G. C.; BENDASSOLI, J. A.; TRIVELIN, P. C. O. Volatilização de amônia proveniente da ureia (15N) aplicada em um solo cultivado com cana-de-açúcar. In: ENCONTRO CIENTÍFICO DOS PÓS-GRADUANDOS DO CENA/USP, 3., Piracicaba, 1997. Anais do ECPGCENA, Piracicaba, CENA-USP, 1997, p. 28.

OLIVEIRA, F. M.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; MALTHA, C. R. A.; PEREIRA, S.R.; HORTA, L. P., MODOLO, L. V. Synthesis, molecular properties and DFT studies of new phosphoramidates as potential urease inhibitors. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, 2014, p. 5174-5187.

OTAZO-SÁNCHEZ, E.; MARIN, L. P.; HERNANDEZ, O. E.; LIMA, S. R.; CHAMARRO, J. A. Aroylthioureas: new organic ionophores for heavy-metal ion selective electrodes. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction 2**, 2001, p. 2211-2218.

OTAZO-SÁNCHEZ, E.; ORTIZ-DEL-TORO, P.; ESTÉVEZ-HERNÁNDEZ, O.; PÉREZ-MARÍN, L.; GOICOECHEA, I.; BELTRAN, A. C.; VILLAGÓMEZ-IBARRA, J. R. Aroylthioureas: new organic ionophores for heavy metal ion selective electrodes. A nuclear magnetic resonance study. **Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 58, n. 10, 2002, p. 2281-2290.

PEARSON, M. A.; MICHEL, L. O.; HAUSINGER, R. P.; Karplus, P. A. Structures of Cys319 variants and acetohydroxamate inhibited *Klebsiella aerogenes* urease. **Biochemistry**, v. 36, n. 26, 1997, p. 8164-8172.

PEARSON, M. A.; PARK, I.-S.; SCHALLER, R. A.; MICHEL, L. O.; KARPLUS, P. A.; Hausinger, R. P. Kinetic and structural characterization of urease active site variants. **Biochemistry**, v. 39, n. 29, 2000, p. 8575-8584.

PHETSUKSIRI, B.; BAULARD, A. R.; COOPER, A. M.; MINNIKIN, D. E.; DOUGLAS, J. D.; BESRA, G. S.; BRENNAN, P. J. Antimycobacterial activities of Isoxyl and new derivatives through the inhibition of mycolic acid synthesis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 5, 1999, p. 1042-1051.

POLACCO, J. C.; HOLLAND, M. A. Roles of urease in plant cells. **International Review of Cytology**, v. 145, 1993, p. 65-103.

RAO, X. -P.; WU, Y.; SONG, Z. -Q.; SHANG, S. -B. WANG, Z. -D. Synthesis and antitumor activities of unsymmetrically disubstituted acylthioureas fused with hydrophenanthrene structure. **Medicinal Chemistry Research**, v. 20, n. 3, p. 333-338.

RAUF, M. K.; IMTIAZ, -U. -D.; BADSHAH, A.; GIELEN, M.; EBIHARA, M.; VOS, D.; AHMED, S. Synthesis, structural characterization and in vitro cytotoxicity and antibacterial activity of some copper(I) complexes with N,N'-disubstituted thioureas. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2009, v. 103, n. 8, p. 1135-1144.

RAUF, M. K.; TALIB, A.; BADSHAH, A.; ZAIB, S.; SHOAIB, K.; SHAHID, M.; FLORKE, U.; DIN, I. U.; IQBAL, J. Solution-phase microwave assisted parallel synthesis of N,N'- disubstituted thioureas derived from benzoic acid: Biological evaluation and molecular docking studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 70, 2013, p. 487-496.

REIS, R. S.; NEVES, I. JR.; LOURENÇO, S. L.; FONSECA, L. S.; LOURENÇO, M. C. Comparison of flow cytometric and Alamar Blue tests with the proportional method for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to rifampin and isoniazid. **Journal Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, 2004, p. 2247-2248.

ROSEMBERG, J. Tuberculose – aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 7, n. 2, 1999, p. 5-29

ROWE, M. L.; WAGSTAFF, J. L.; HOWARD, M. J. NMR in ligand binding studies. In: Fisher, J. **Modern NMR techniques for synthetic chemistry**. 1ª Ed. Boca Raton: CRC Press, 2015, p. 63-123.

SAEED, A.; MUMTAZ, A.; ISHIDA, H. Synthesis, characterization of some new 1-aryoyl-3-(4-aminosulfonylphenyl)thioureas and crystal structure of 1-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)- 3-(4-aminosulfonylphenyl)thiourea. **Journal of Sulfur Chemistry**, v. 32, n. 1, 2011, p. 45-54.

SAEED, A.; KHAN, M. S.; RAFIQUE, H.; SHAHID, M.; IQBAL, J. Design, synthesis, molecular docking studies and in vitro screening of ethyl 4-(3-benzoylthioureido) benzoates as urease inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 52, 2014, p. 1-7.

SAEED, A.; FLORKE, U.; ERBEN, M. F. A review on the chemistry, coordination, structure and biological properties of 1-(acyl/aryoyl)-3-(substituted) thioureas. **Journal of Sulfur Chemistry**, v. 35, 2014, p. 318-355.

SAEED, A.; ZAIB, S.; PERVEZ, A.; MUMTAZ, A.; SHAHID, M.; IQBAL, J. Synthesis, molecular docking studies, and in vitro screening of sulfanilamide-thiourea hybrids as antimicrobial and urease inhibitors. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, 2013, p. 3653-3662.

SARKIS, G. Y.; FAISAL, E. D. Synthesis and spectroscopic properties of some new N,N'-disubstituted thioureas of potential biological interest. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, 1985, v. 22, n. 1, p. 137-140.

SERWAR, M.; AKHTAR, T.; HAMEED, S.; KHAN, K. M. Synthesis, urease inhibition and antimicrobial activities of some chiral 5-aryl-4-(1-phenylpropyl)-2H-1,2,4-triazole-3(4H)-thione. **Arkivoc**, v. 7, 2009, p. 210-221.

SCHROEDER, D.C. Thioureas. **Chemical Reviews**, v. 55, n. 1, 1955, p. 181-228.

SCIVITARRO, W. B.; GONÇALVES, D. R. N.; DO VALE, M. L. C.; RICORDI, V. G. Perdas de nitrogênio por volatilização de amônia e resposta do arroz irrigado à aplicação de ureia tratada com o inibidor de urease NBPT. **Ciência Rural**, v. 40, 2010, p. 1283-1289.

SHARMA, S. Thiophosgene in organic synthesis. **Synthesis**, 1978, p. 803-820.

SHI, D.-Q., WANG, H.-Y., YANG, F., LI, X.-Y. Synthesis of anion receptors based on aroylthiourea and their anion recognition. **Acta Chimica Sinica -Chinese Edition-**, v. 65, n. 16, 2007, p. 1713-1717.

STAAB, H. A. New methods of preparative organic chemistry IV. Syntheses using heterocyclic amides (azolides). **Angewandte Chemie, International Edition**, v. 1, n. 7, 1962, p. 351-367.

SUMNER, J. B. The isolation and crystallization of the enzyme urease: preliminary paper. **Journal of Biological Chemistry**, v. 69, 1926, p. 435-441.

SUTTON, A. R.; Thornsberry, W. Additive containing N-(nbutyl) thiophosphoric triamide for urea-based fertilizer, US Patent # 2013/02776495 A1, 2013.

TANAKA, T.; KAWASE, M.; TANI, S.  $\alpha$ -Hydroxyketones as inhibitors of urease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, 2004, p. 501-505.

TATAR, E.; KARAKUS, S.; KUÇUKGUZEL, S. G.; OKULLU, S. O.; UNUBOL, N.; KOCAGOZ, T.; CLERCQ, E. DE; ANDREI, G.; SNOECK, R.; PANNECOUQUE, C.; KALAYCI, S.; SAHIN, F.; SRIRAM, D.; YOGESHWARI, P.; KUÇUKGUZEL, I. Design, Synthesis, and Molecular Docking Studies of a Conjugated Thiadiazole-Thiourea Scaffold as Antituberculosis Agents. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, n. 39, v. 4, 2016, p. 502-515.

TAYLOR, M. S.; JACOBSEN, E. N. Asymmetric catalysis by chiral hydrogen-bond donors. **Angewandte Chemie, International Edition**, v. 45, 2006, p. 1520-1543.

TOUSEK, J. On the clinical effectiveness of isoxyl. **Antibiotic Chemotherapy**, v. 16, 1970, p. 149-55.

PARELLA, T. Saturation transfer difference (STD) experiments. **Bruker pulse program catalogue**, v. 4, 2004, p. 81-90.

TODD, M. J.; HAUSINGER, R. P. Fluoride inhibition of *Klebsiella aerogenes* urease: Mechanistic implications of a pseudo-uncompetitive, slow-binding inhibitor. **Biochemistry**, v. 39, 2000, p. 5389-5396.

UESATO, S.; HASHIMOTO, Y.; NISHINO, M.; NAGAOKA, Y.; KUWAJIMA, H. N-substituted hydroxyureas as urease inhibitors. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 9, 2002, p. 1280-1282.

UHER, M., KOVAC, S., ILIAS, P., FLOCH, L., MARTVON, A. Reactions of benzoyl isothiocyanates with azomethines. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 45, n. 8, 1980, p. 2254-2259.

UPADHYAYA, J. S.; SRIVASTAVA, P. K.; MALIK, W. U. Potential antithyroid agents. V. Synthetic and pharmacological studies on some N-aryl-N'-benzoyl thiocarbamides. **Egyptian Journal of Chemistry**, 1983, v. 25, n. 1, p. 75.

UPADHYAY, L. S. B. Urease inhibitors: A review. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 11, 2012, p. 381-388.

VAREL, V. H. Use of urease inhibitors to control nitrogen loss from livestock waste. **Bioresource Technology**, v. 62, 1997, p. 11-17.

VEGA-AVILA, E.; PUGSLEY, M. K. An Overview of Colorimetric Assay Methods Used to Assess Survival or Proliferation of Mammalian Cells. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 54, 2011, p. 10-14.

VENKATESH, P.; PANDEYA, S. N. Synthesis and anti-oxidant activity of some N-(anilinocarbonothioyl)benzamide and heterocyclic based thiourea derivatives. **International Journal of ChemTech Research**, 2009, v. 1, n. 3, p. 733.

VIEGAS, A.; MANSO, J.; NOBREGA, F. L.; CABRITA, E. J. Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A simple and fast method for ligand screening and characterization of protein binding. **Journal of Chemical Education**, v. 88, 2011, p. 990-994.

VINÍCIUS, M.; SOUZA, N. Promising current drug candidates in clinical trials and natural products against multidrug-resistant tuberculosis. In: AHMAD, I.; AQUIL, F. **New strategies combating bacterial infection**. 1<sup>a</sup> Ed., Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, 2009, p. 71-87

WALPOLE, C.; KO, S. Y.; BROWN, M.; BEATTIE, D.; CAMPBELL, E.; DICKENSON, F.; EWAN, S.; HUGHES, G. A.; LEMAIRE, M.; LERPINIÈRE, J.; PATEL, S.; URBAN, L. 2-Nitrophenylcarbamoil-(S)-prolyl-(S)-3-(2-naphthyl)alanyl-N-benzyl-N-methylamide (SDZ NKT 343), a potent human NK1 tachykinin receptor antagonist with good oral analgesic activity in chronic pain models. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 17, 1998, p. 3159-3173.

WANG, C.; GARCIA-CONTRERAS, L.; MUTTIL, P.; HICKEY, A. J. Isoxyl assays in plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 60, n. 23, 2012, p. 1-6.

WANG, C.; HICKEY, A. J. Isoxyl aerosols for tuberculosis treatment: preparation and characterization of particles. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 2, 2010, p. 538-549.

WATSON, C. Urease inhibitors. IFA International Workshop on Enhanced-efficiency Fertilizers, Frankfurt - Alemanha, 2005, p. 28-30.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 8, 1967, p. 971-974.

WÖHLER, F. Ueber künstliche bildung des harnstoffs. **Annalen der Physik und Chemie**, v. 12, 1828, p. 253-256.

World Health Organization. **Global tuberculosis report 2016**. Switzerland: World Health Organization, 2016, p. 5-122.

YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S. Informações recentes para otimização da produção agrícola. **Informações Agronômicas**, v. 117, 2007, p. 1-4.

YAVARI, I., BAGHERI, M., PORSHAMSIAN, K., ALI-ASGARI, S. Efficient synthesis of N-substituted-N'-arylcarbonylthioureas under solvent-free conditions. **Journal of Sulfur Chemistry**, v. 28, n. 3, 2007, p. 269-273.

YONOVA, P. A., STOILKOVA, G. M. Synthesis and biological activity of urea and thiourea derivatives from 2-aminoheterocyclic compounds. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 23, n. 4, 2004, p. 280-291.

ZABORSKA, W.; KOT, M.; SUPERATA, K. Inhibition of Jack bean urease by 1,4-benzoquinone and 2,5-dimethyl-1,4-benzoquinone. Evaluation of the Inhibition Mechanism. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 4, 2002, p. 247-253.

ZERNER, B. Recent advances in the chemistry of an old enzyme, urease. **Bioorganic Chemistry**, v. 19, 1991, p. 116-131.

ZHONG, Z.; XING, R.; LIU, S.; WANG, L.; CAI, S.; LI, P. Synthesis of acyl thiourea derivatives of chitosan and their antimicrobial activities in vitro. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 3, 2008, p. 566-570.

ZHOU, W., LU, J., ZHANG, Z., ZHANG, Y., CAO, Y., LU, L., YANG, X. Structure and vibration spectra of N-4-chlorobenzoyl-N'-4-methoxyphenylthiourea. **Vibrational Spectroscopy**, v. 34, n. 2, 2004, p. 199-204.

ZONIA, L. E.; STEBBINS, N. E.; POLACCO, J. C. Essential role of urease in germination of nitrogen-limited *Arabidopsis thaliana* seeds. **Plant physiology**, v. 107, 1995, p. 1097-1103.

ZUMLA, A.; NAHID, P.; COLE, S. T. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 5, 2013, p. 388-404.

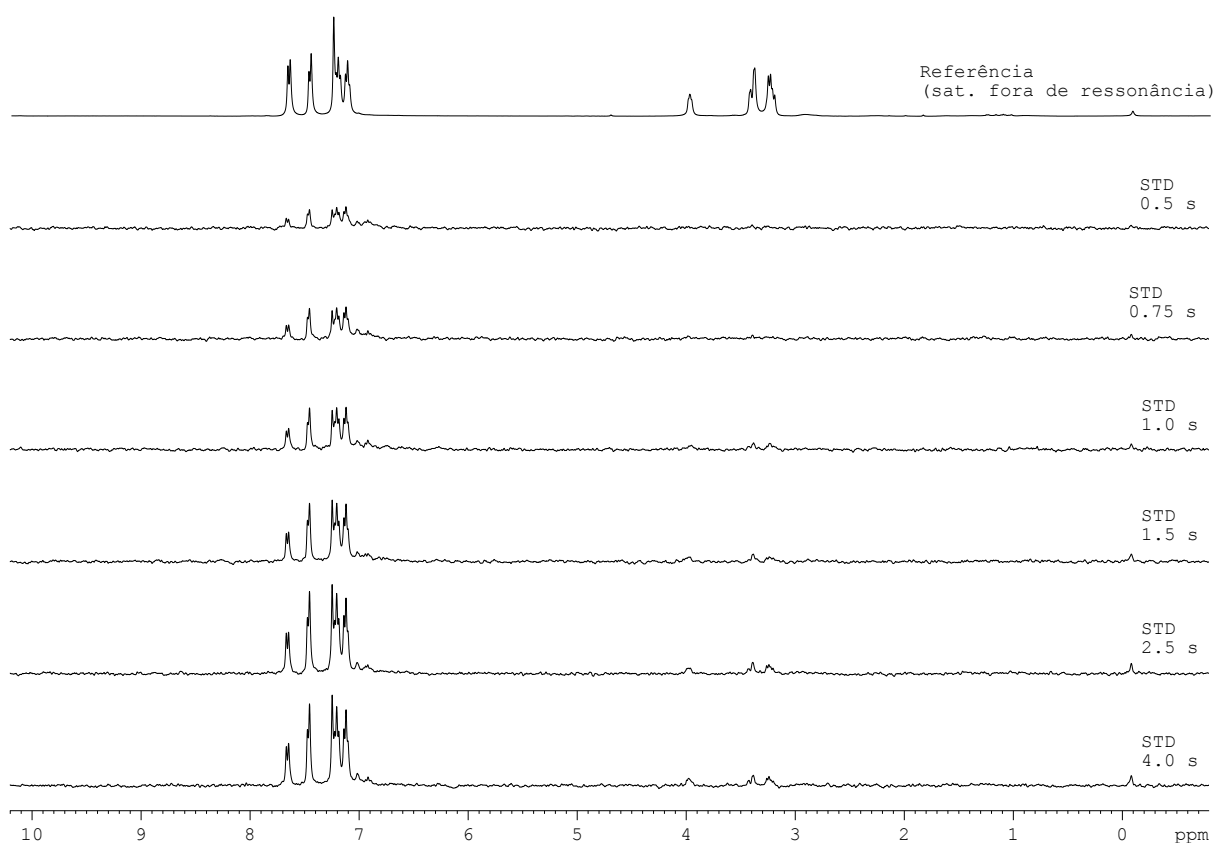
## APÊNDICES

## APÊNDICE A

### Dados de STD

**Tabela 9** – Dados da variação de  $A_{STD}$  com o tempo de saturação para o sistema BSA-Triptofano.

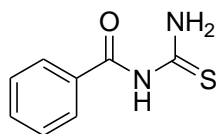
| Tempo de saturação (s) | $A_{STD}$ |             |      |      |      |
|------------------------|-----------|-------------|------|------|------|
|                        | H1        | H2, H3 e H5 | H4   | H6   | H7   |
| 0,5                    | 0,58      | 1,09        | 0,58 | 0,18 | 0,80 |
| 0,75                   | 0,77      | 1,56        | 1,28 | 0,23 | 0,57 |
| 1,0                    | 1,18      | 2,09        | 1,98 | 0,38 | 1,06 |
| 1,5                    | 1,66      | 2,85        | 2,66 | 0,43 | 0,77 |
| 2,5                    | 2,40      | 3,80        | 3,89 | 0,65 | 0,81 |
| 4,0                    | 2,42      | 3,94        | 3,96 | 0,48 | 0,98 |



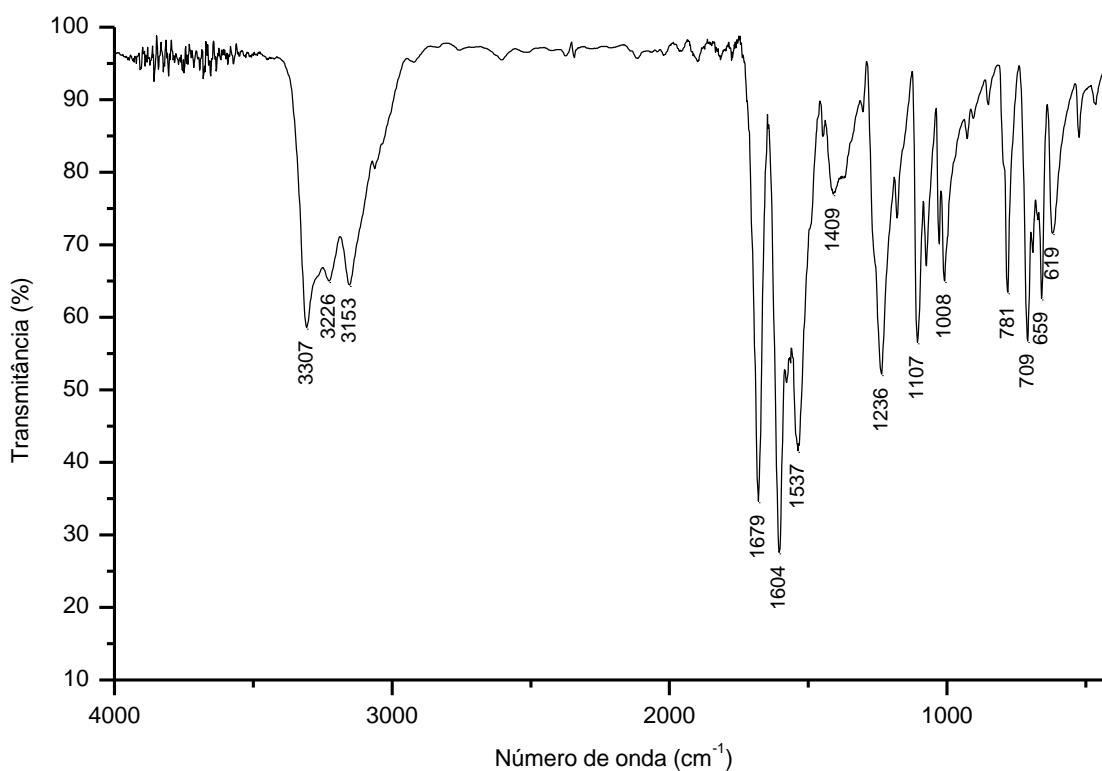
**Figura 45.** Espectro referência e STD's nos tempos de saturação entre 0,5 e 4,0 s, para o sistema BSA-Triptofano.

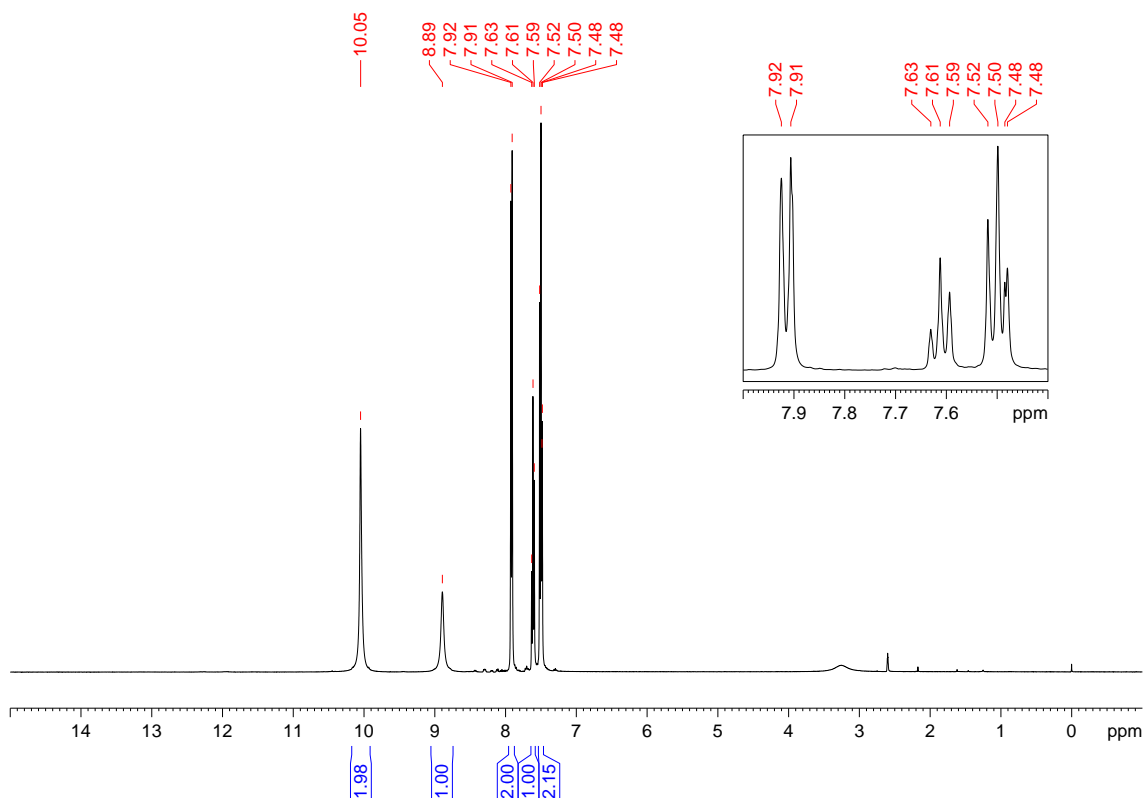
**APÊNDICE B**

Dados de caracterização dos compostos, com respectivos espectros de IV e RMN

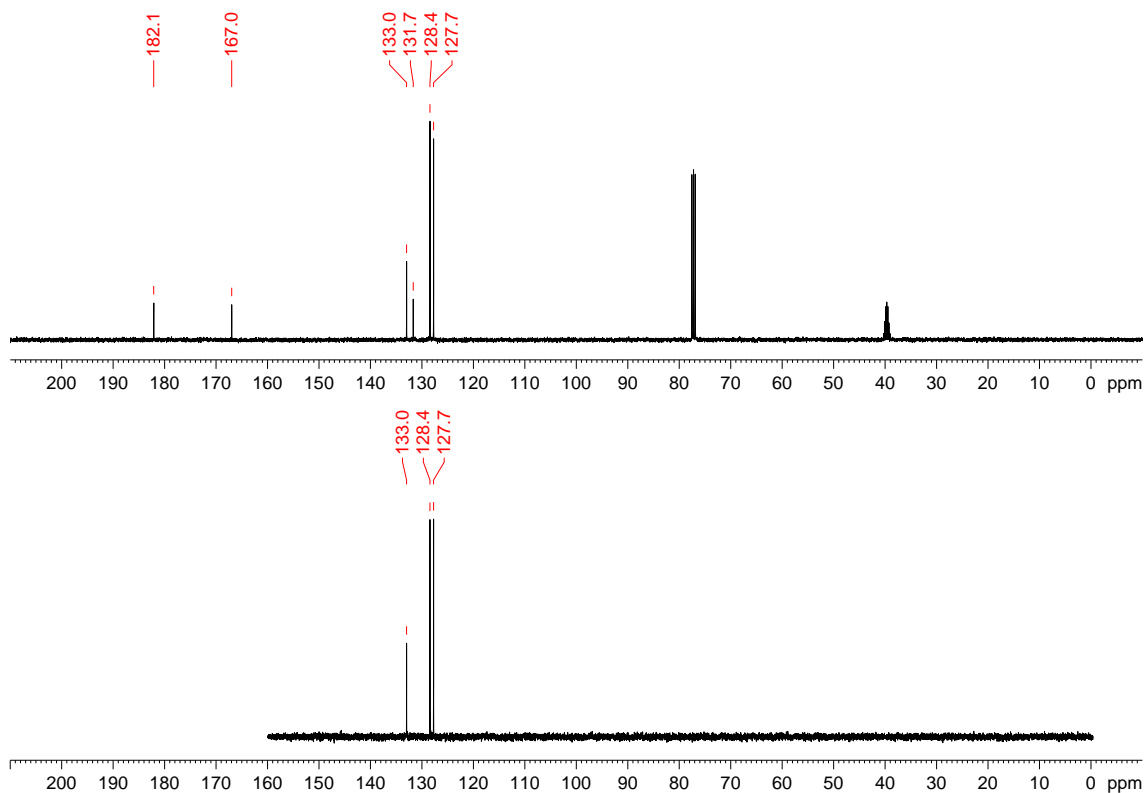
**(1) *N*-benzoil-tioureia:****(1)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 50%. PF: 170 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3307, 3226, 3153, 1679, 1604, 1537, 1409, 1236, 1107, 1008, 781, 709, 659, 619. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$  /  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7,50 (2H, t,  $^3J$  7,3 Hz), 7,61 (1H, t,  $^3J$  7,3 Hz), 7,92 (2H, d,  $^3J$  7,1 Hz), 8,89 (1H, s, largo, CONH), 10,05 (2H, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$  /  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 127,7(+) (CH), 128,4(+) (CH), 131,7 (C), 133,0(+) (CH), 167,0 (C=O), 182,1 (C=S).

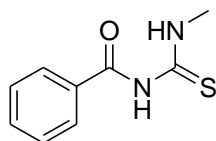
**Figura 46.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto 1.



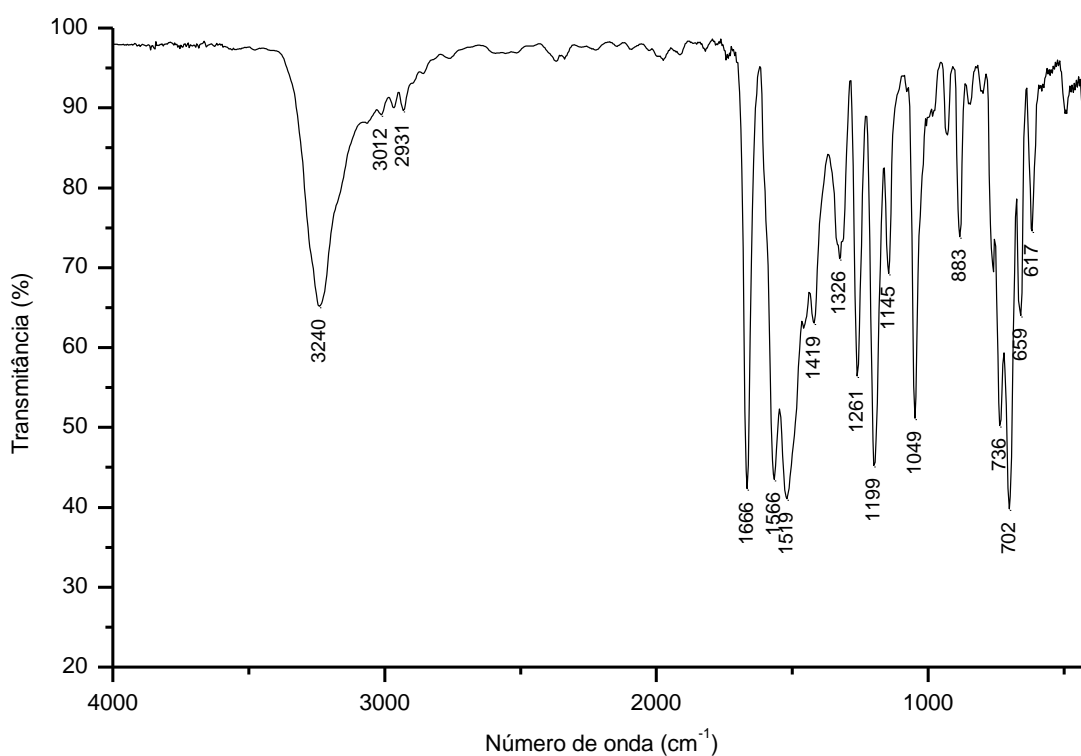
**Figura 47.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **1** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6/\text{CDCl}_3$  1:4).



**Figura 48.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **1** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6/\text{CDCl}_3$  1:4).

**(2) *N*-benzoil-*N'*-metil-tioureia:****(2)**

Recristalizado em etanol com rendimento 38%. PF: 147 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3240, 3012, 2931, 1666, 1566, 1519, 1419, 1326, 1261, 1199, 1145, 1049, 883, 736, 702, 659, 617. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3,21 (3H, d,  $^3J$  4,8 Hz), 7,46 (2H, t,  $^3J$  7,3 Hz), 7,58 (1H, t,  $^3J$  7,3 Hz), 7,78 (2H, d,  $^3J$  7,1 Hz), 9,09 (1H, s, largo, CONH), 10,66 (1H, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 32,5(+) ( $\text{CH}_3$ ), 127,6(+) (CH), 129,2(+) (CH), 131,9 (C), 133,6(+) (CH), 167,0 (C=O), 180,9 (C=S).



**Figura 49.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **2**.

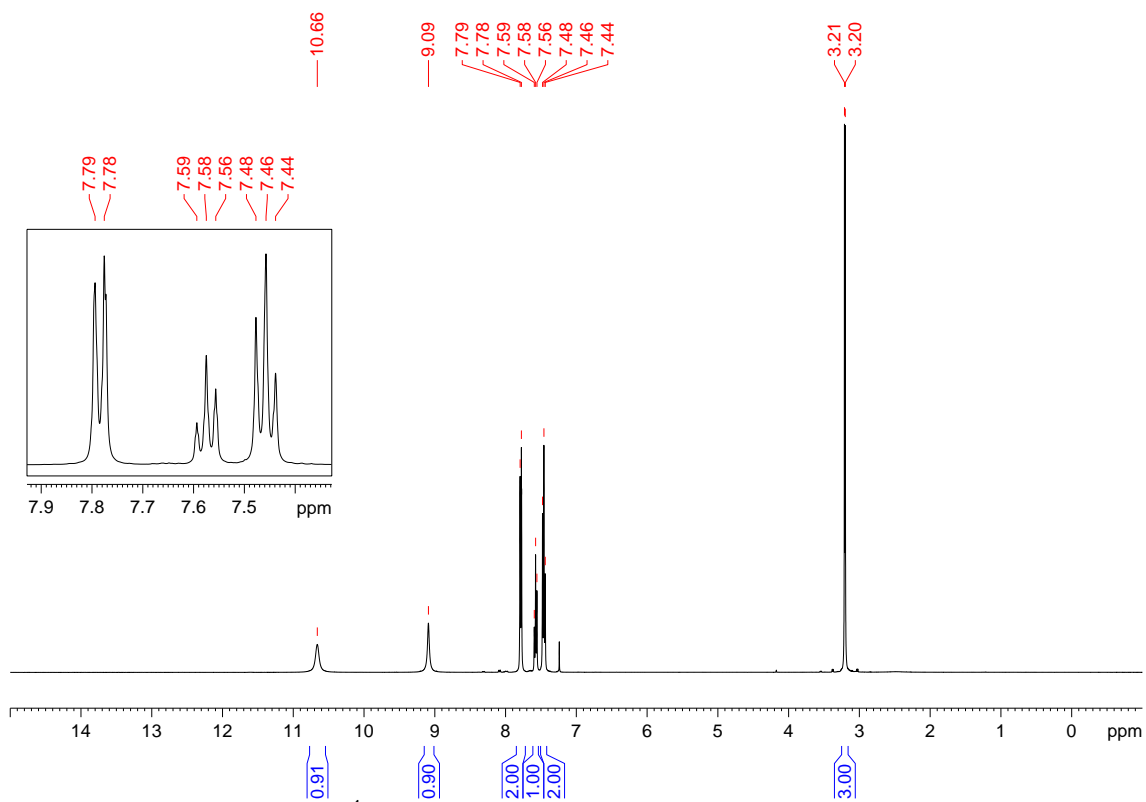


Figura 50. Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **1** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

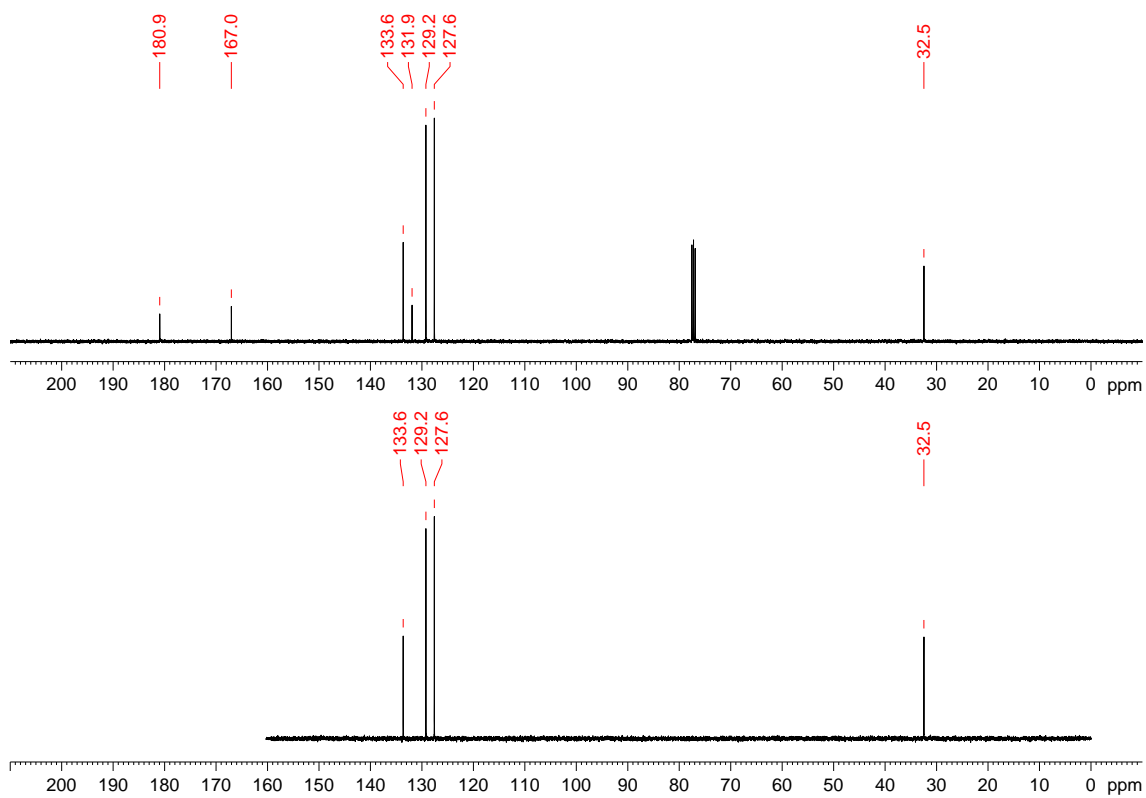
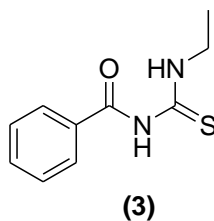
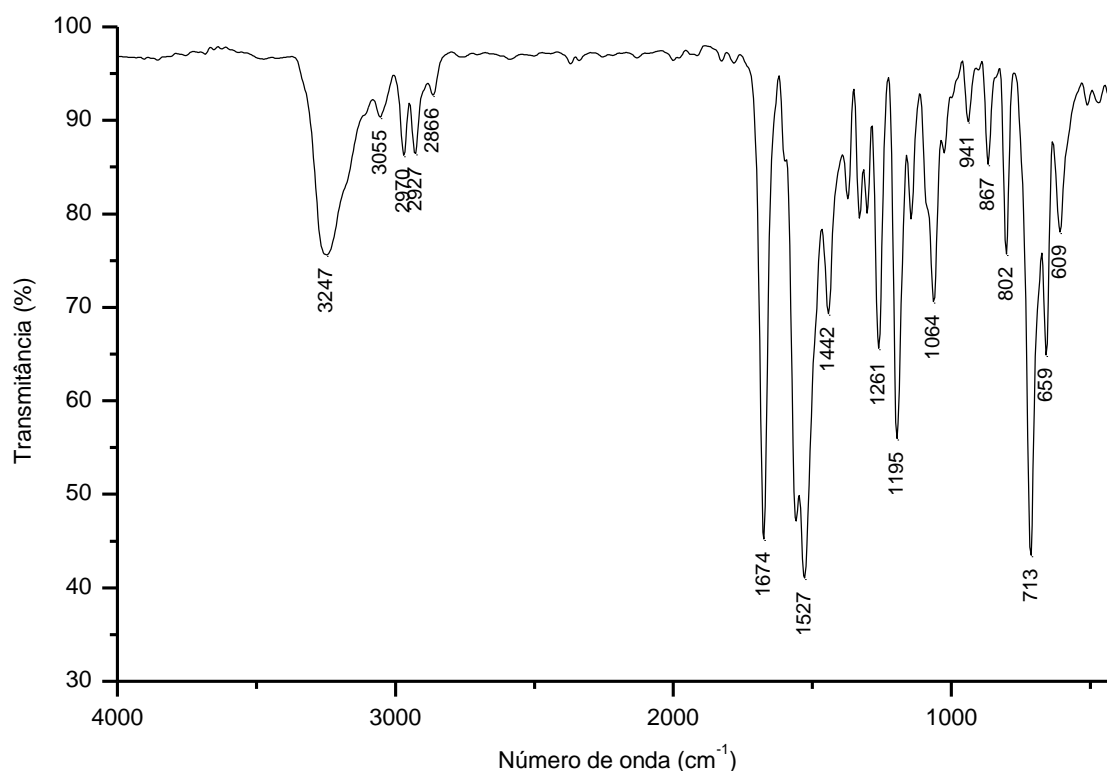


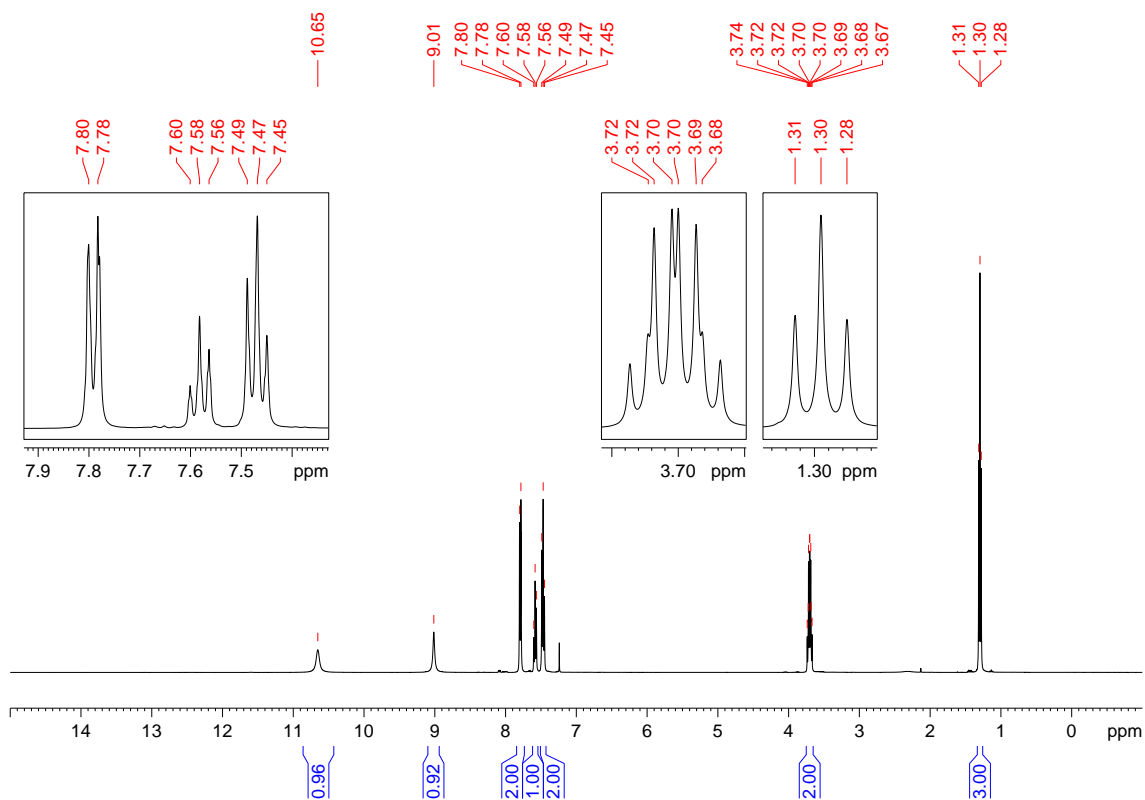
Figura 51. Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **1** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

**(3) N-benzoil-N'-etil-tioureia:**

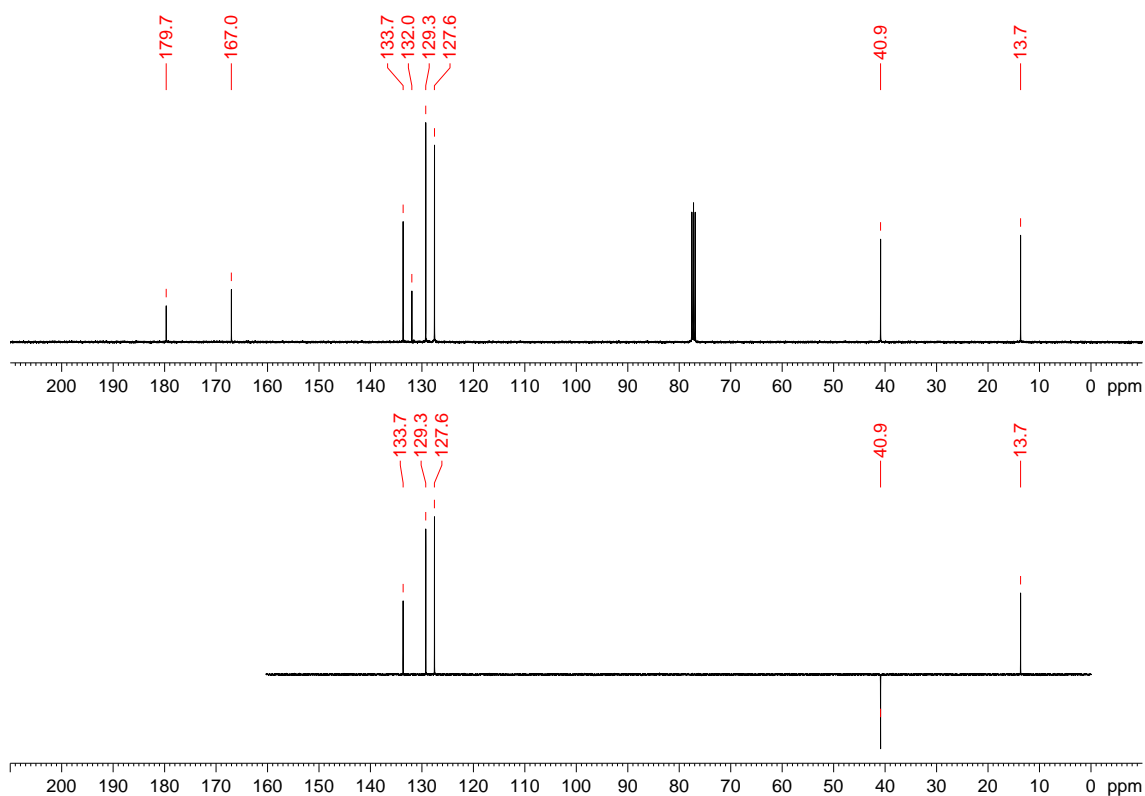
Recristalizado em etanol com rendimento de 58%. PF: 125 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3247, 3055, 2970, 2927, 2866, 1674, 1527, 1442, 1261, 1195, 1064, 941, 867, 802, 713, 659, 609. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,30 (3H, t,  $^3J$  7,4 Hz), 3,70 (2H, m), 7,47 (2H, t,  $^3J$  7,4 Hz), 7,58 (1H, t,  $^3J$  7,4 Hz), 7,79 (2H, d,  $^3J$  7,3 Hz), 9,01 (1H, s, largo, CONH), 10,65 (1H, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 13,7(+) ( $\text{CH}_3$ ), 40,9(-) ( $\text{CH}_2$ ), 127,6(+) (CH), 129,3(+) (CH), 132,0 (C), 133,7(+) (CH), 167,0 (C=O), 179,7 (C=S).



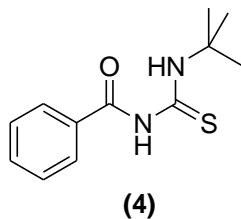
**Figura 52.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **3**.



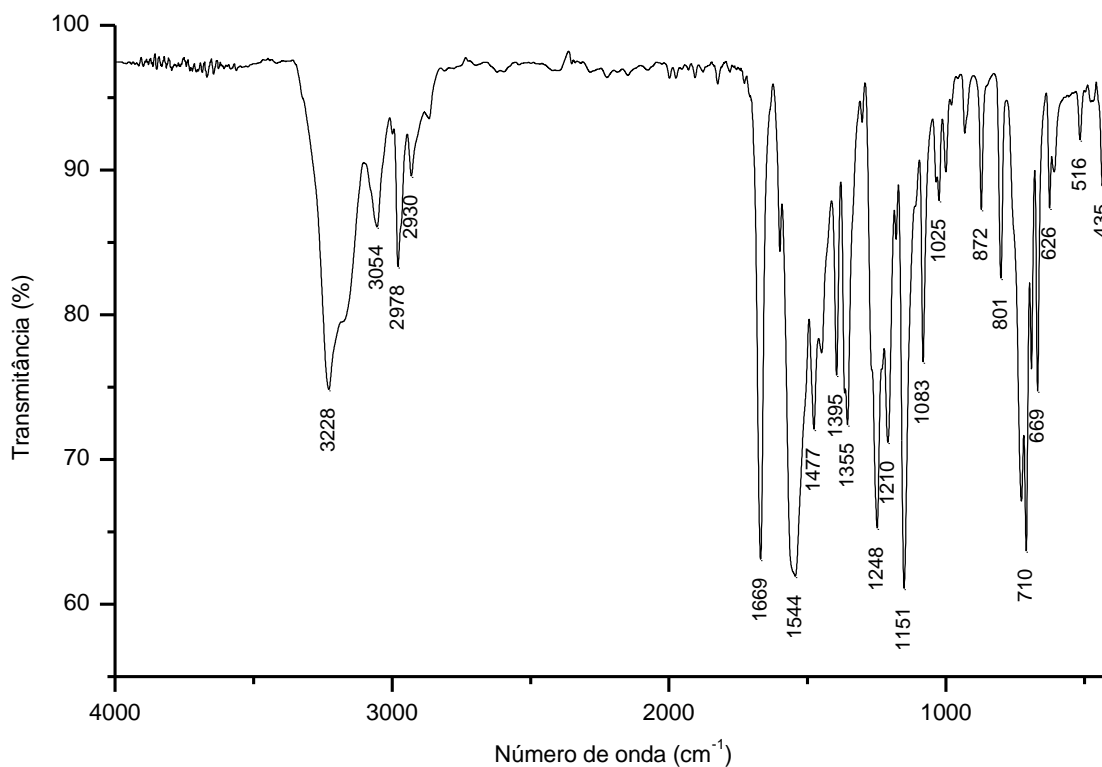
**Figura 53.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **3** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).



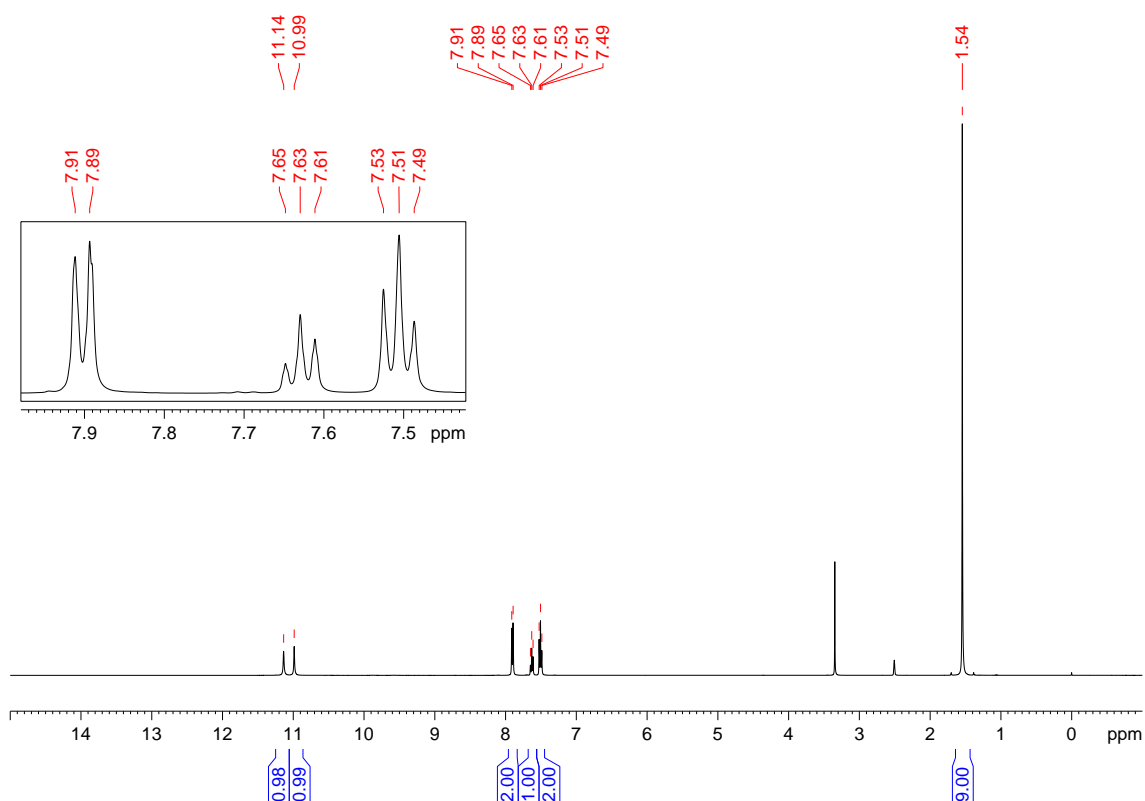
**Figura 54.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **3** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

**(4) N-benzoil-N'-tercbutil-tiourea:**

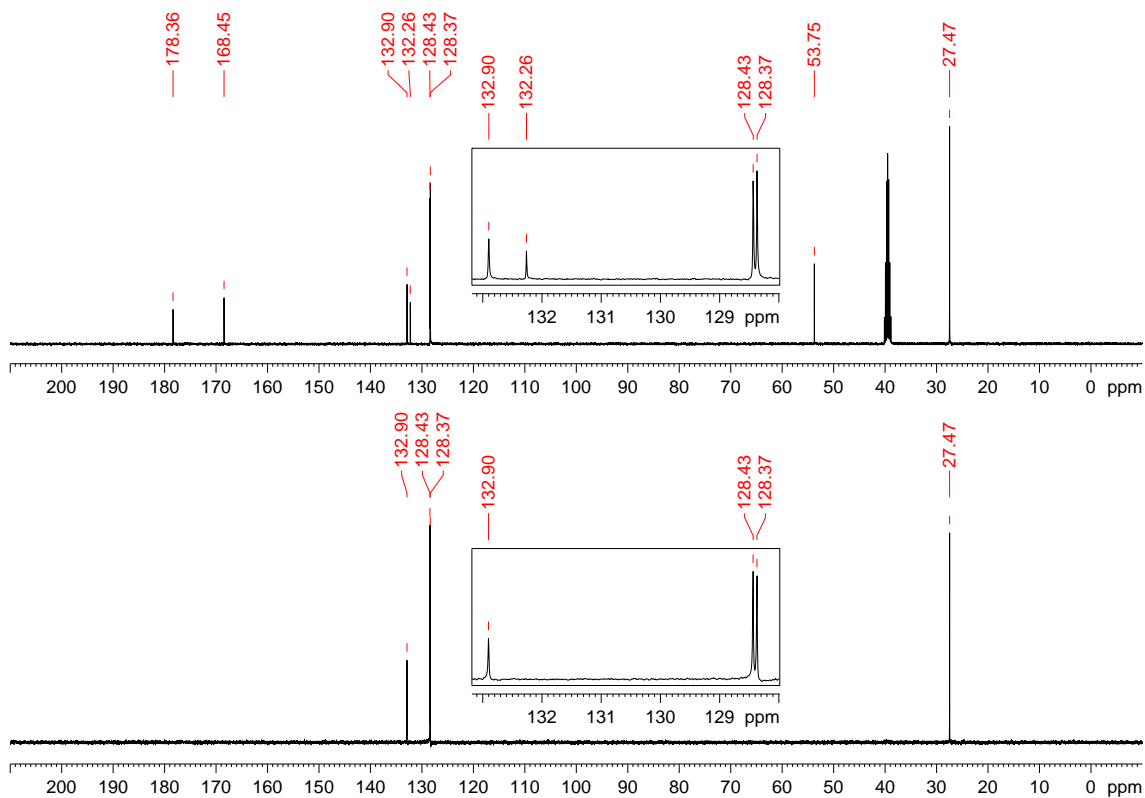
Recristalizado em metanol/etanol com rendimento de 58%. PF: 124-125 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3228, 3054, 2978, 2930, 1669, 1544, 1477, 1395, 1355, 1248, 1210, 1151, 1083, 1025, 872, 801, 710, 669, 626, 516, 435. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 1,54 (9H, s,  $3\times\text{CH}_3$ ), 7,51 (2H, t,  $^3J$  7,2 Hz), 7,63 (1H, t,  $^3J$  7,2 Hz), 7,90 (2H, d,  $^3J$  7,2 Hz), 10,99 (1H, s, largo, CONH), 11,14 (1H, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 27,5(+) ( $\text{CH}_3$ ), 53,8 (C), 128,4(+) (CH), 128,4(+) (CH), 132,3 (C), 132,9(+) (CH), 168,5 (C=O), 178,4 (C=S).



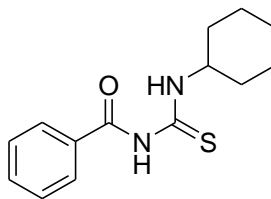
**Figura 55.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **4**.



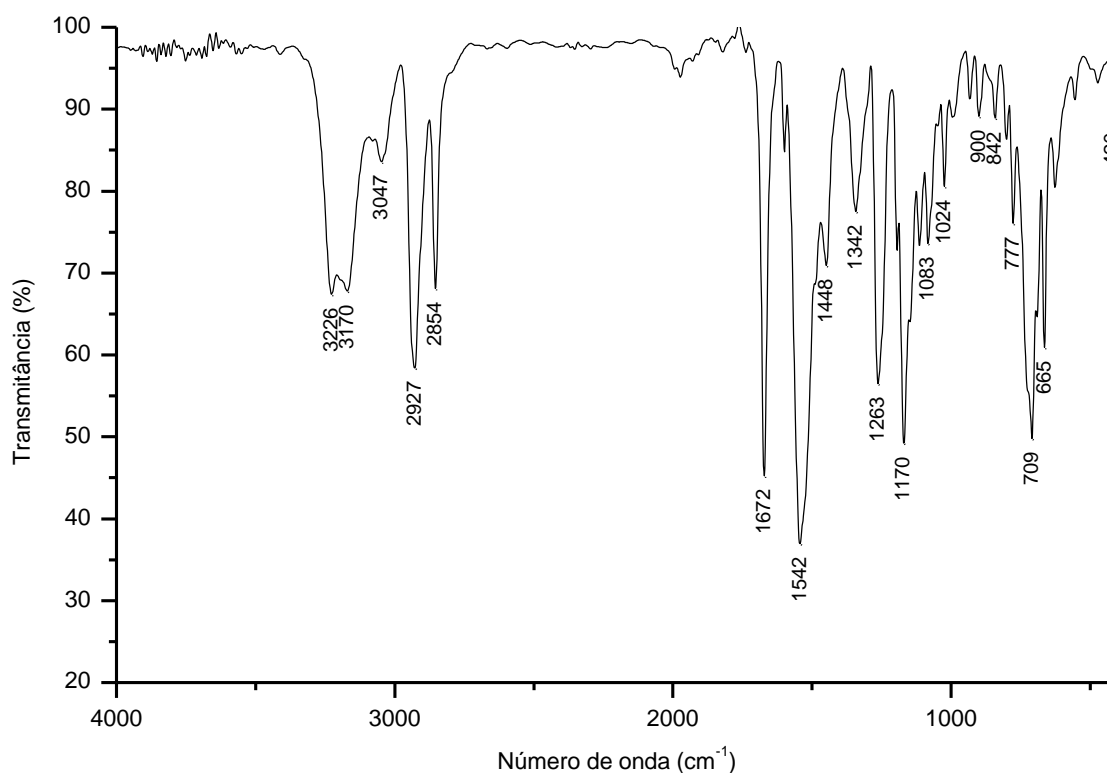
**Figura 56.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **4** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

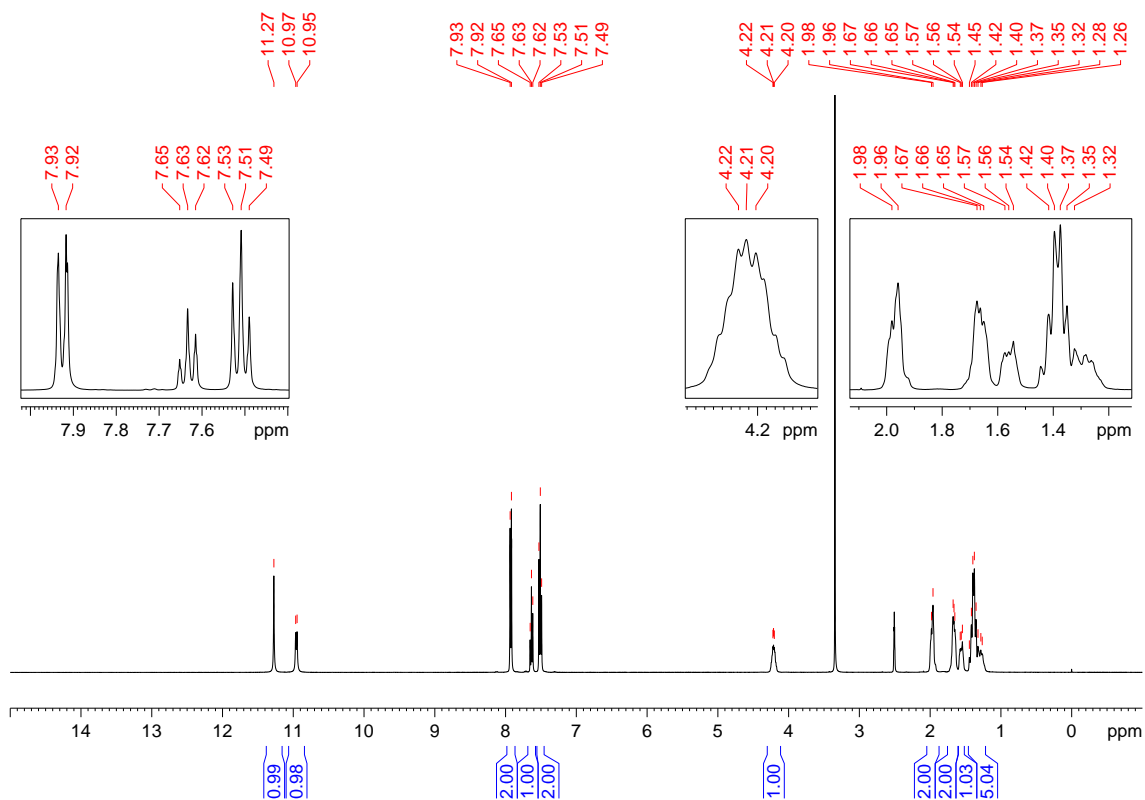


**Figura 57.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **4** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

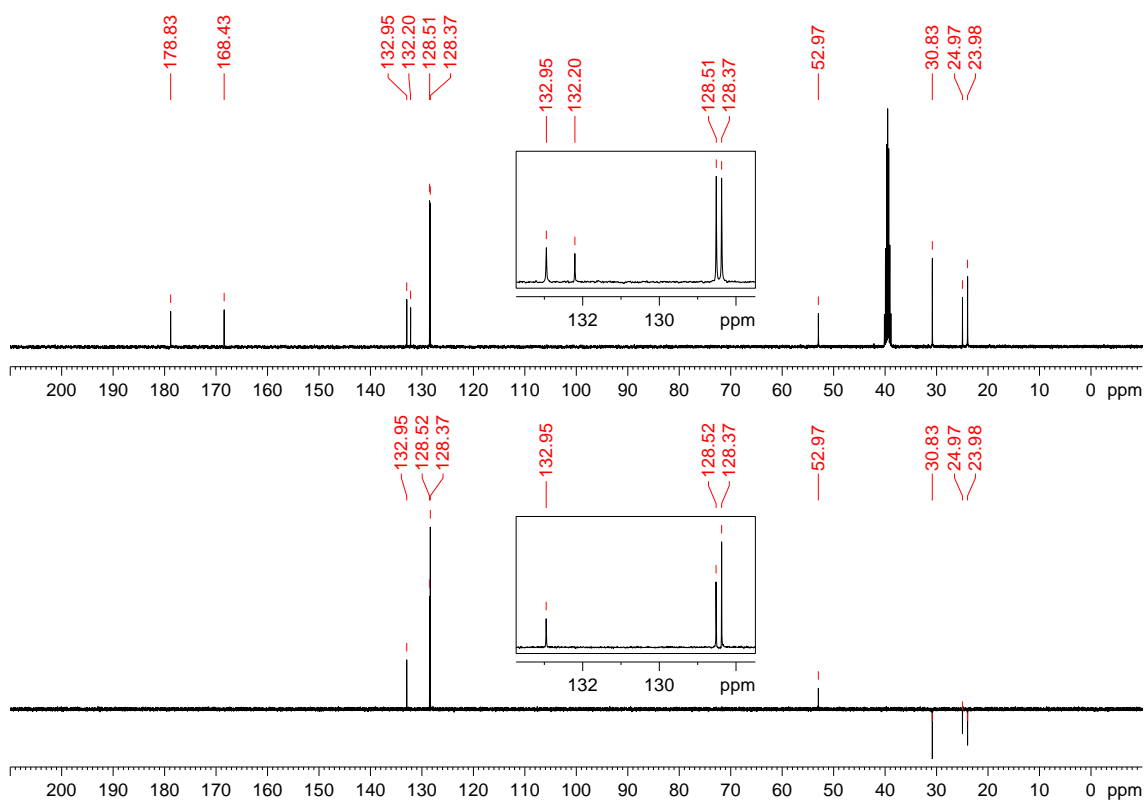
**(5) *N*-benzoil-*N'*-cicloexil-tiourea:****(5)**

Recristalizado em éter de petróleo/diclorometano com rendimento de 90%. P.F: 64 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3226, 3170, 3047, 2927, 2854, 1672, 1542, 1448, 1342, 1263, 1170, 1083, 1024, 900, 842, 777, 709, 665, 420. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 1,20-1,50 (5H, m), 1,50-1,60 (1H, m), 1,60-1,75 (2H, m), 1,90-2,05 (2H, m), 4,10-4,03 (1H, m), 7,51 (2H, t,  $^3J$  7,6 Hz), 7,63 (1H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,92 (2H, d,  $^3J$  7,5 Hz), 10,96 (1H, d,  $^3J$  7,6 Hz, largo, CONH), 11,27 (1H, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 24,0(-) ( $\text{CH}_2$ ), 25,0(-) ( $\text{CH}_2$ ), 30,8(-) ( $\text{CH}_2$ ), 53,0(+) (HC-N), 128,4(+) (CH), 128,5(+) (CH), 132,2 (C), 133,0(+) (CH), 168,4 (C=O), 178,8 (C=S).

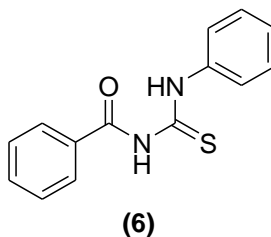
**Figura 58.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto 5.



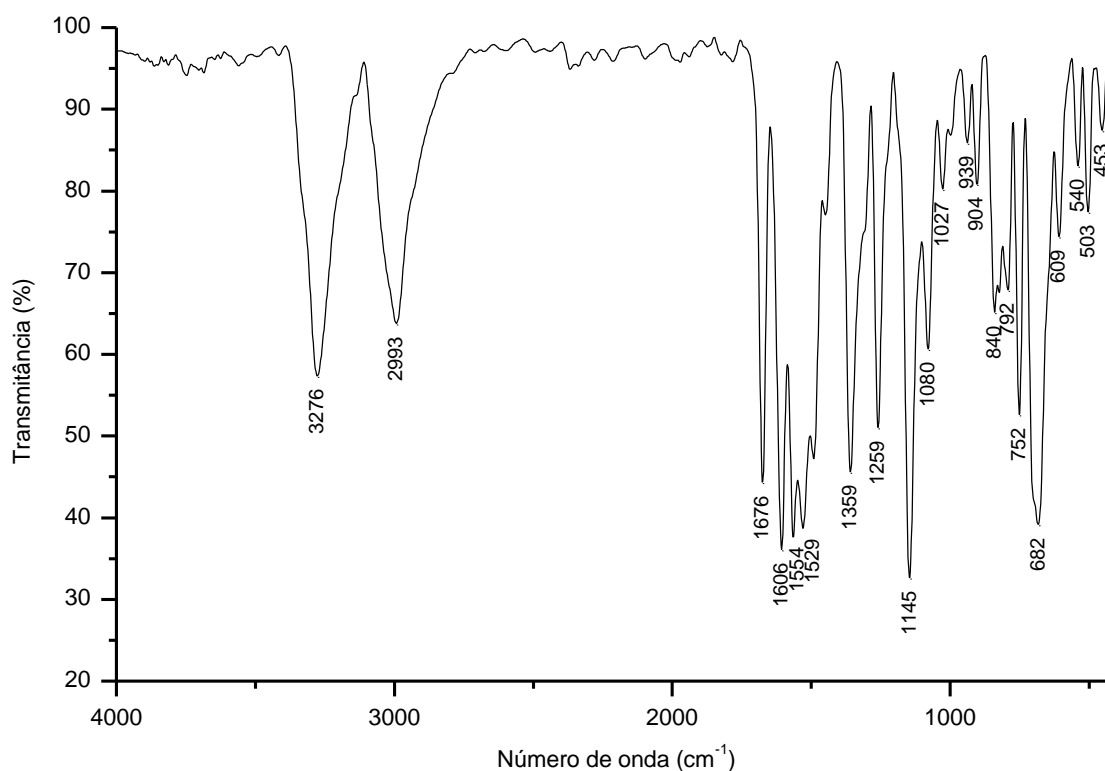
**Figura 59.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **5** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



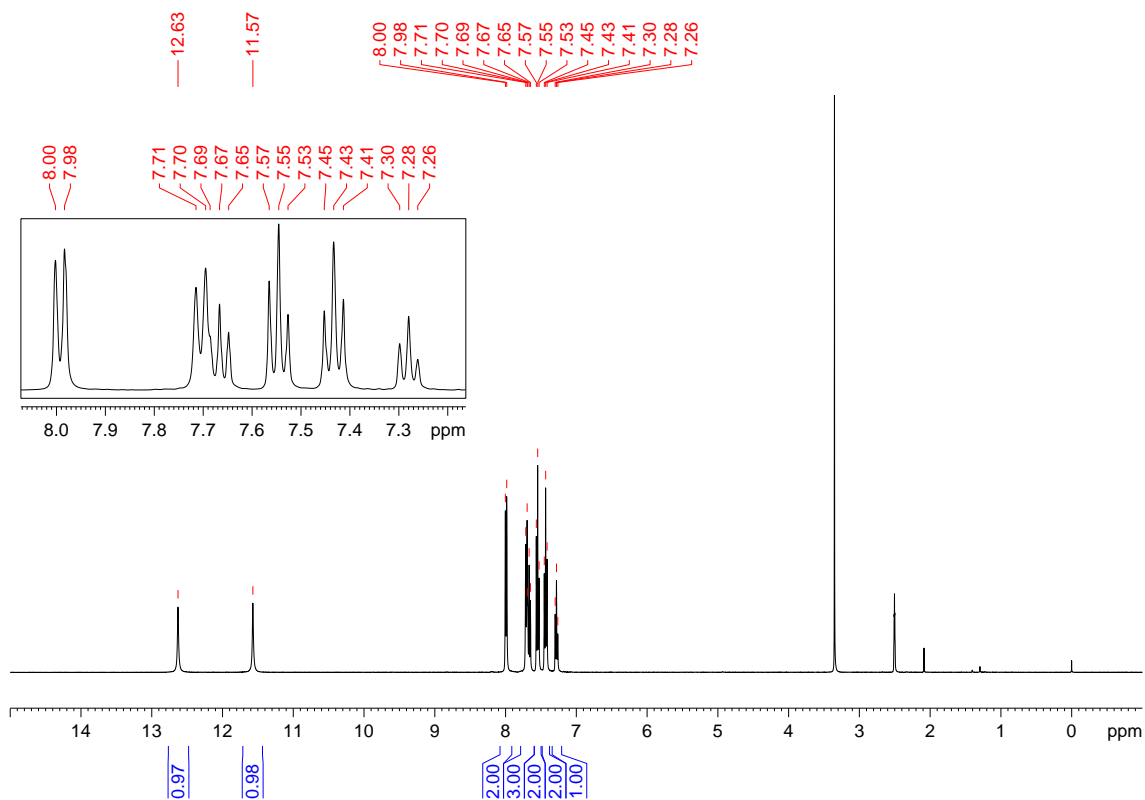
**Figura 60.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **5** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

**(6) *N*-benzoil-*N'*-fenil-tiourea:**

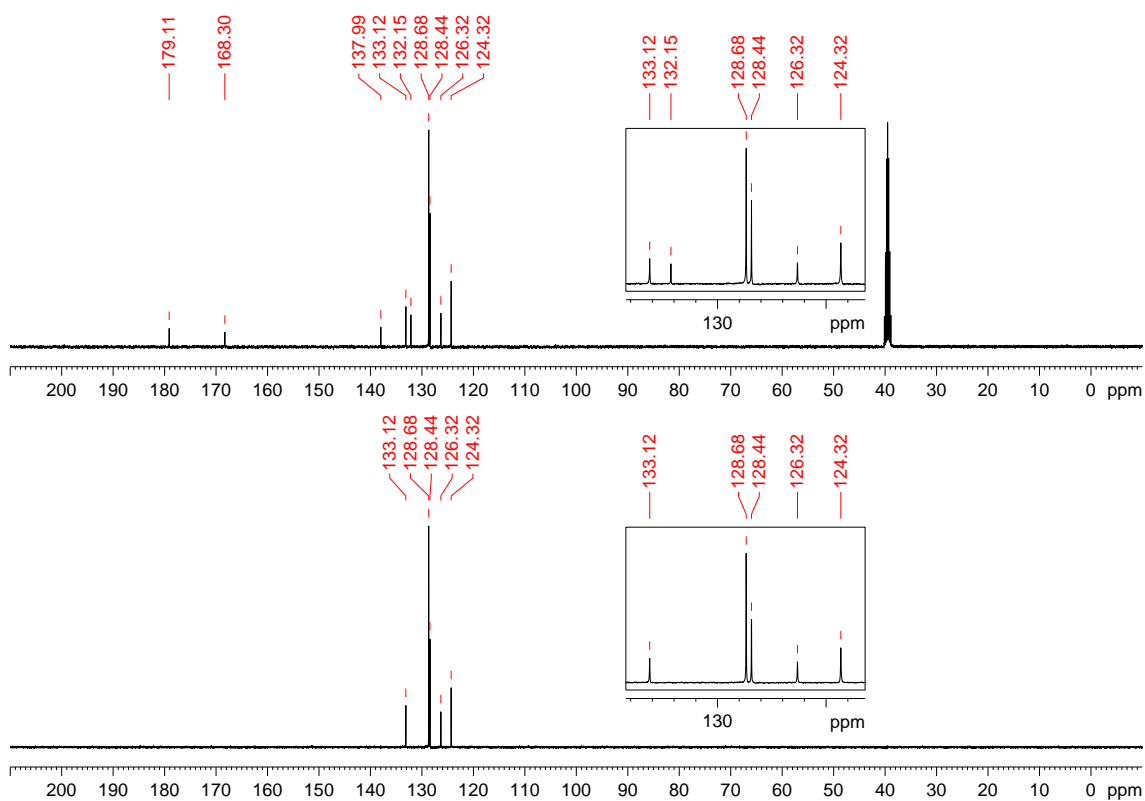
Recristalizado em etanol com rendimento de 79%. P.F: 146 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3276, 2993, 1676, 1606, 1554, 1529, 1359, 1259, 1145, 1080, 1027, 939, 904, 840, 792, 752, 682, 609, 540, 503, 453. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7,28 (1H, t,  $^3J$  7,3 Hz), 7,43 (2H, t,  $^3J$  7,8 Hz), 7,55 (2H, t,  $^3J$  7,8 Hz), 7,64-7,72 (3H, m), 7,99 (2H, d,  $^3J$  7,4 Hz), 11,57 (1NH, s, largo, CONH); 12,63 (1NH, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 124,3(+) (CH), 126,3(+) (CH), 128,4(+) (CH), 128,7(+) (CH), 132,2 (C), 133,1(+) (CH), 138,0 (C), 168,3 (C=O), 179,1 (C=S).



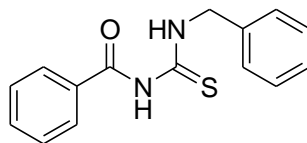
**Figura 61.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **6**.



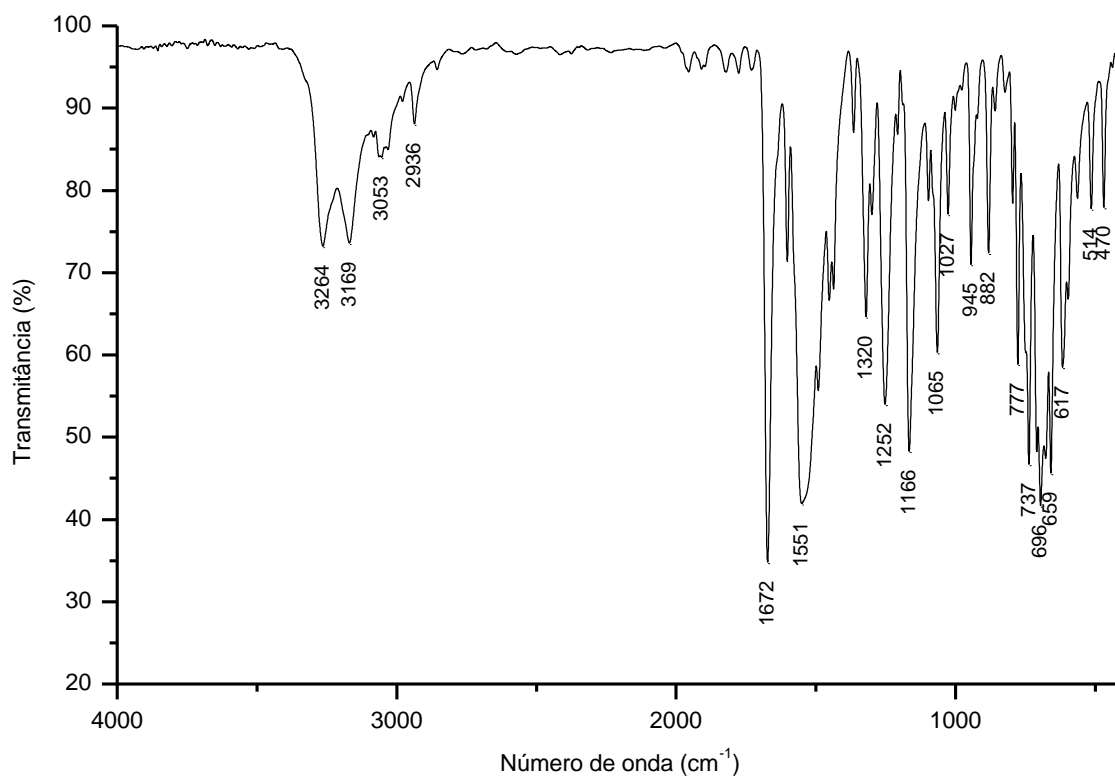
**Figura 62.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **6** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



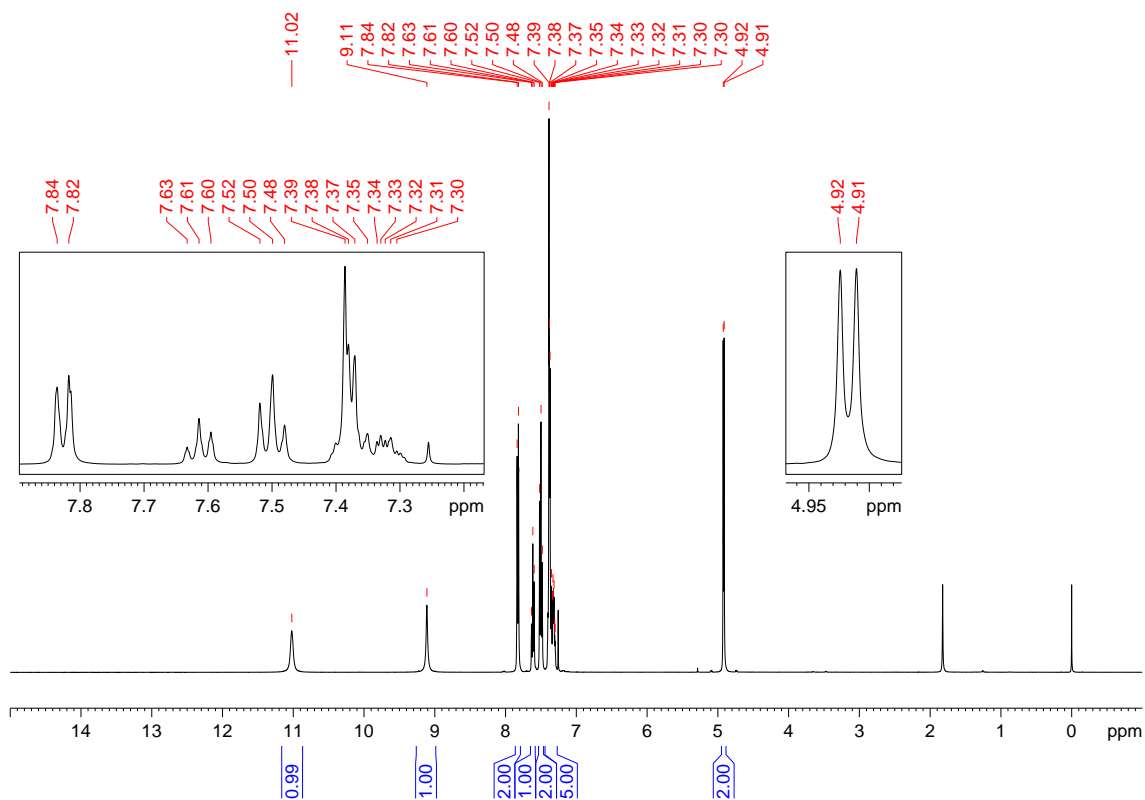
**Figura 63.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **6** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

**(7) *N*-benzoil-*N'*-benzil-tioureia:****(7)**

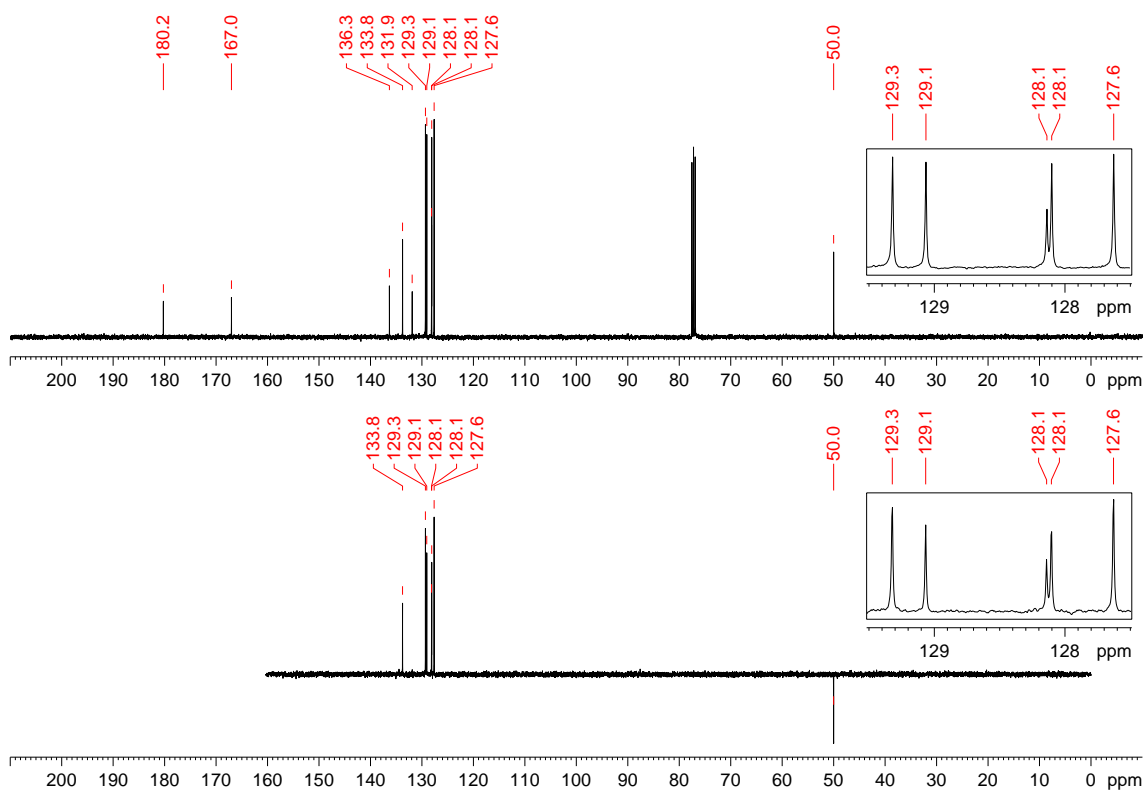
Recristalizado em diclorometano/éter de petróleo com rendimento de 80%. PF: 120-121 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3264, 3169, 3053, 2936, 1672, 1551, 1320, 1252, 1166, 1065, 1027, 945, 882, 777, 737, 696, 659, 617, 514, 470; RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 4,91 (2H, d,  $^3J$  5,0 Hz), 7,28-7,43 (5H, m), 7,50 (2H, t,  $^3J$  7,2 Hz), 7,61 (1H, t,  $^3J$  7,3 Hz), 7,83 (2H, d,  $^3J$  7,3 Hz), 9,11 (1NH, s, largo, CONH), 11,02 (1NH, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 50,0(-) ( $\text{H}_2\text{C-N}$ ), 127,6(+) (CH), 128,1(+) (CH), 128,1(+) (CH), 129,1(+) (CH), 129,3(+) (CH), 131,9 (C), 133,8 (CH), 136,3 (C), 167,0 (C=O), 180,2 (C=S).



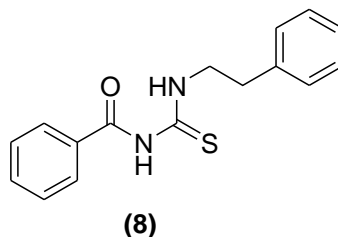
**Figura 64.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto 7.



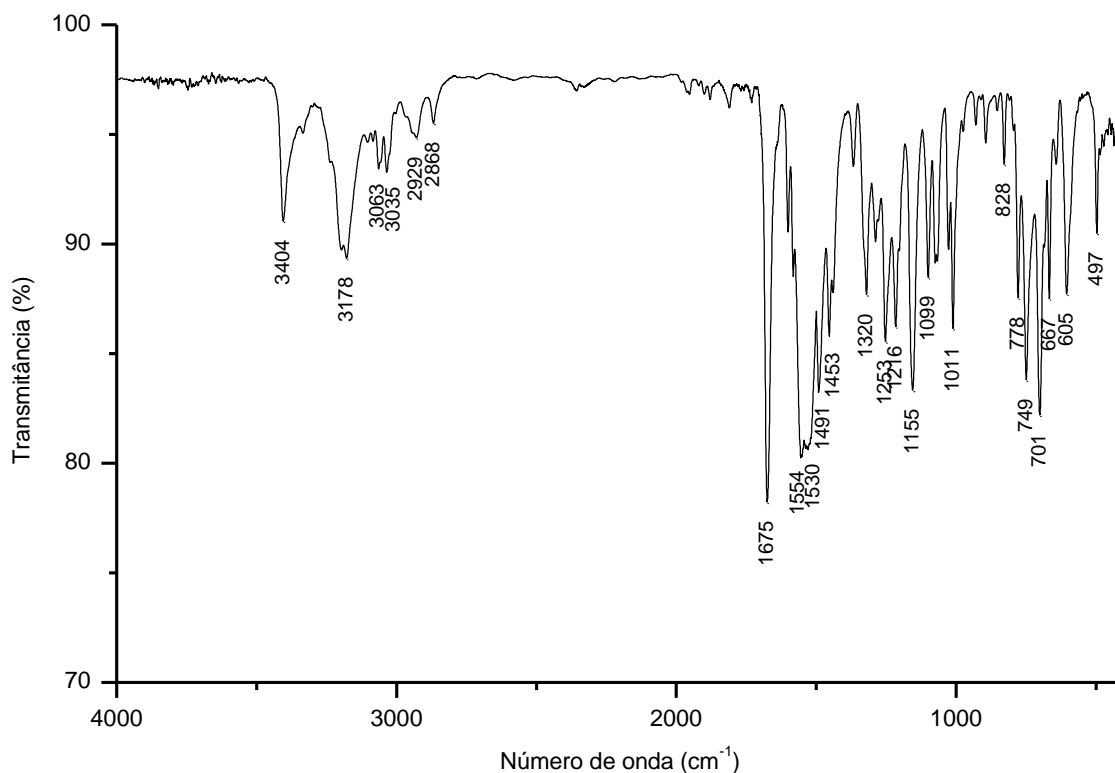
**Figura 65.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **7** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).



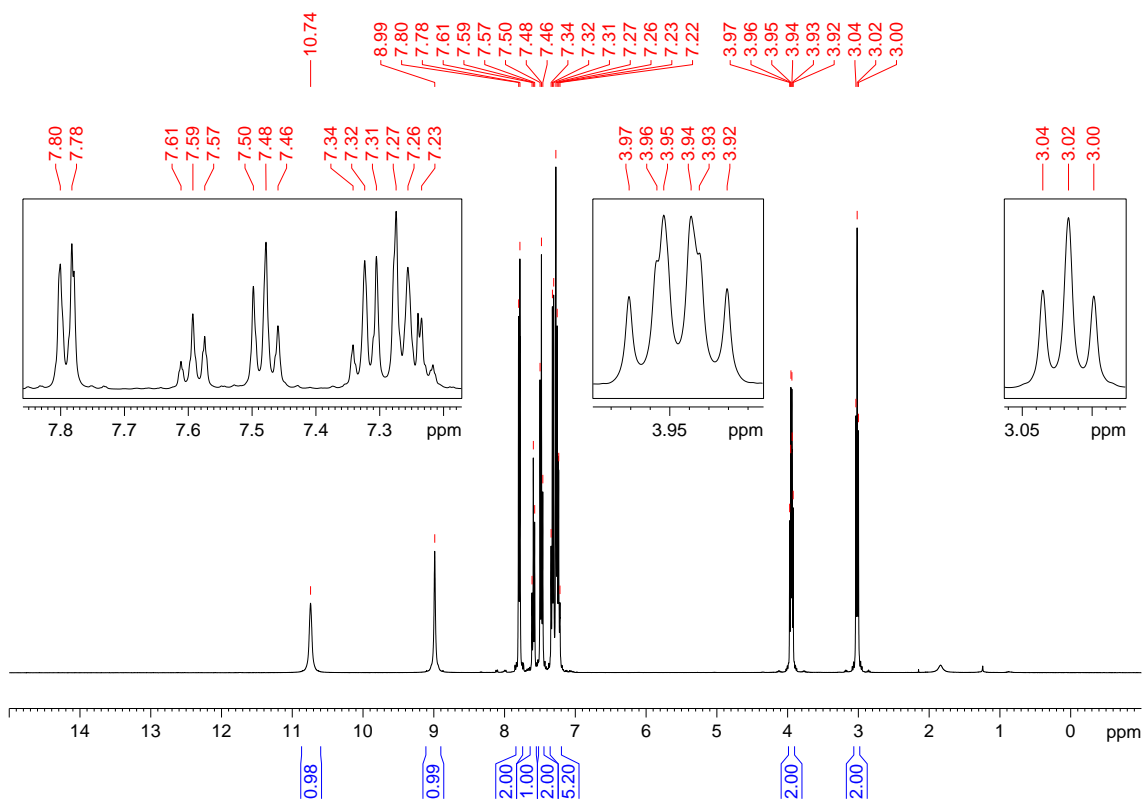
**Figura 66.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **7** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

**(8) N-benzoil-N'-fenetil-tiourea:**

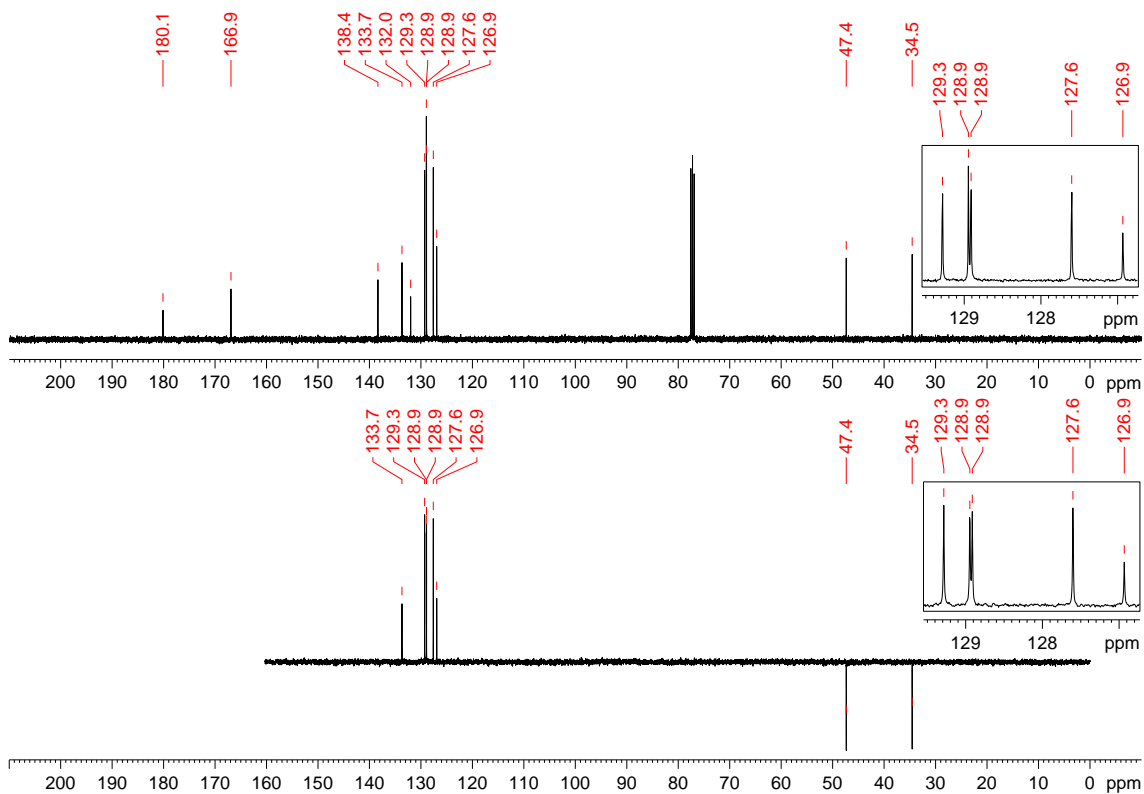
Recristalizado em etanol com rendimento de 86%. PF: 104-105 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3404, 3178, 3063, 3035, 2929, 2868, 1675, 1554, 1530, 1491, 1453, 1320, 1253, 1216, 1155, 1099, 1011, 828, 778, 749, 701, 667, 605, 497. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3,02 (2H, t,  $^3J$  7,3 Hz), 3,91-3,98 (2H, m), 7,21-7,35 (5H, m), 7,48 (2H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,59 (1H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,79 (2H,  $^3J$  7,5 Hz), 8,99 (1H, s, largo, CONH), 10,74 (1H, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 34,5(-) ( $\text{CH}_2$ ), 47,4(-) ( $\text{NCH}_2$ ), 126,9(+) (CH), 127,6(+) (CH), 128,9(+) (CH), 128,9 (+) (CH), 129,3 (+) (CH), 132,0 (C), 133,7(+) (CH), 138,4 (C), 166,9 (C=O), 180,1 (C=S).



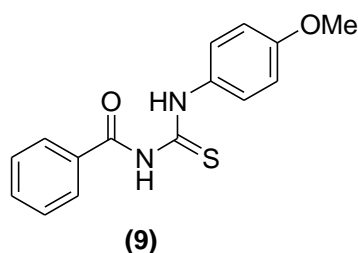
**Figura 67.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **8**.



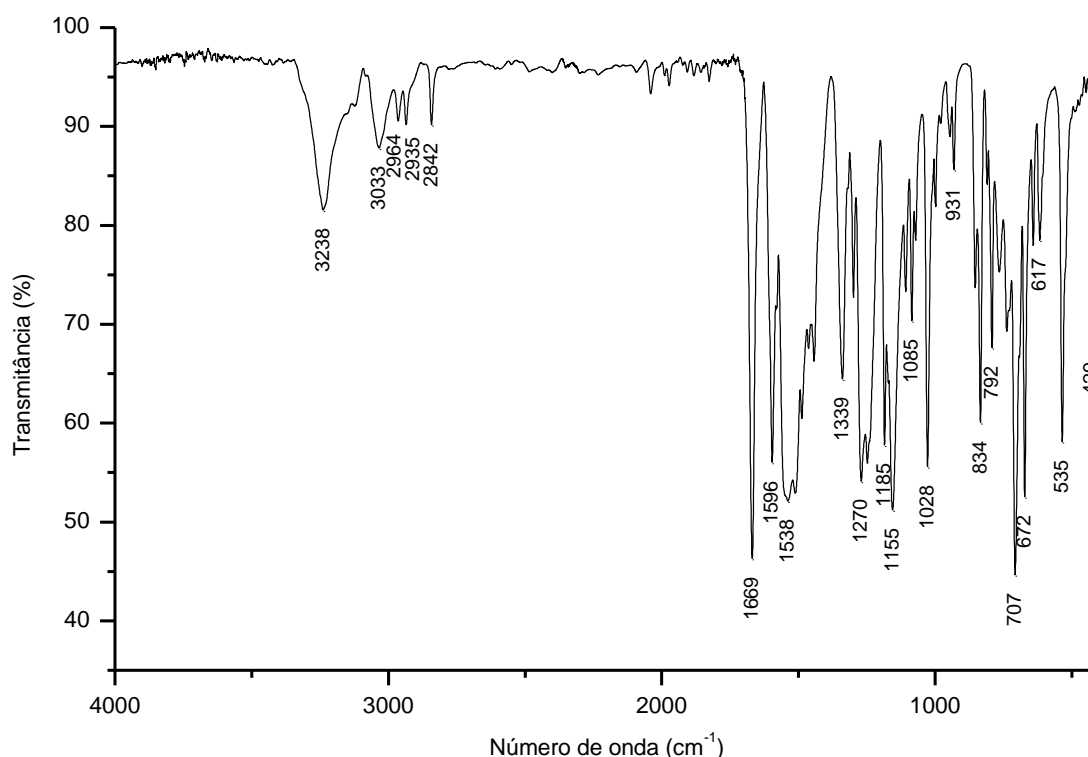
**Figura 68.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **8** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).



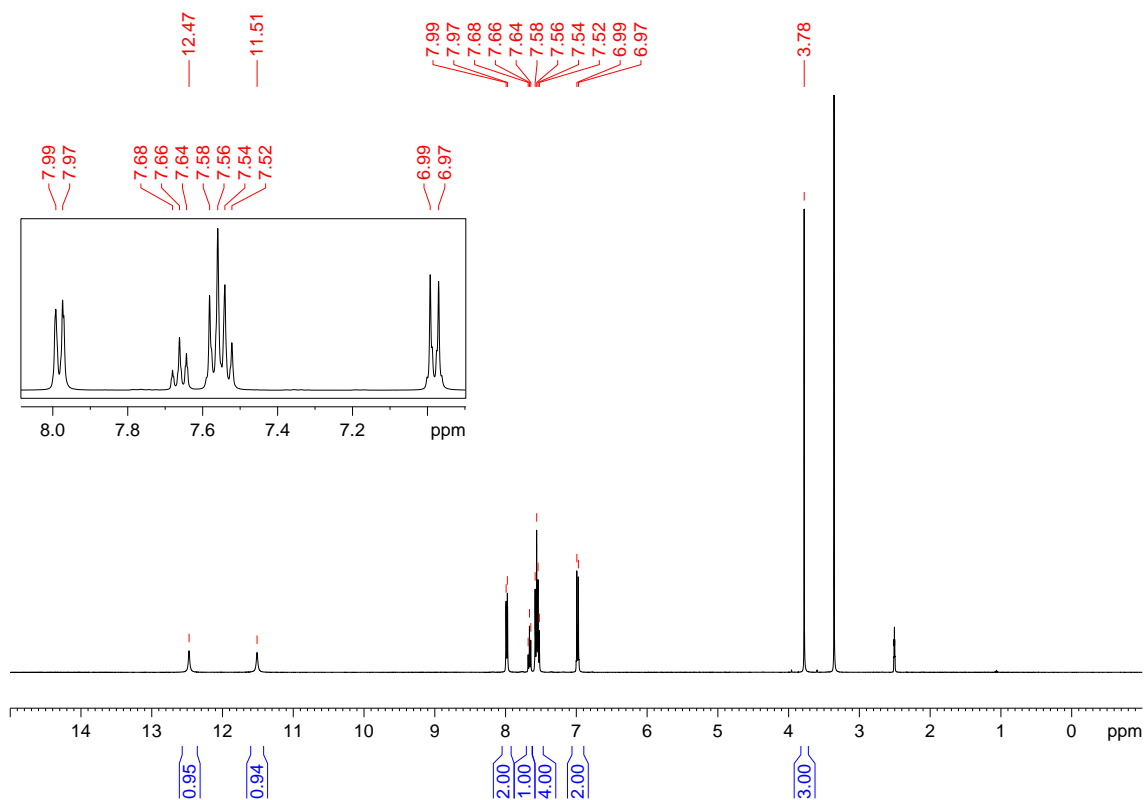
**Figura 69.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **8** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

**(9) *N*-benzoil-*N'*-(4-metoxifenil)-tiourea:**

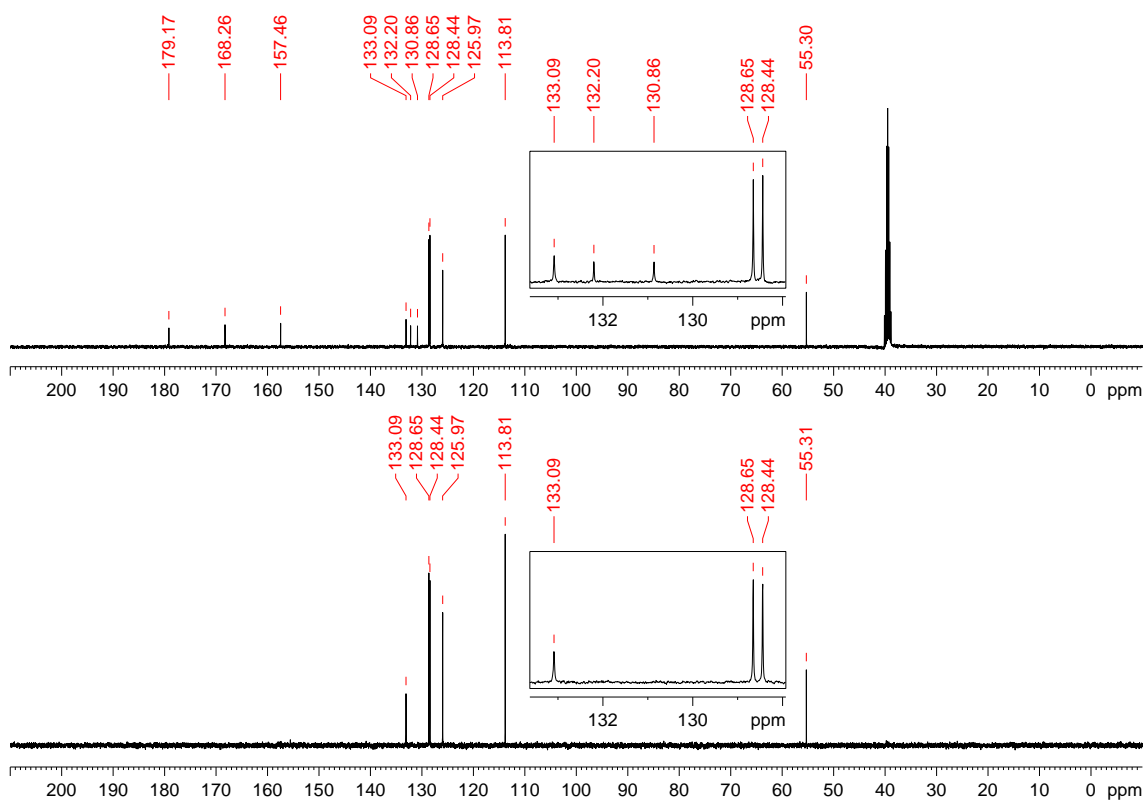
Recristalizado em etanol com rendimento de 92%. PF: 145 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3238, 3033, 2964, 2935, 2842, 1669, 1596, 1538, 1339, 1270, 1185, 1155, 1085, 1028, 931, 834, 792, 707, 672, 617, 535, 429; RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 3,78 (3H, s), 6,98 (2H, d,  $^3J$  9,0 Hz), 7,51-7,59 (4H, m), 7,66 (1H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,98 (2H, d,  $^3J$  7,6 Hz), 11,51 (1H, s, largo, CONH), 12,47 (1H, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 55,3(+) ( $\text{H}_3\text{C-O}$ ), 113,8(+) (CH), 126,0(+) (CH), 128,4(+) (CH), 128,6(+) (CH), 130,9 (C), 132,2 (C), 133,1(+) (CH), 157,5 (C), 168,3 (C=O), 179,2 (C=S).



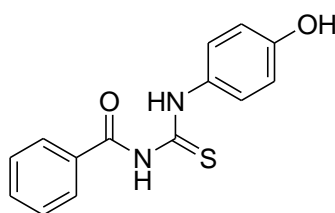
**Figura 70.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **9**.



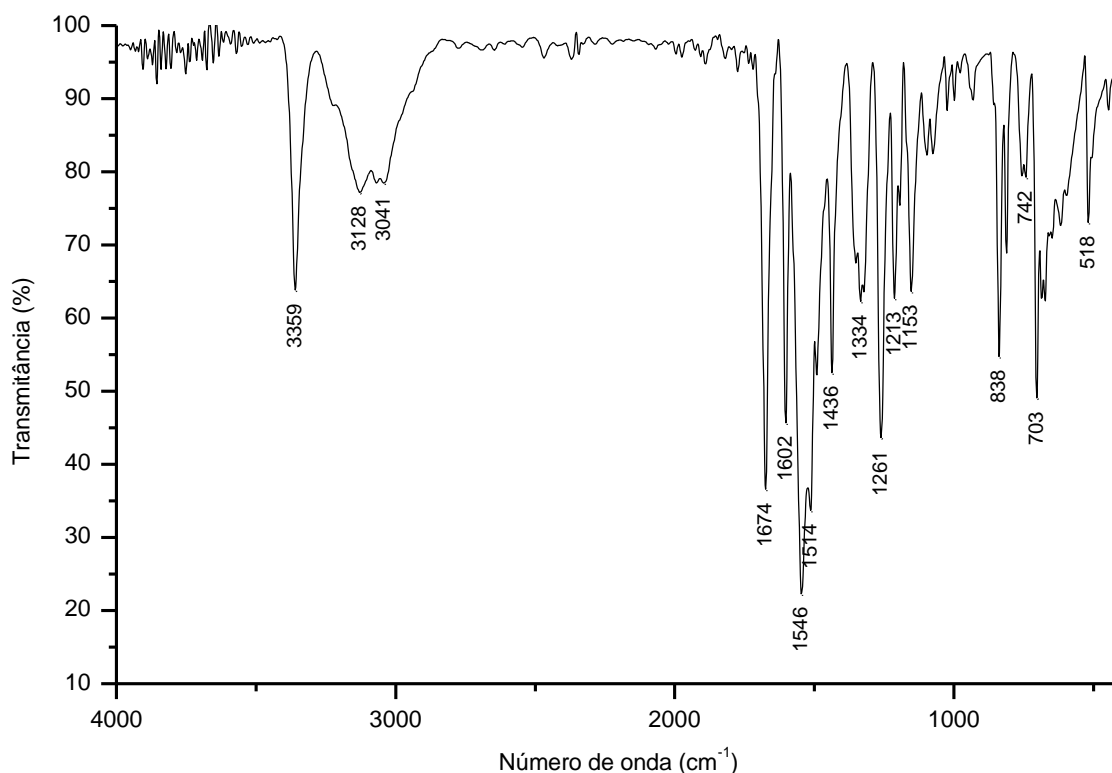
**Figura 71.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **9** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

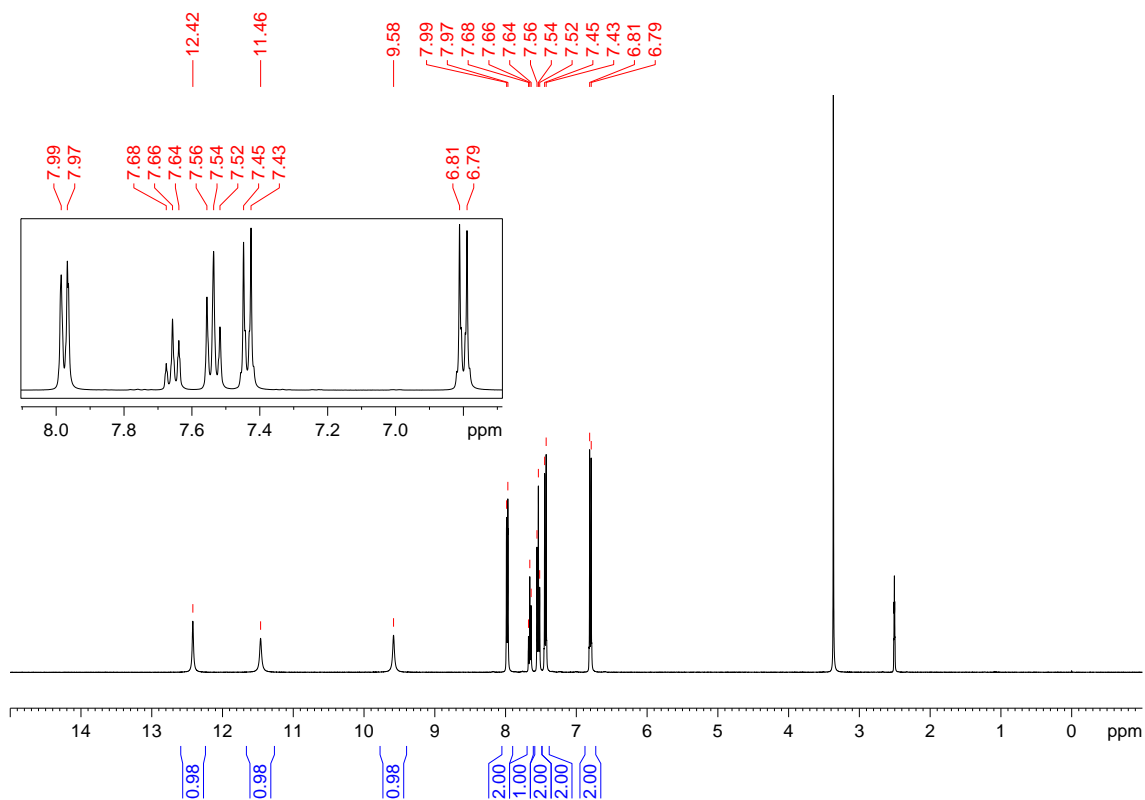


**Figura 72.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **9** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

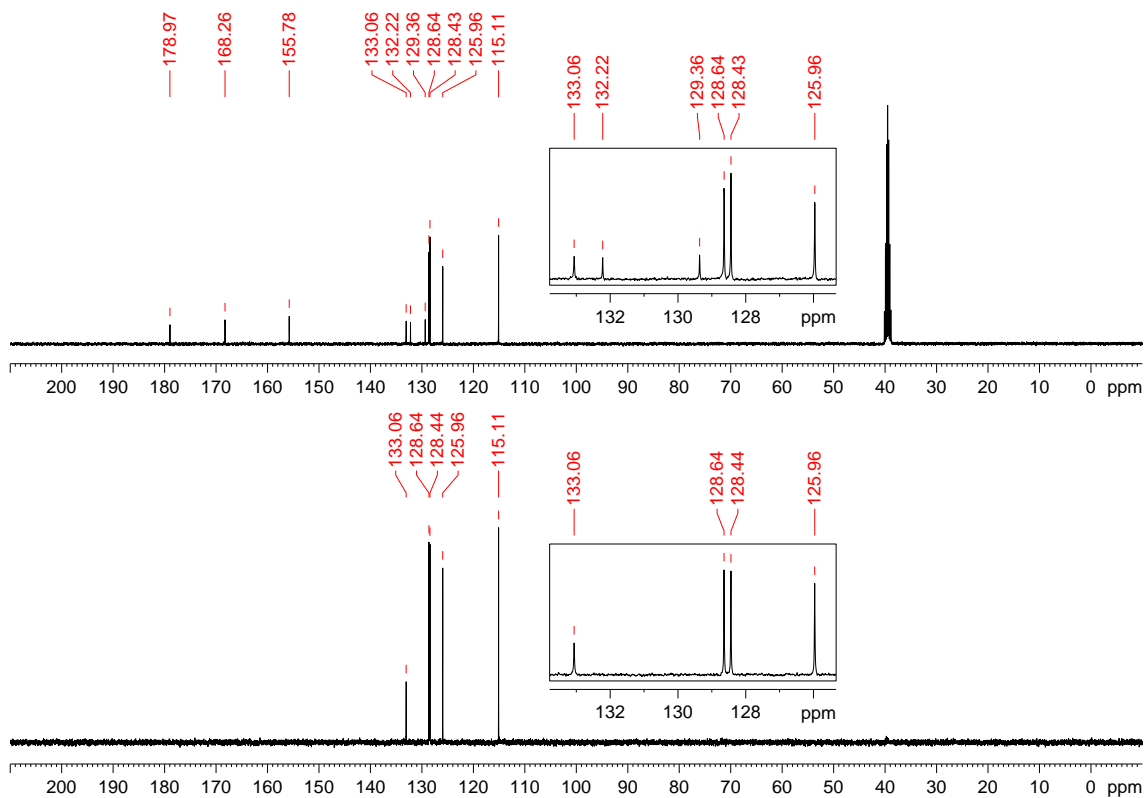
**(10) N-benzoil-N'-(4-hidroxifenil)-tiourea:****(10)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 96%. PF: 159-161 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3359, 3128, 3041, 1674, 1602, 1546, 1514, 1436, 1334, 1261, 1213, 1153, 838, 742, 703, 518. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 6,80 (2H, d,  $^3J$  8,8 Hz), 7,44 (2H, d,  $^3J$  8,8 Hz), 7,54 (2H, t,  $^3J$  7,7 Hz), 7,66 (1H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,98 (2H, d,  $^3J$  7,7 Hz), 9,58 (1H, s, OH), 11,46 (1H, s, largo, CONH), 12,42 (1NH, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 115,1(+) (CH), 126,0(+) (CH), 128,4(+) (CH), 128,6(+) (CH), 129,4 (C), 132,2 (C), 133,1(+) (CH), 155,8 (C), 168,3 (C=O), 179,0 (C=S).

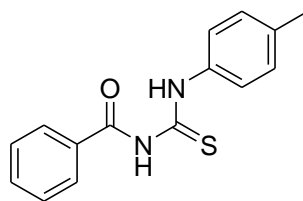
**Figura 73.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **10**.



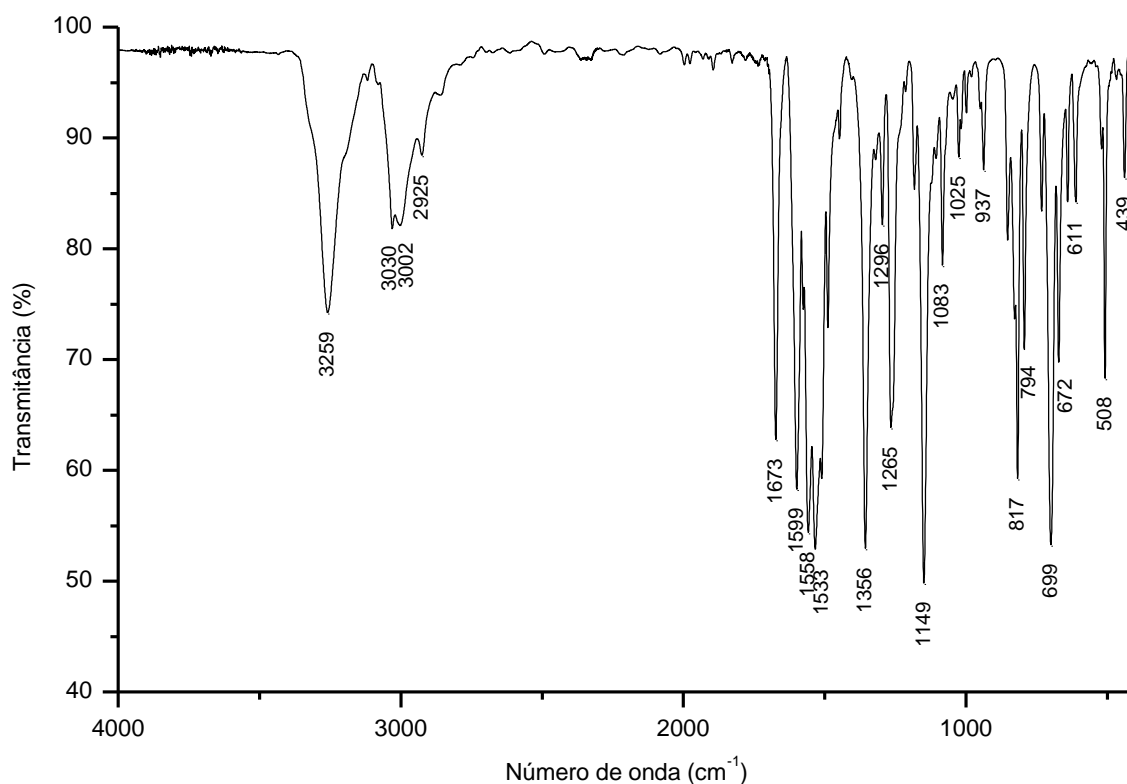
**Figura 74.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **10** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

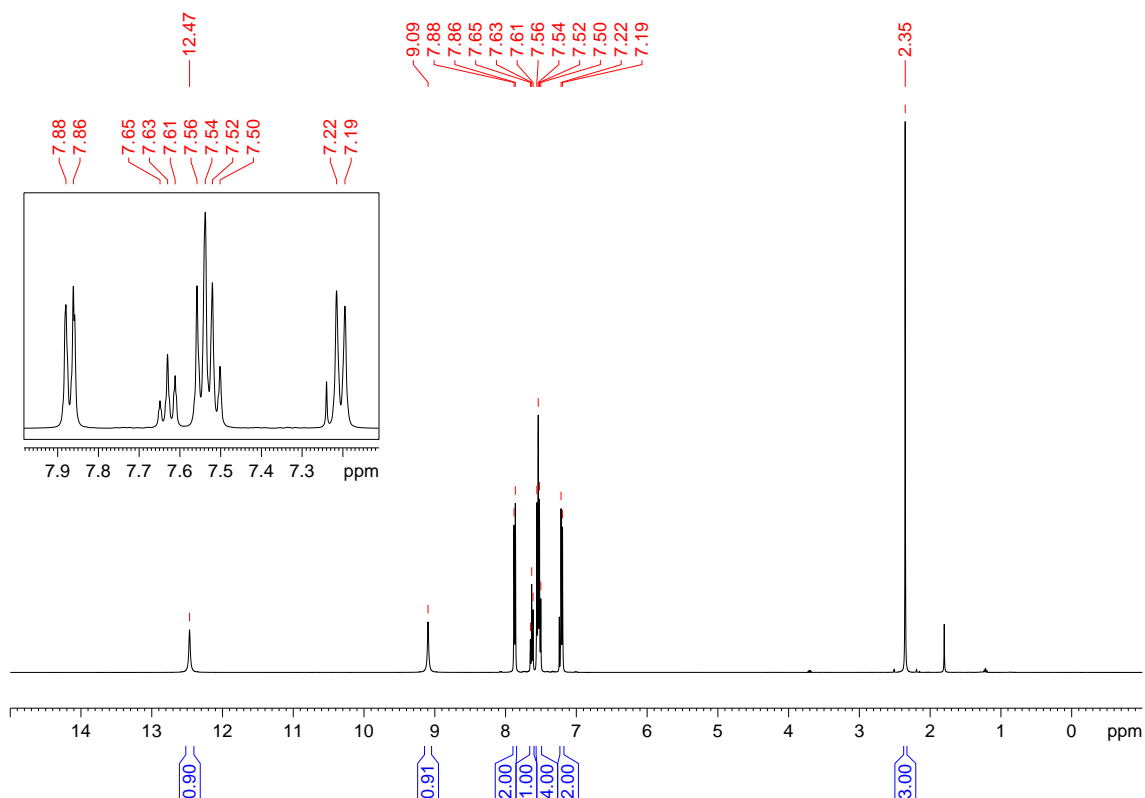


**Figura 75.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **10** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

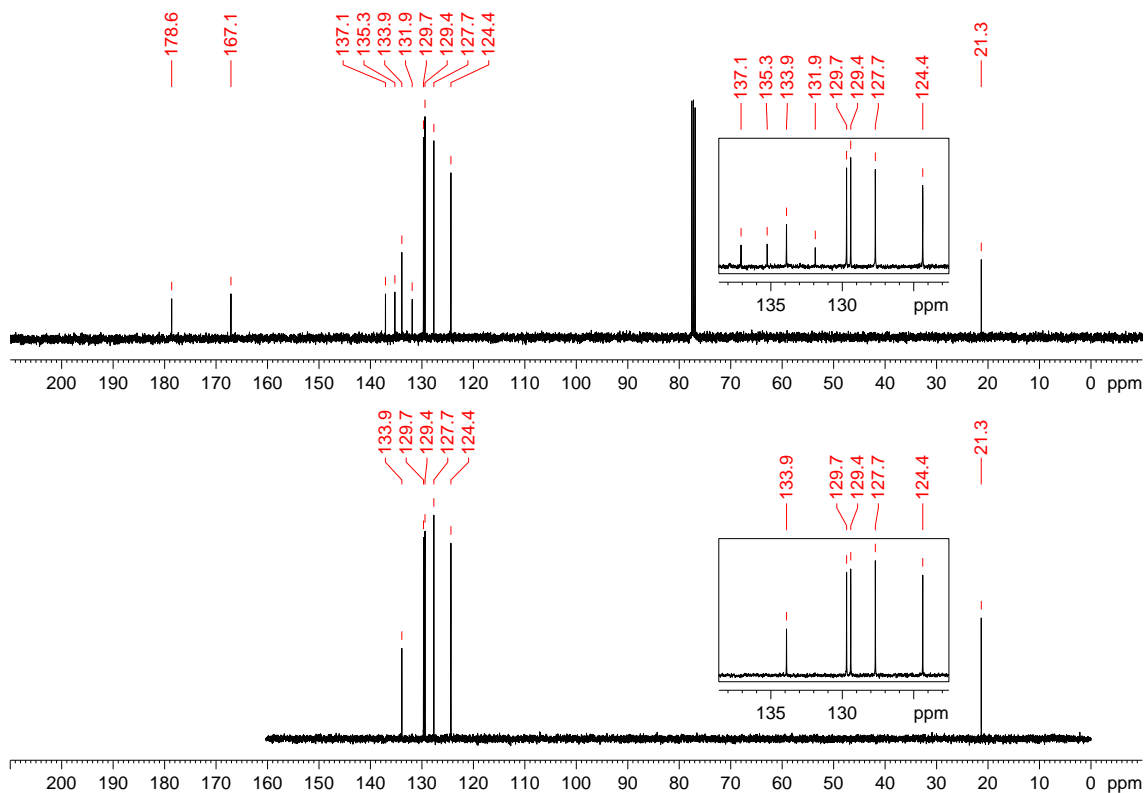
**(11) *N*-benzoil-*N'*-(4-metilfenil)-tiourea:****(11)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 94%. P.F: 155-156 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3259, 3030, 3002, 2925, 1673, 1599, 1558, 1533, 1356, 1296, 1265, 1149, 1083, 1025, 937, 817, 794, 699, 672, 611, 508, 439. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2,35 (3H, s), 7,20 (2H, d,  $^3J$  8,2 Hz), 7,49-7,57 (4H, m), 7,63 (1H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,87 (2H, d,  $^3J$  7,5 Hz), 9,09 (1H, s, largo, CONH), 12,47 (1H, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 21,3(+) ( $\text{CH}_3$ ), 124,4(+) (CH), 127,7(+) (CH), 129,4(+) (CH), 129,7(+) (CH), 131,9 (C), 133,9(+) (CH), 135,3 (C), 137,1 (C), 167,1 (C=O), 178,6 (C=S).

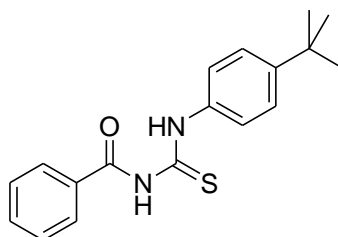
**Figura 76.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto 11.



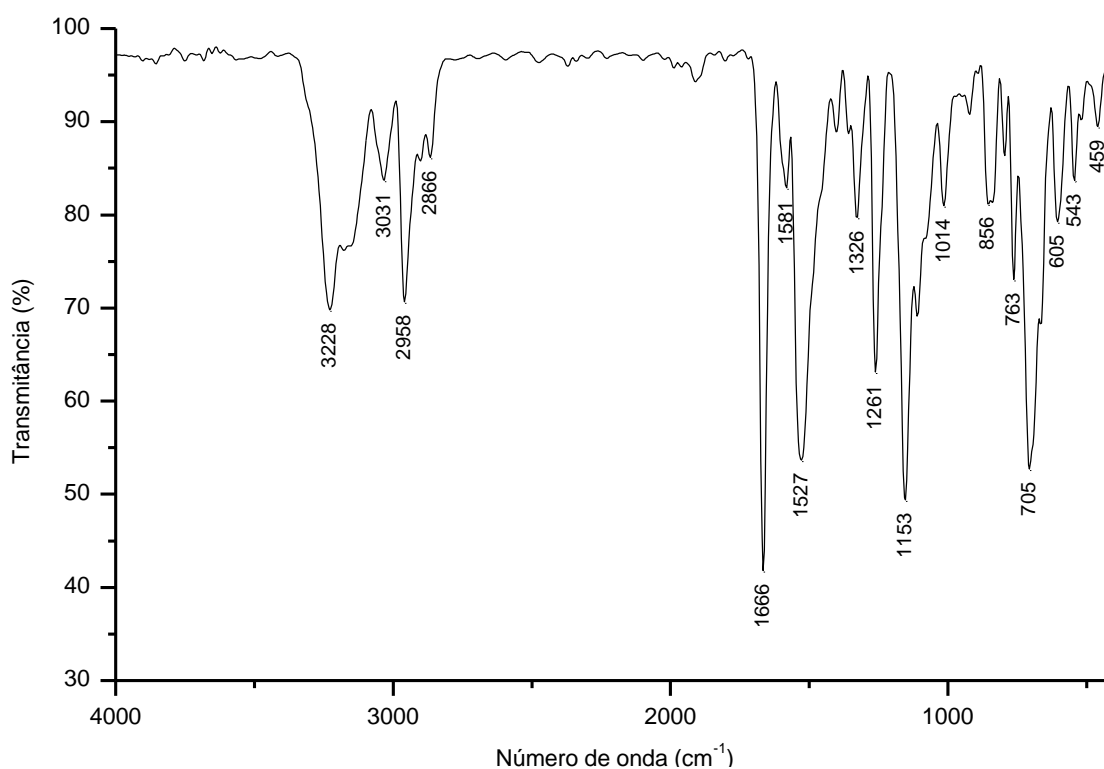
**Figura 77.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **11** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

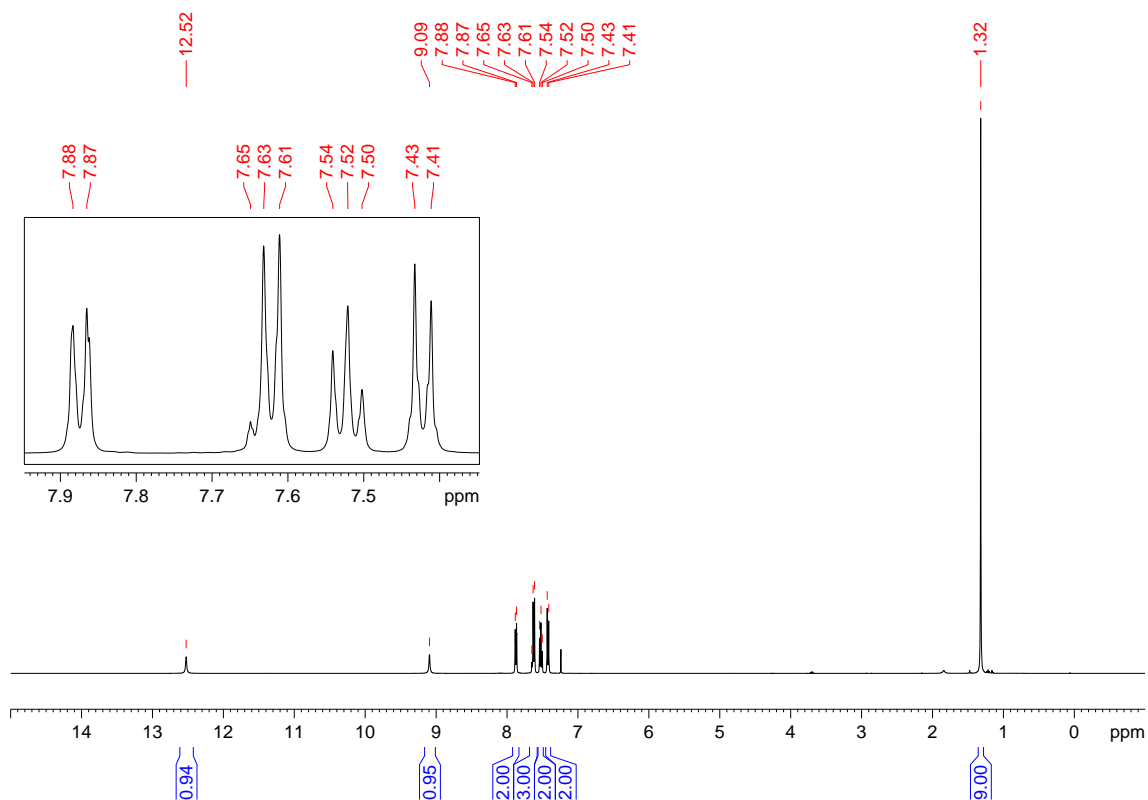


**Figura 78.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **11** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

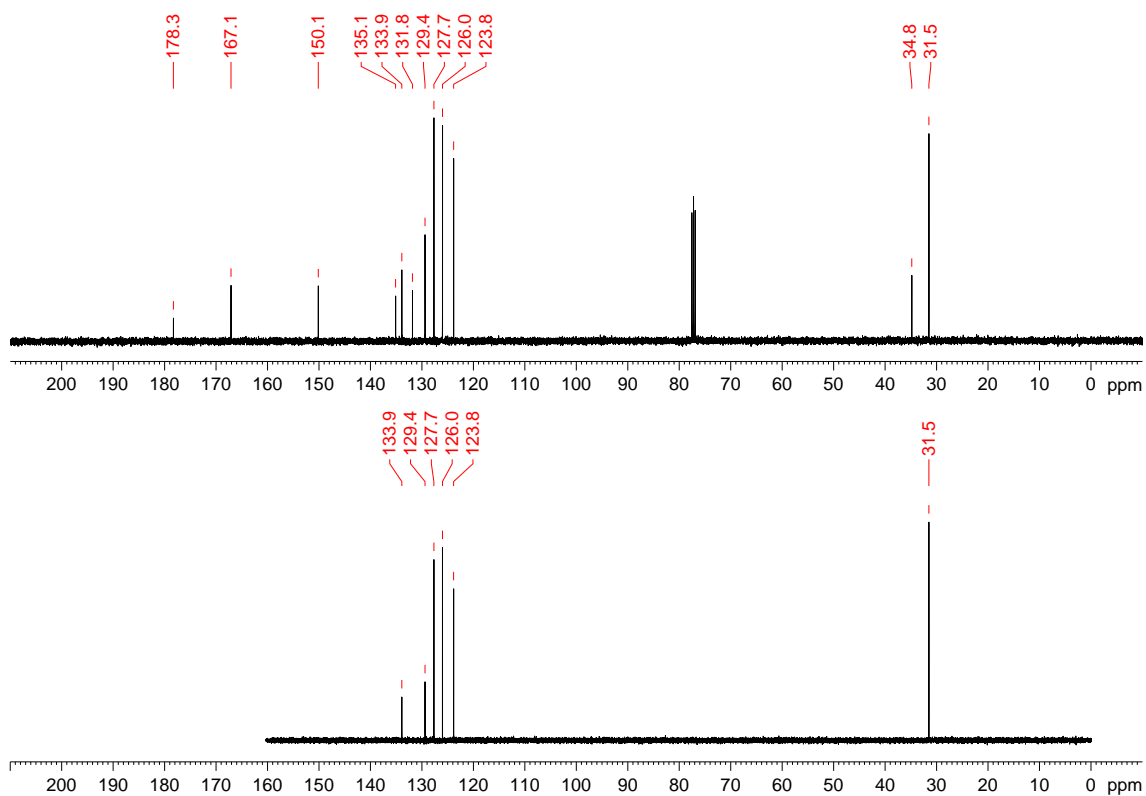
**(12) N-benzoil-N'-(4-terc-butilfenil)-tioureia:****(12)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 79%. PF: 113-114 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3228, 3031, 2958, 2866, 1666, 1581, 1527, 1326, 1261, 1153, 1014, 856, 763, 705, 605, 543, 459. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,32 (9H, s), 7,42 (2H, d,  $^3J$  8,6 Hz), 7,52 (2H, t,  $^3J$  7,7 Hz), 7,63 (3H, m), 7,87 (2H, m,  $^3J$  7,7 Hz), 9,09 (1H, s, largo, CONH), 12,52 (1H, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 31,5(+) ( $\text{CH}_3$ ), 34,8 (C), 123,8(+) (CH), 126,0(+) (CH), 127,7(+) (CH), 129,4(+) (CH), 131,8 (C), 133,9(+) (CH), 135,1 (C), 150,1 (C); 167,1 (C=O), 178,3 (C=S).

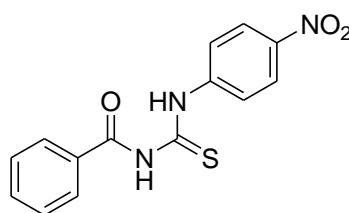
**Figura 79.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **12**.



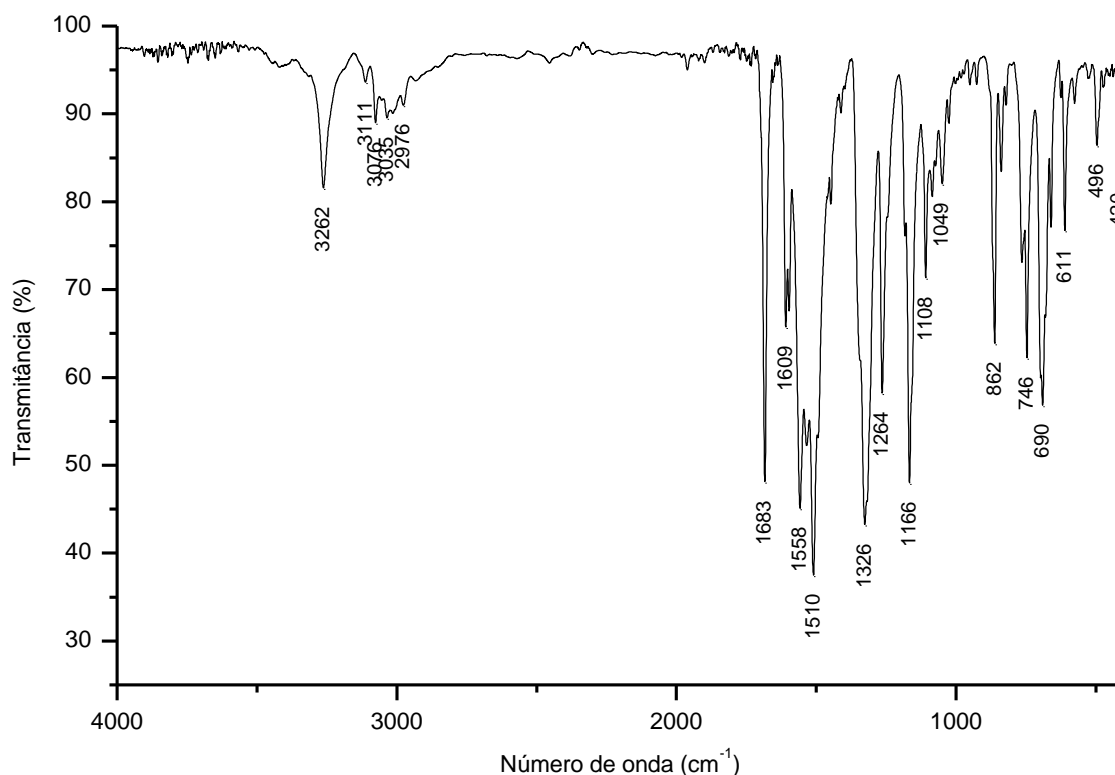
**Figura 80.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **12** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

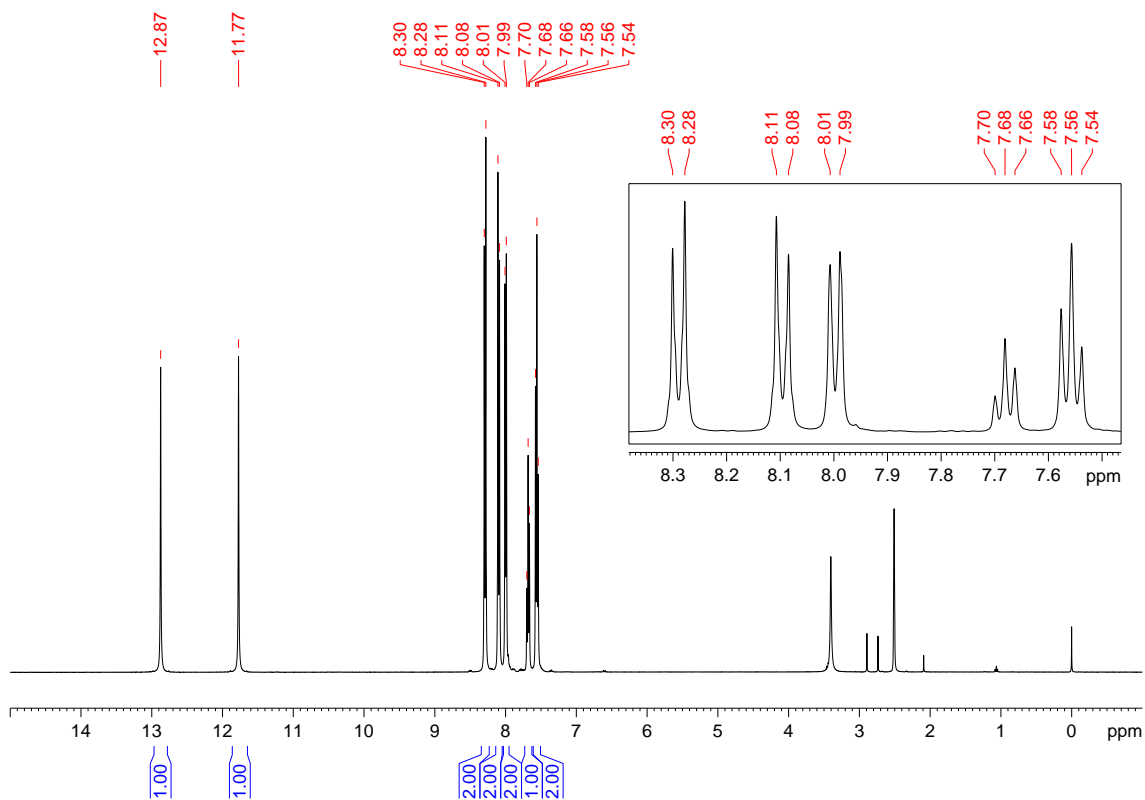


**Figura 81.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **12** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

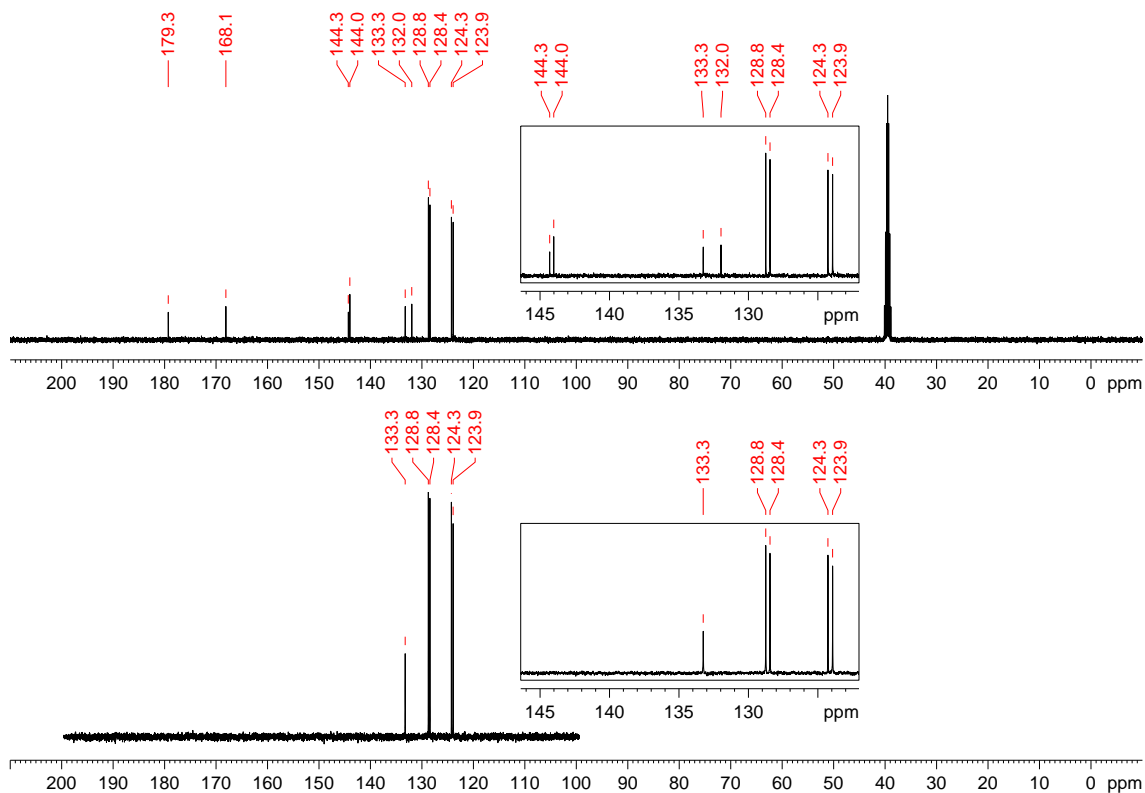
**(13) N-benzoil-N'-(4-nitrofenil)-tioureia:****(13)**

Recristalizado em etanol/DMF com rendimento de 93%. PF: 178-179 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3262, 3111, 3076, 3035, 2976, 1683, 1609, 1558, 1510, 1326, 1264, 1166, 1108, 1049, 862, 746, 690, 611, 496, 420; RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7,56 (2H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,68 (1H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 8,00 (2H, d,  $^3J$  7,5 Hz), 8,09 (2H, d,  $^3J$  8,1 Hz), 8,29 (2H, d,  $^3J$  8,1 Hz), 11,77 (1H, s, largo, CONH); 12,87 (1H, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 123,9(+) (CH), 124,3(+) (CH), 128,4(+) (CH), 128,8(+) (CH), 132,0 (C), 133,3(+) (CH), 144,0 (C), 144,3 (C), 168,1 (C=O), 179,3 (C=S).

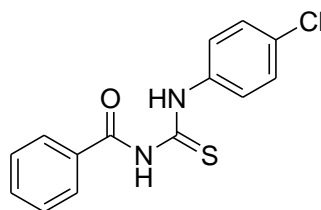
**Figura 82.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto 13.



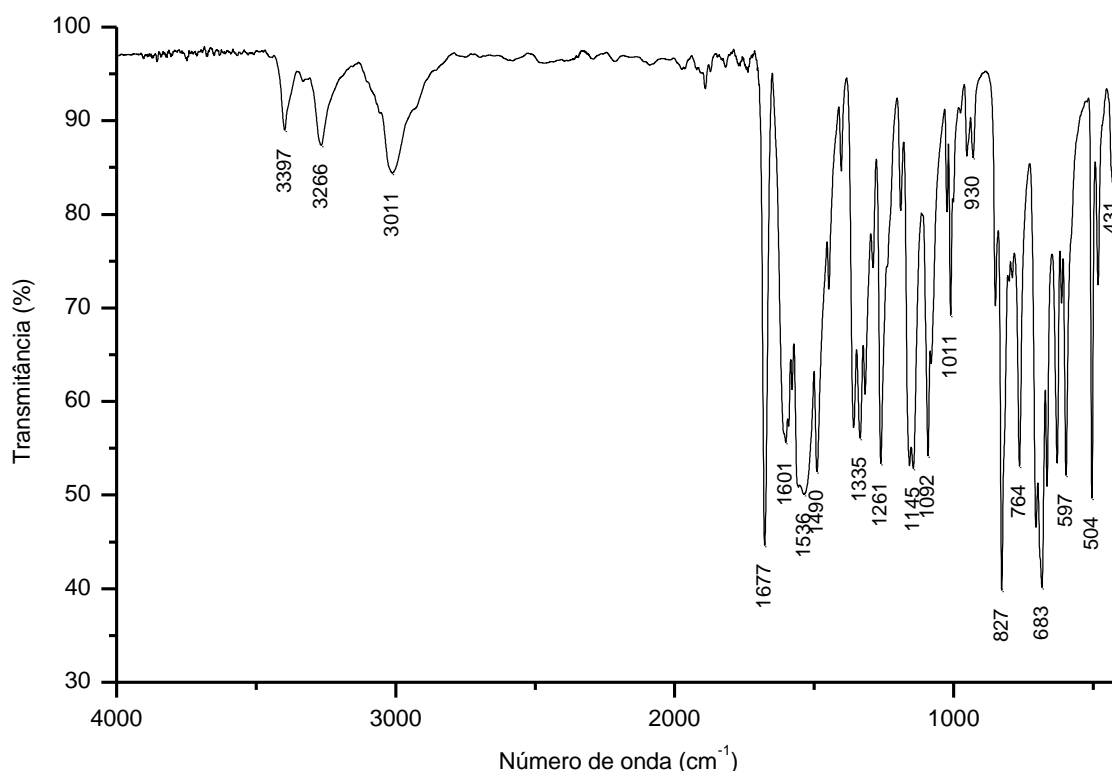
**Figura 83.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **13** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

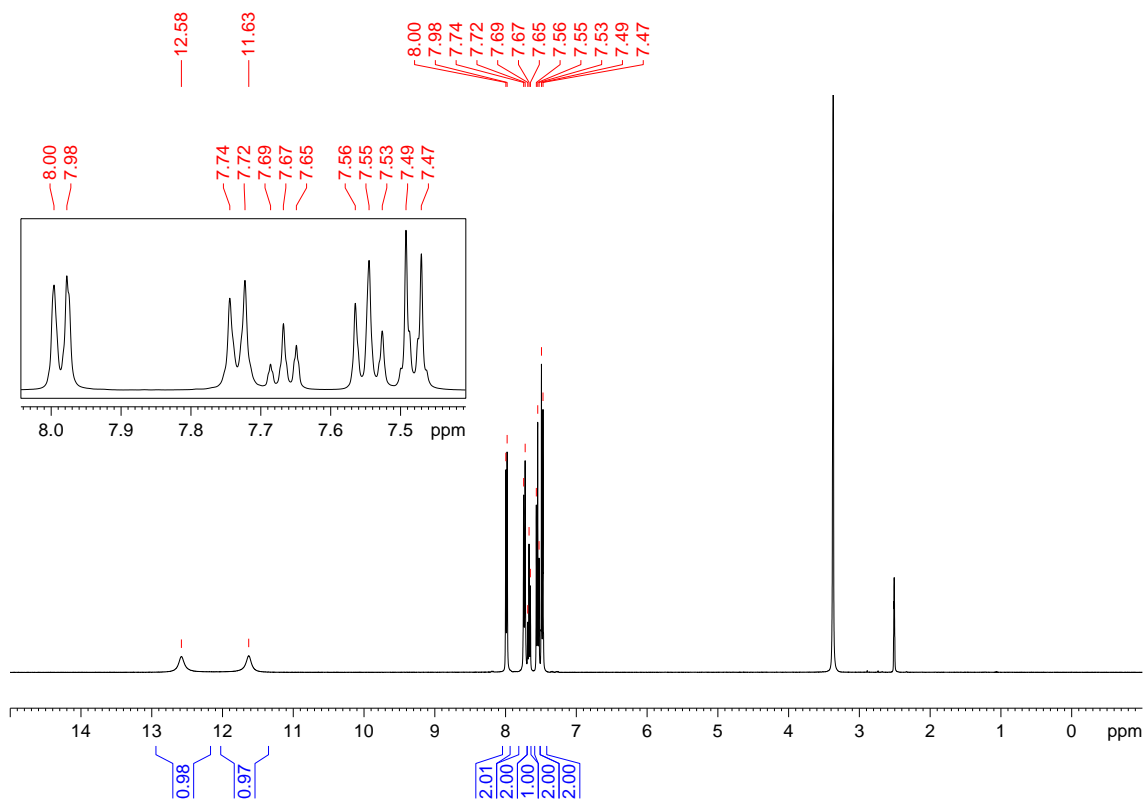


**Figura 84.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **13** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

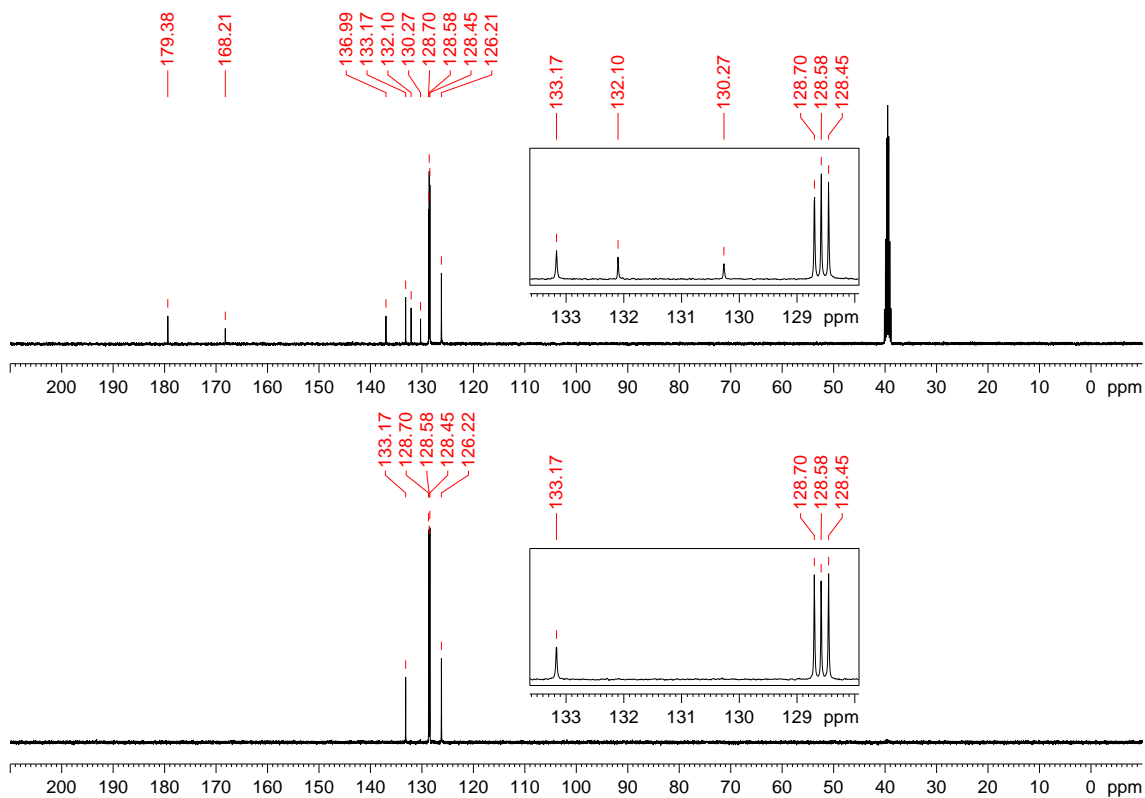
**(14) N-benzoil-N'-(4-clorofenil)-tioureia:****(14)**

Recristalizado em etanol/diclorometano/DMF com rendimento de 97%. PF: 135-136 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3397, 3266, 3011, 1677, 1601, 1536, 1490, 1335, 1261, 1145, 1092, 1011, 930, 827, 764, 683, 597, 504, 431; RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7,48 (2H, d,  $^3J$  8,7 Hz), 7,55 (2H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,67 (1H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,73 (2H, d,  $^3J$  8,7 Hz), 7,99 (2H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 11,63 (1NH, s, largo, CONH), 12,58 (1NH, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 126,2(+) (CH), 128,4(+) (CH), 128,6(+) (CH), 128,7(+) (CH), 130,3 (C), 132,1 (C), 133,2(+) (CH), 137,0 (C), 168,2 (C=O), 179,4 (C=S).

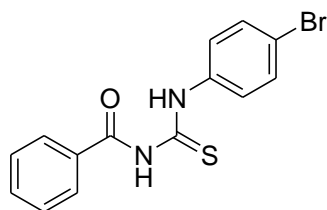
**Figura 85.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **14**.



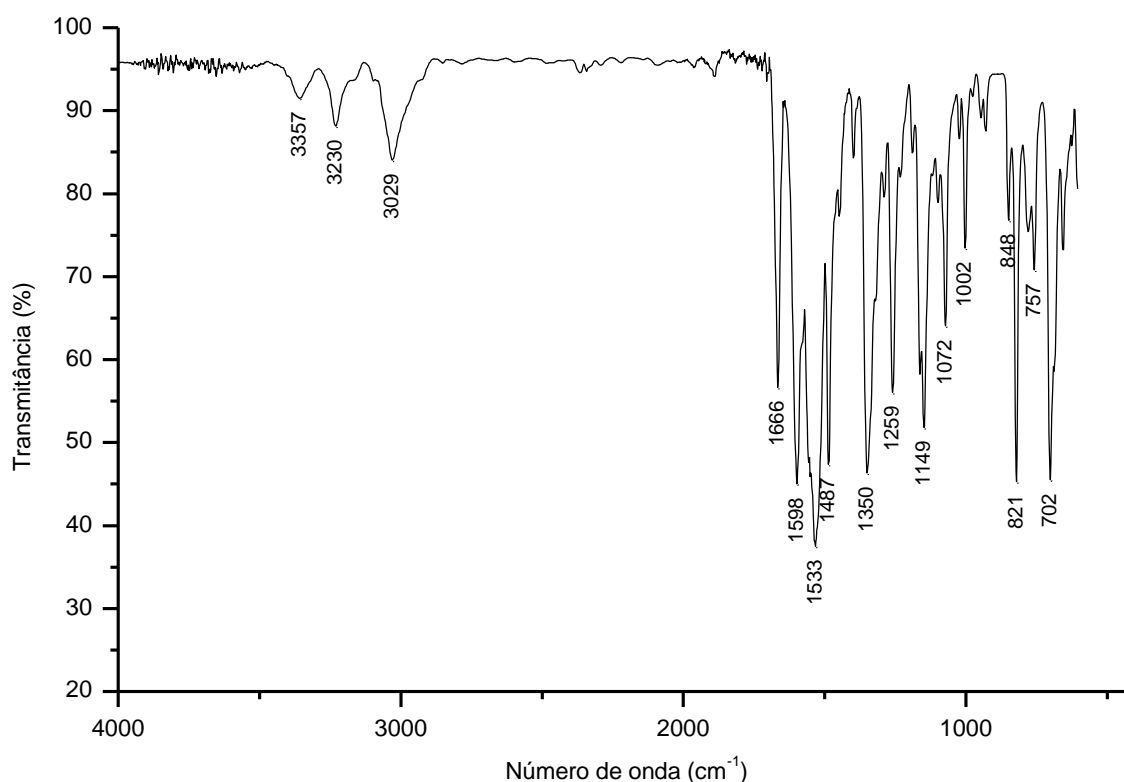
**Figura 86.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **14** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

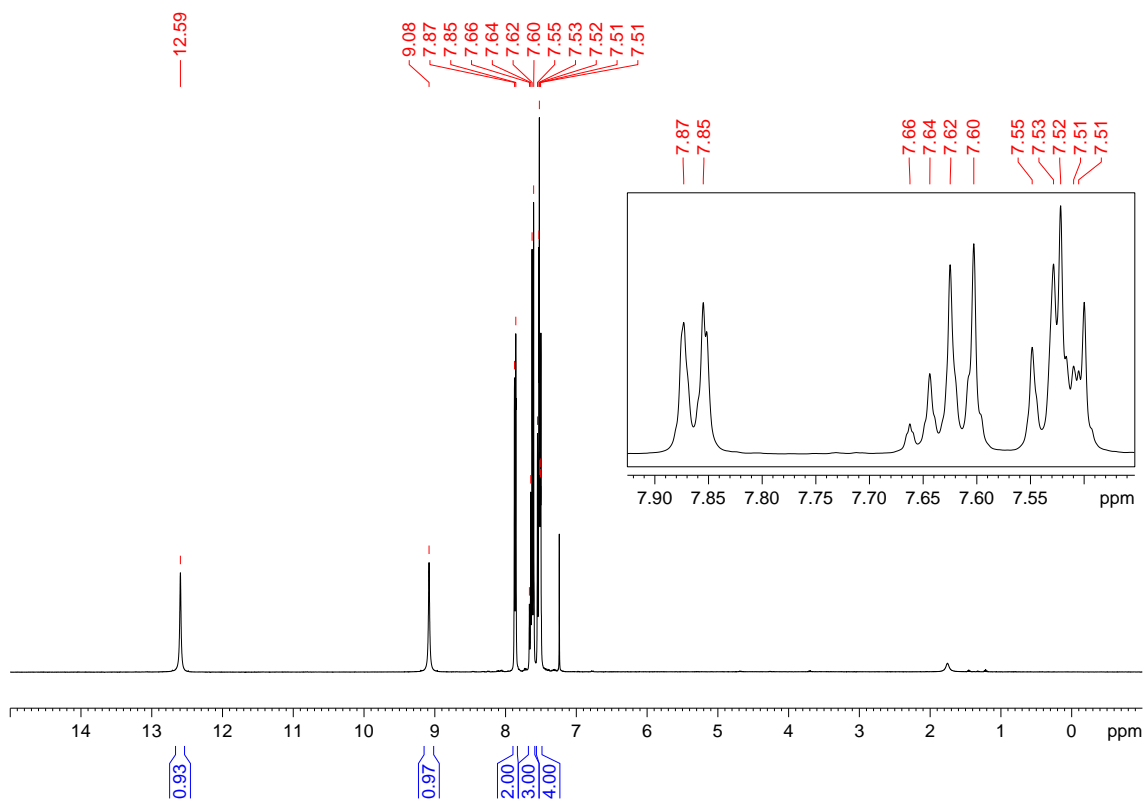


**Figura 87.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **14** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

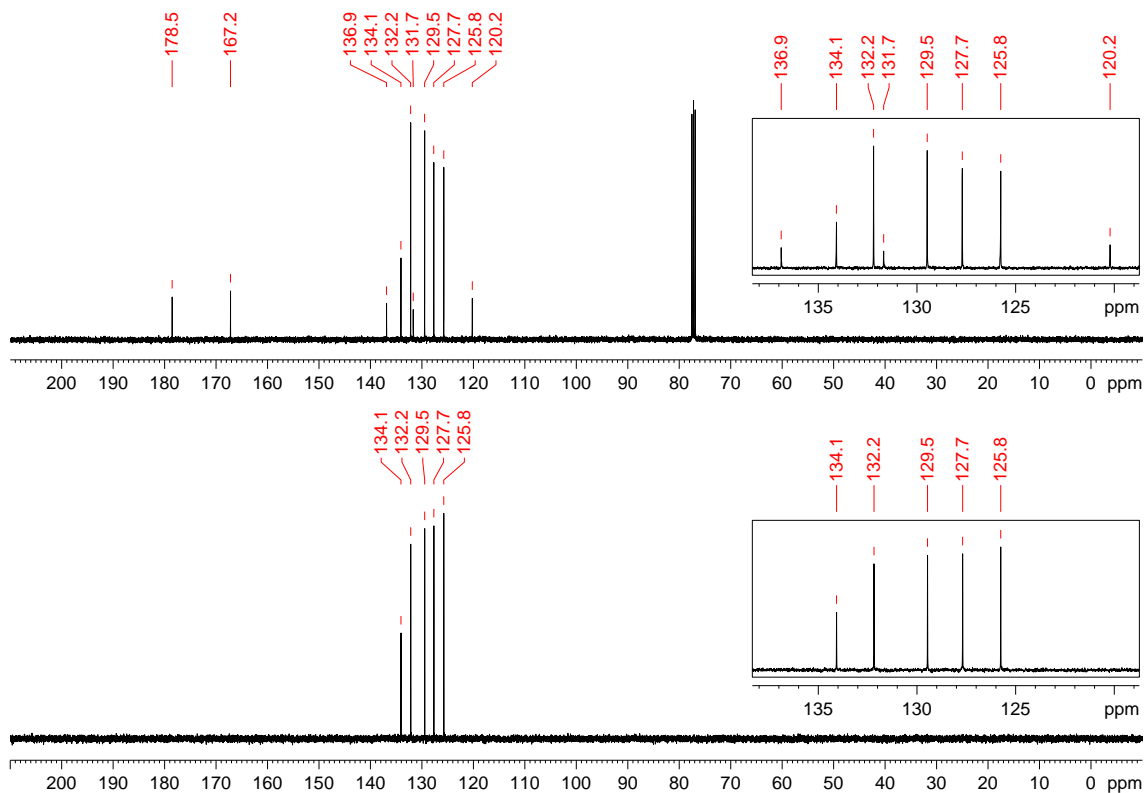
**(15) N-benzoil-N'-(4-bromofenil)-tiourea:****(15)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 85%. PF: 142-144 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3357, 3230, 3029, 1666, 1598, 1533, 1487, 1350, 1259, 1149, 1072, 1002, 848, 821, 757, 702. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,50-7,56 (4H, m), 7,59-7,67 (3H, m), 7,86 (2H, d,  $^3J$  7,6 Hz), 9,08 (1H, s, largo, CONH), 12,59 (1H, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 120,2 (C), 125,8(+) (CH), 127,7(+) (CH), 129,5(+) (CH), 131,7 (C), 132,2(+) (CH), 134,1(+) (CH), 136,9 (C), 167,2 (C=O), 178,5 (C=S).

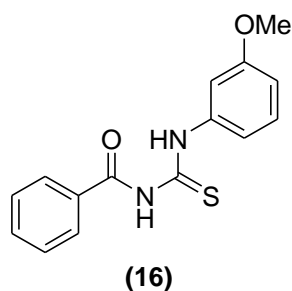
**Figura 88.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **15**.



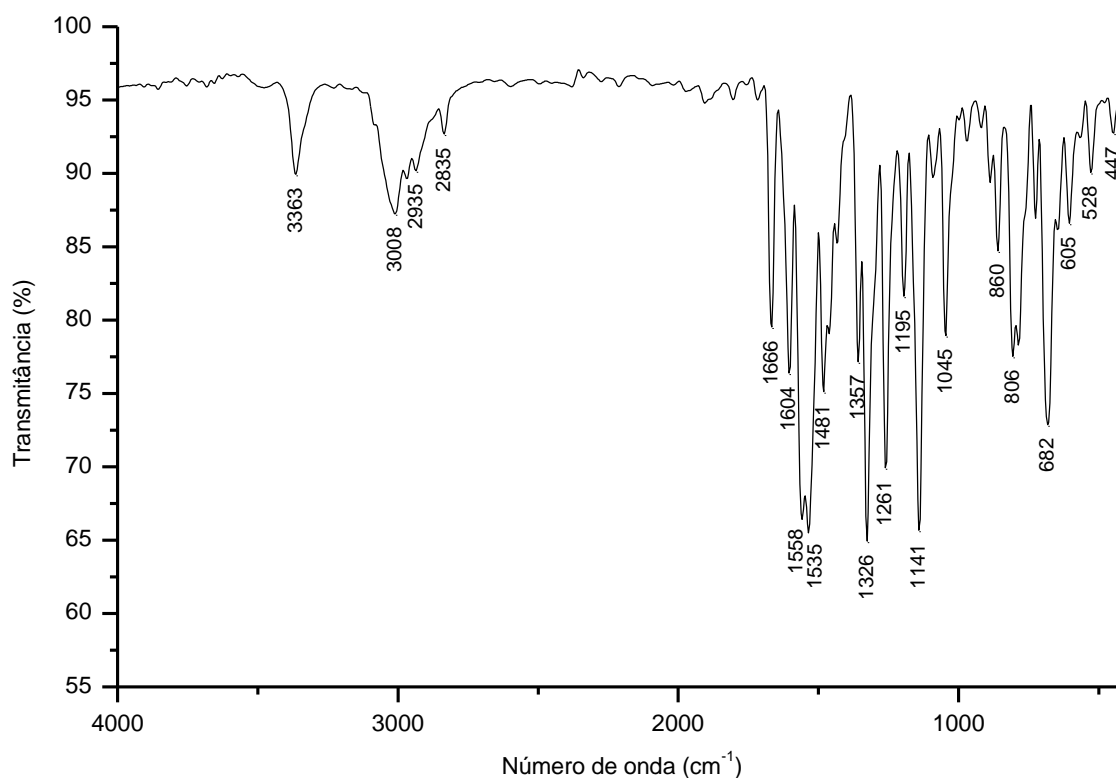
**Figura 89.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **15** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).



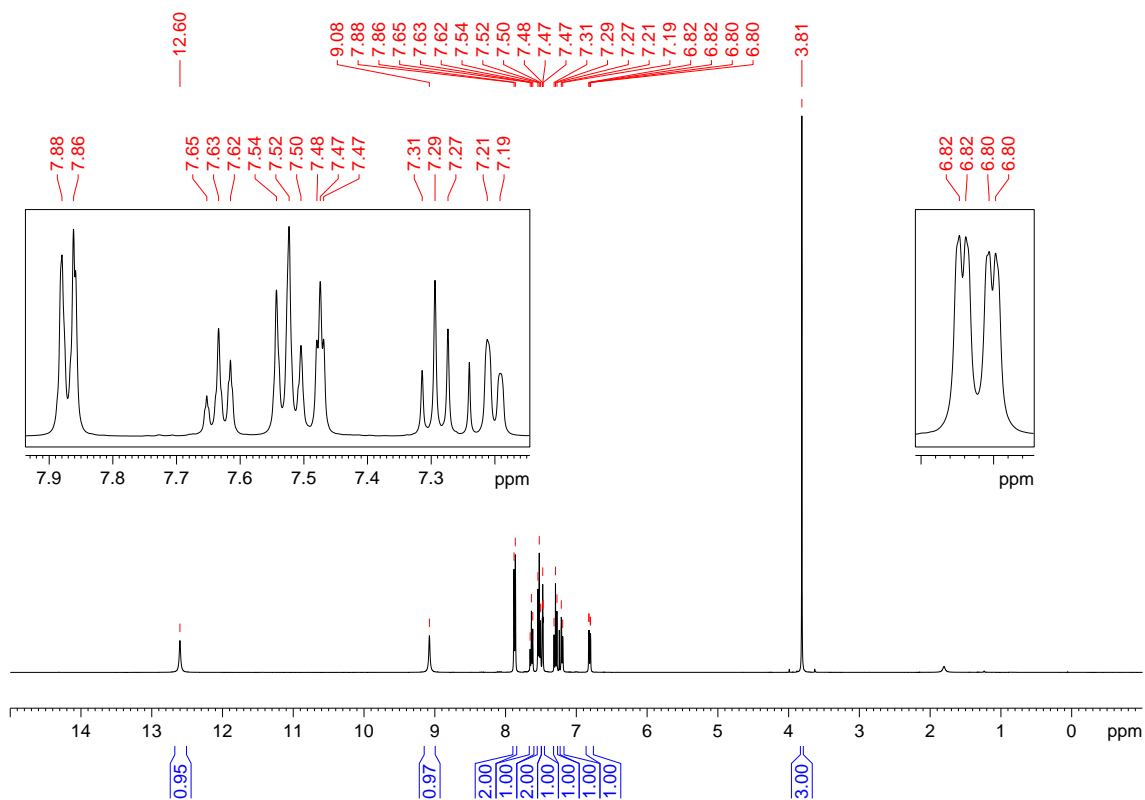
**Figura 90.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **15** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

**(16) N-benzoil-N'-(3-metoxifenil)-tiourea:**

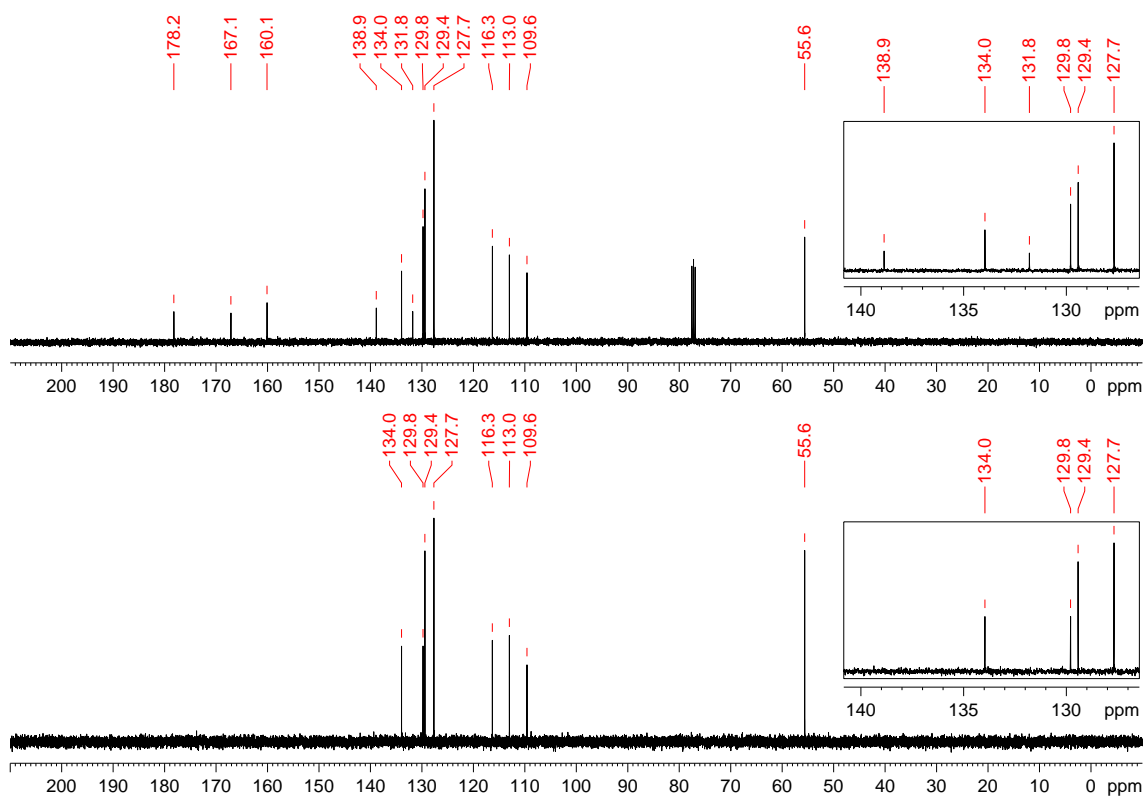
Recristalizado em etanol com rendimento de 87%. P.F: 105 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3363, 308, 2935, 2835, 1666, 1604, 1558, 1535, 1481, 1357, 1326, 1261, 1195, 1141, 1045, 860, 806, 682, 605, 528, 447. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3,81 (3H, s), 6,81 (1H, dd,  $^3J$  8,3 Hz,  $^4J$  2,5 Hz), 7,20 (1H, d,  $^3J$  8,1 Hz), 7,29 (1H, t,  $^3J$  8,1 Hz), 7,47 (1H, t,  $^4J$  2,4 Hz), 7,52 (2H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,63 (1H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,87 (2H, m,  $^3J$  7,5 Hz), 9,08 (1H, s, largo, CONH), 12,60 (1H, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 55,6 (+) ( $\text{CH}_3$ ), 109,6(+) (CH), 113,0(+) (CH), 116,3(+) (CH), 127,7(+) (CH), 129,4(+) (CH), 129,8(+) (CH), 131,8 (C), 134,0(+) (CH), 138,9 (C), 160,1 (C); 167,1 (C=O), 178,2 (C=S).



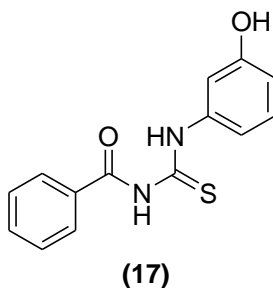
**Figura 91.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **16**.



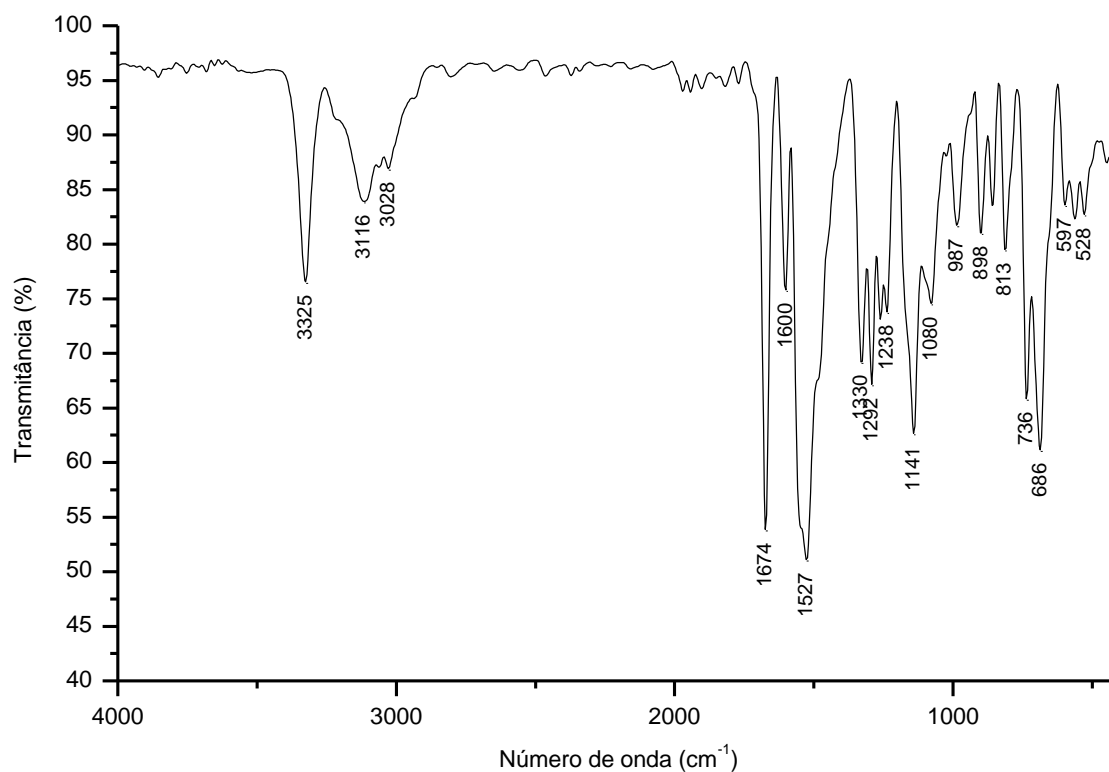
**Figura 92.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **16** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).



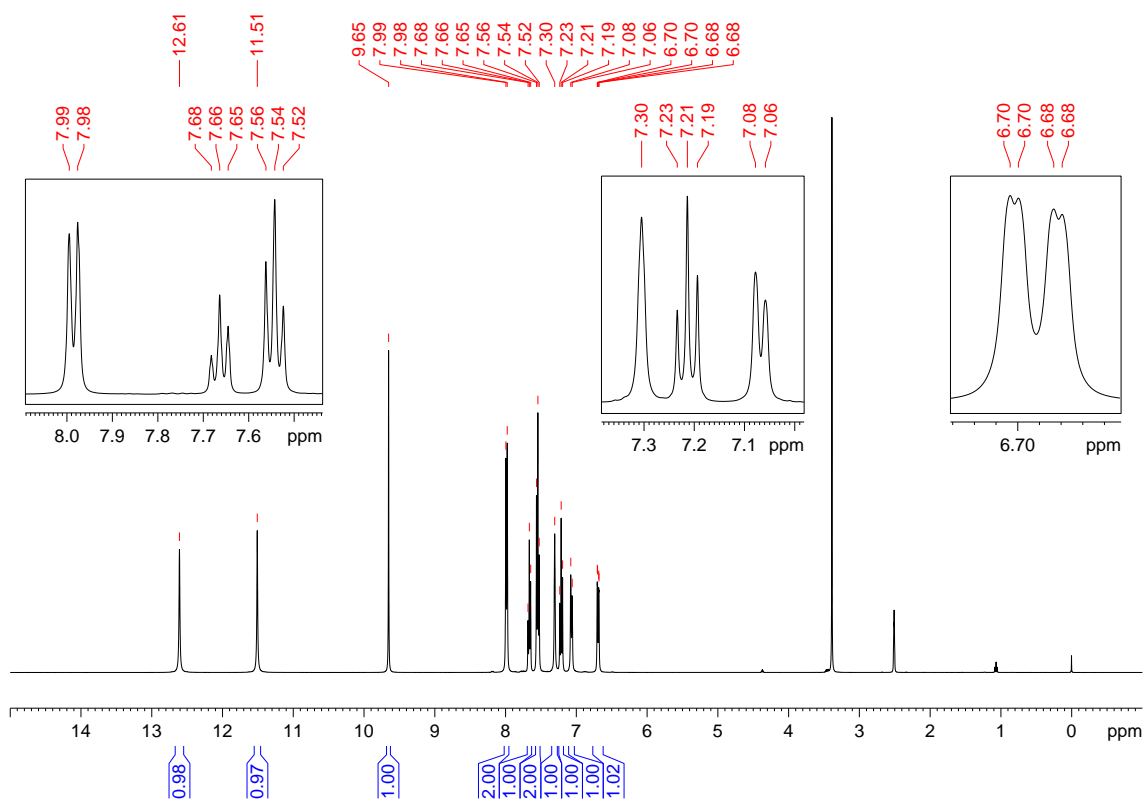
**Figura 93.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **16** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

**(17) N-benzoil-N'-(3-hidroxifenil)-tiourea:**

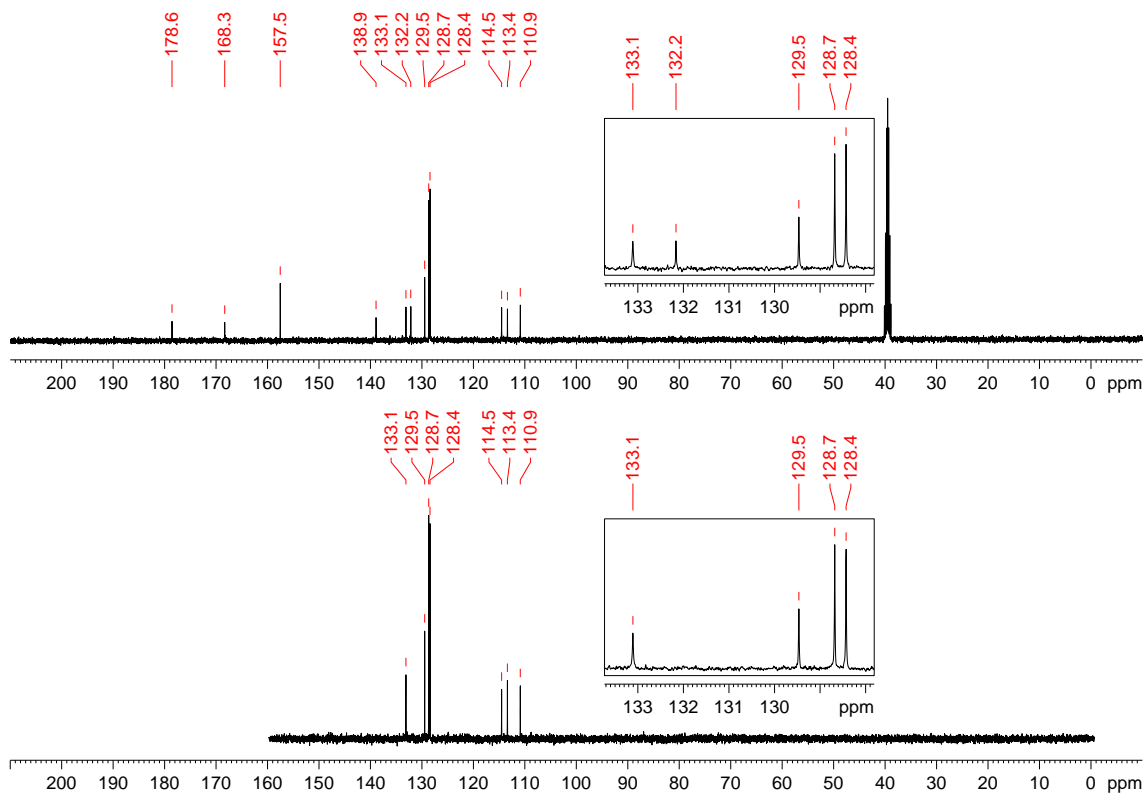
Recristalizado em etanol com rendimento de 70%. PF: 184 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3325, 3116, 3028, 1674, 1600, 1527, 1330, 1292, 1238, 1141, 1080, 987, 898, 813, 736, 686, 597, 528. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 6,69 (1H, dd,  $^3J$  8,1 Hz,  $^4J$  1,8 Hz), 7,07 (1H, d,  $^3J$  8,1 Hz), 7,21 (1H, t,  $^3J$  8,0 Hz), 7,30 (1H, s), 7,54 (2H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,66 (1H, t,  $^3J$  7,6 Hz), 7,99 (2H, d,  $^3J$  7,5 Hz), 9,65 (1H, s, OH), 11,51 (1H, s, largo, CONH), 12,61 (1NH, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 110,9(+) (CH), 113,4(+) (CH), 114,5(+) (CH), 128,4(+) (CH), 128,7(+) (CH), 129,5(+) (CH), 132,2 (C), 133,1(+) (CH), 138,9 (C), 157,5 (C), 168,3 (C=O), 178,6 (C=S).



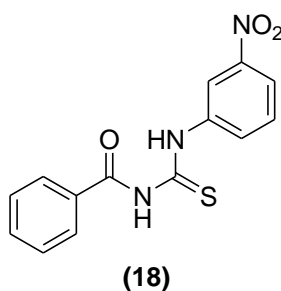
**Figura 94.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **17**.



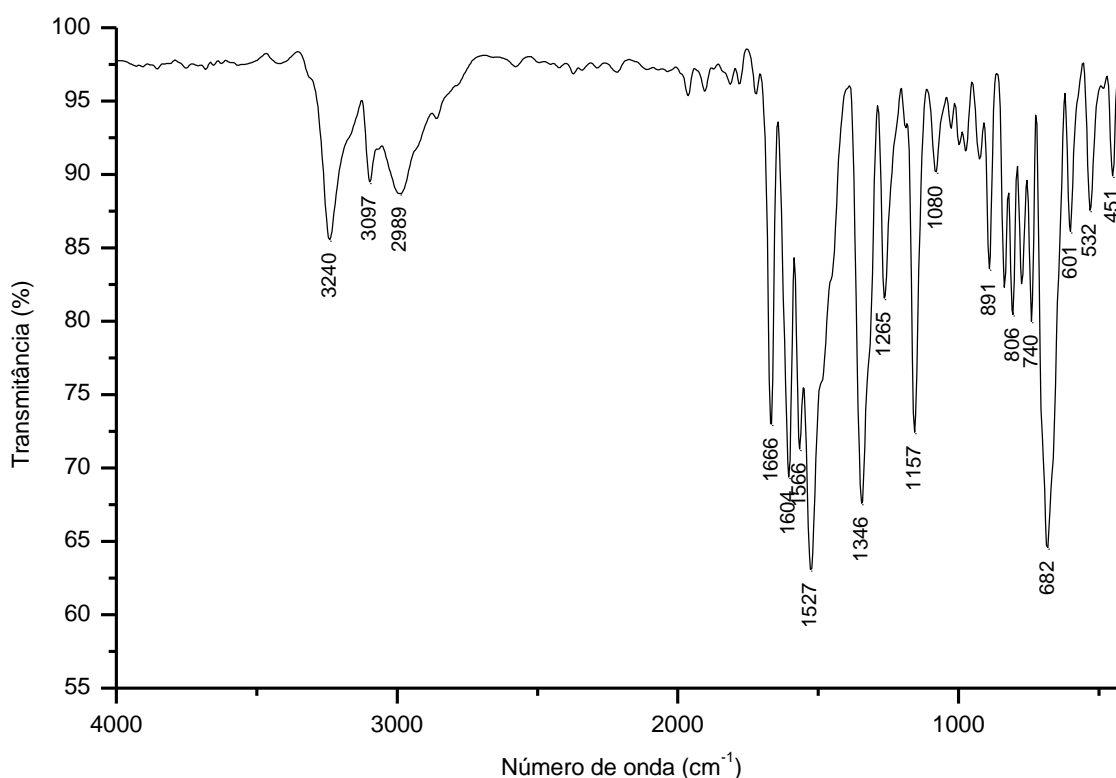
**Figura 95.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **17** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



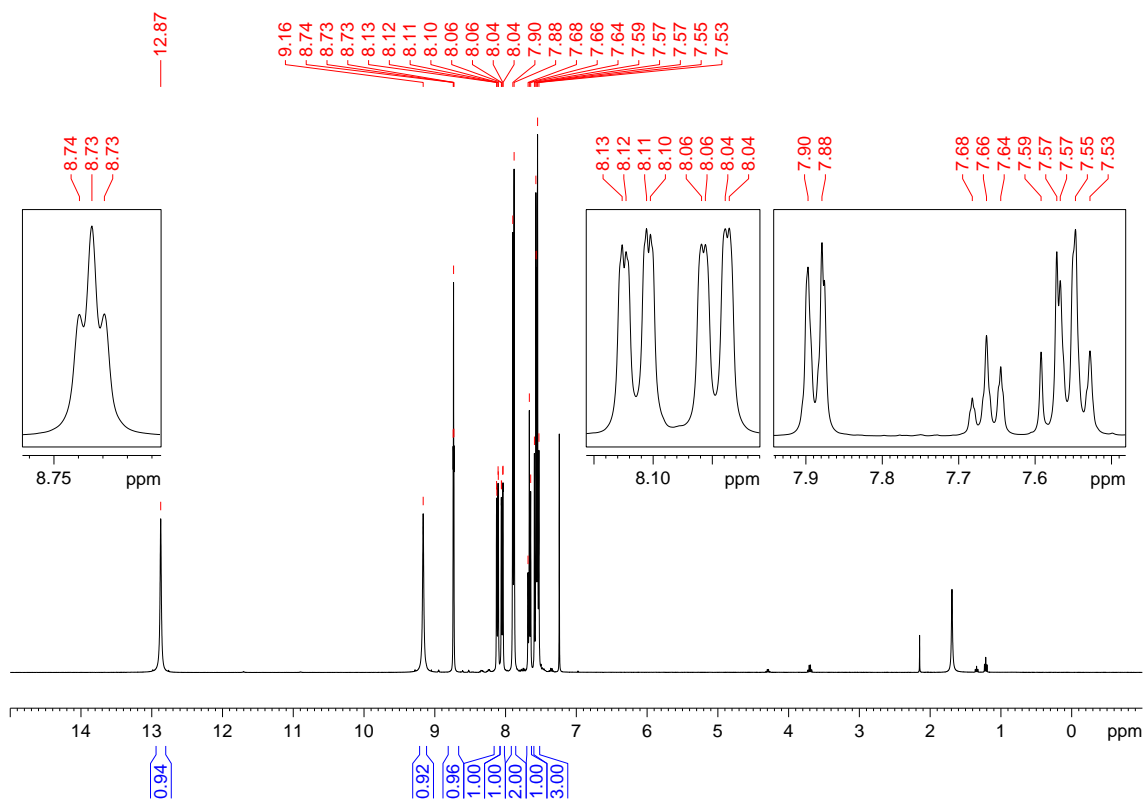
**Figura 96.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **17** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

**(18) N-benzoil-N'-(3-nitrofenil)-tioureia:**

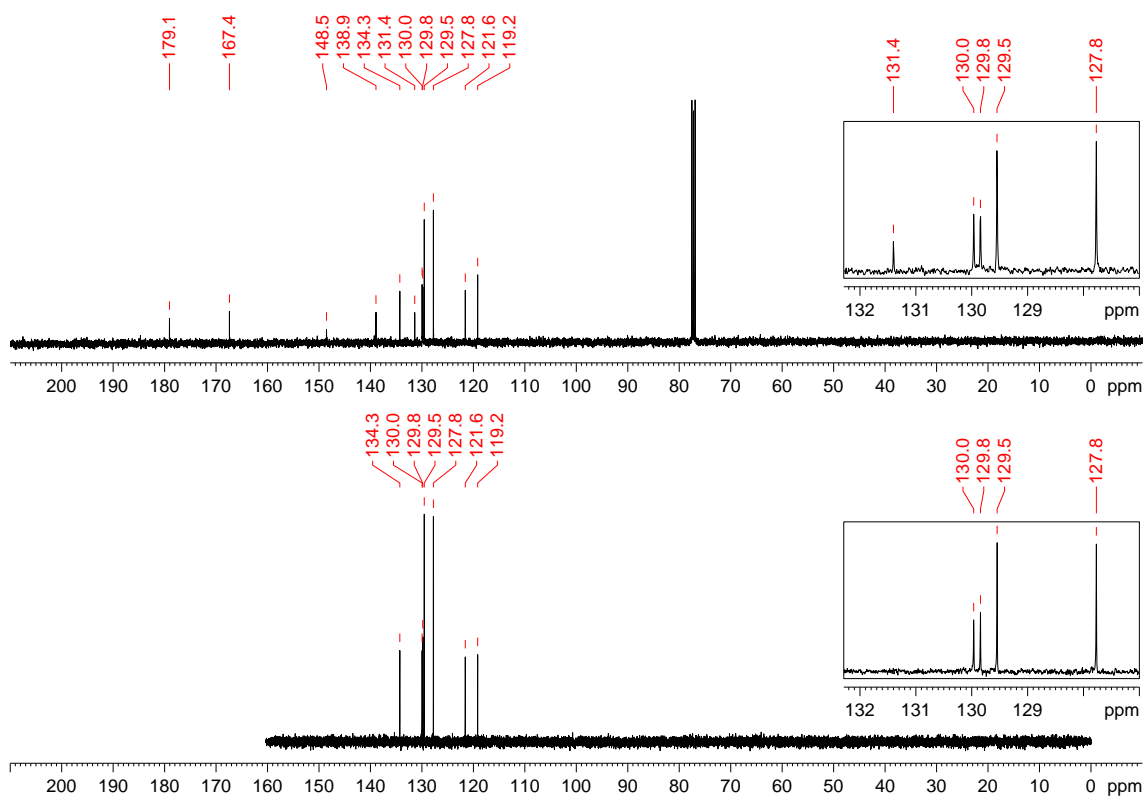
Recristalizado em etanol/acetona com rendimento de 89%. PF: 158 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3240, 3097, 2989, 1666, 1604, 1566, 1527, 1346, 1265, 1157, 1080, 891, 806, 740, 682, 601, 532, 451. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,52-7,60 (3H, m), 7,66 (1H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,89 (2H, d,  $^3J$  7,5 Hz), 8,05 (1H, dd,  $^3J$  8,1 Hz,  $^4J$  2,2 Hz), 8,11 (1H, dd,  $^3J$  8,2 Hz,  $^4J$  2,2 Hz), 8,73 (1H, t,  $^4J$  2,2 Hz), 9,16 (1H, s, largo, CONH), 12,87 (1H, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 119,2(+) (CH), 121,6(+) (CH), 127,8(+) (CH), 129,5(+) (CH), 129,8(+) (CH), 130,0(+) (CH), 131,4 (C), 134,3(+) (CH), 138,9 (C), 148,5 (C), 167,4 (C=O), 179,1 (C=S).



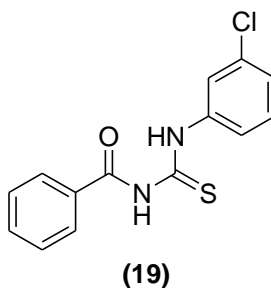
**Figura 97.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **18**.



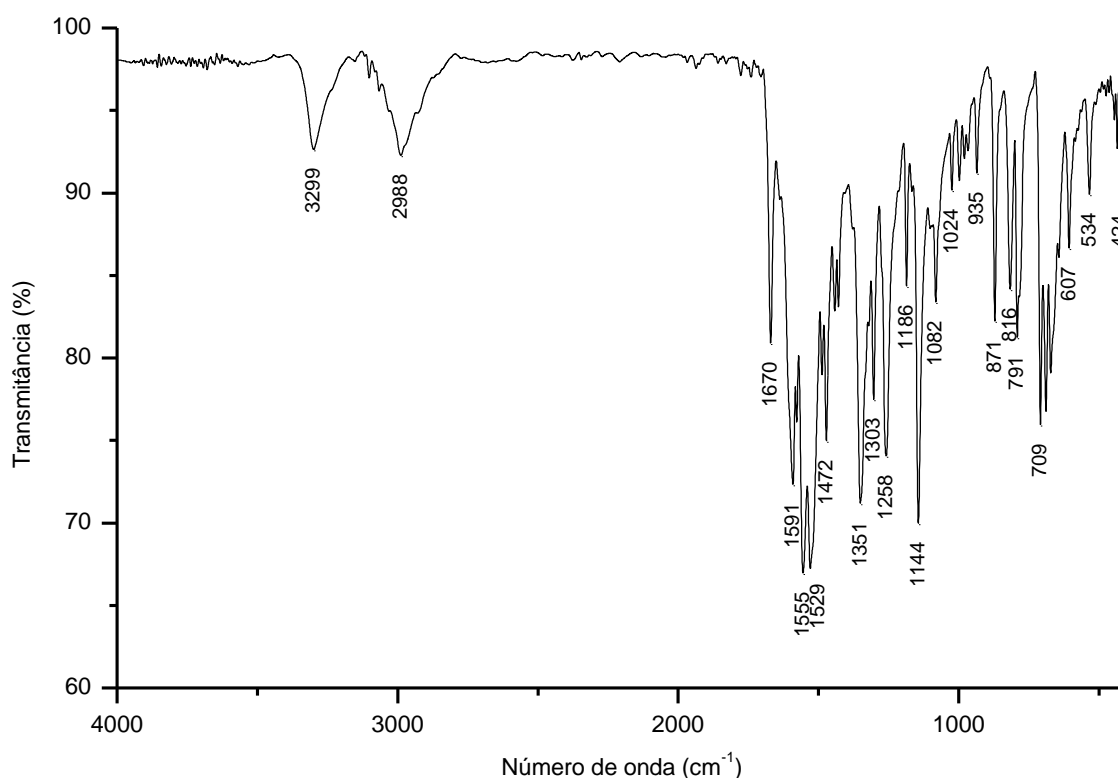
**Figura 98.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **18** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 99.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **18** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

**(19) N-benzoil-N'-(3-clorofenil)-tioureia:**

Recristalizado em etanol com rendimento de 99%. PF: 125 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3299, 2988, 1670, 1591, 1555, 1529, 1472, 1351, 1303, 1258, 1144, 1082, 1024, 935, 871, 816, 791, 709, 607, 534, 424; RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,21-7,25 (1H, m), 7,32 (1H, t,  $^3J$  8,1 Hz), 7,50-7,59 (3H, m), 7,64 (1H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,82-7,89 (3H, m), 9,11 (1H, s, largo, CONH), 12,64 (1H, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 122,3(+) (CH), 124,2(+) (CH), 127,1(+) (CH), 127,7(+) (CH), 129,5(+) (CH), 130,0 (+) (CH), 131,6 (C), 134,1(+) (CH), 134,6 (C), 138,9 (C), 167,2 (C=O), 178,6 (C=S).



**Figura 100.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **19**.

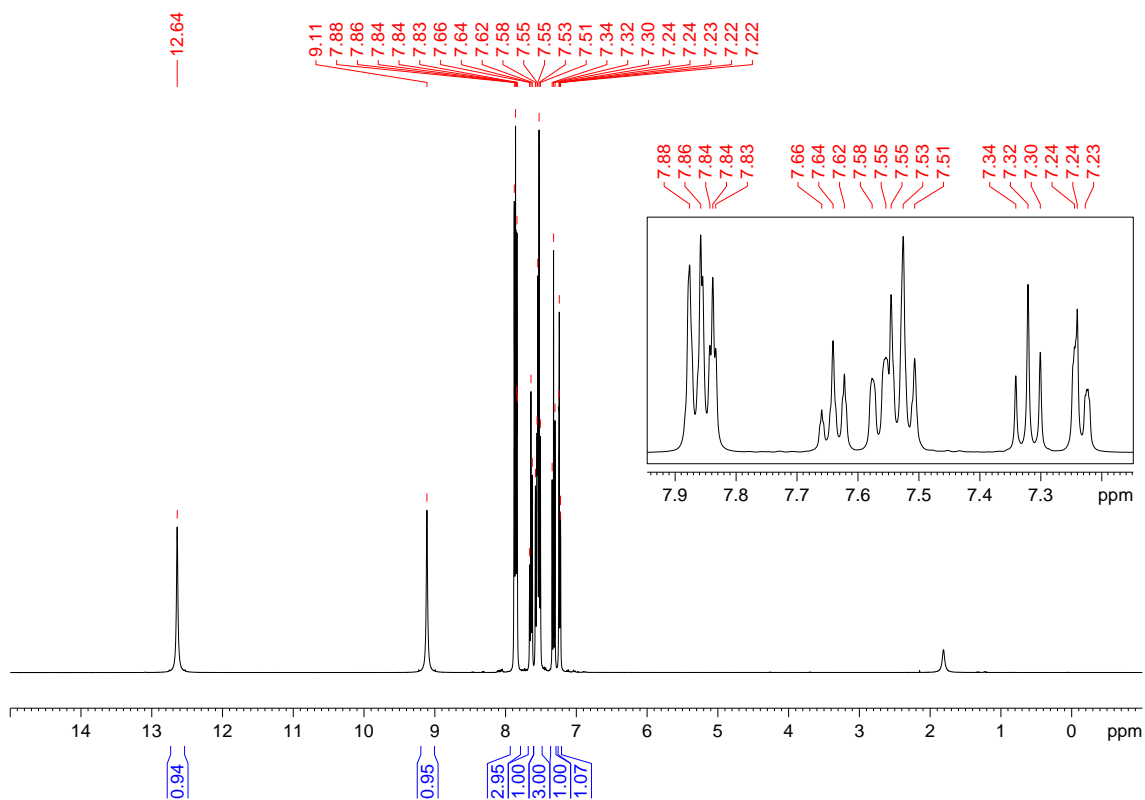


Figura 101. Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **19** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

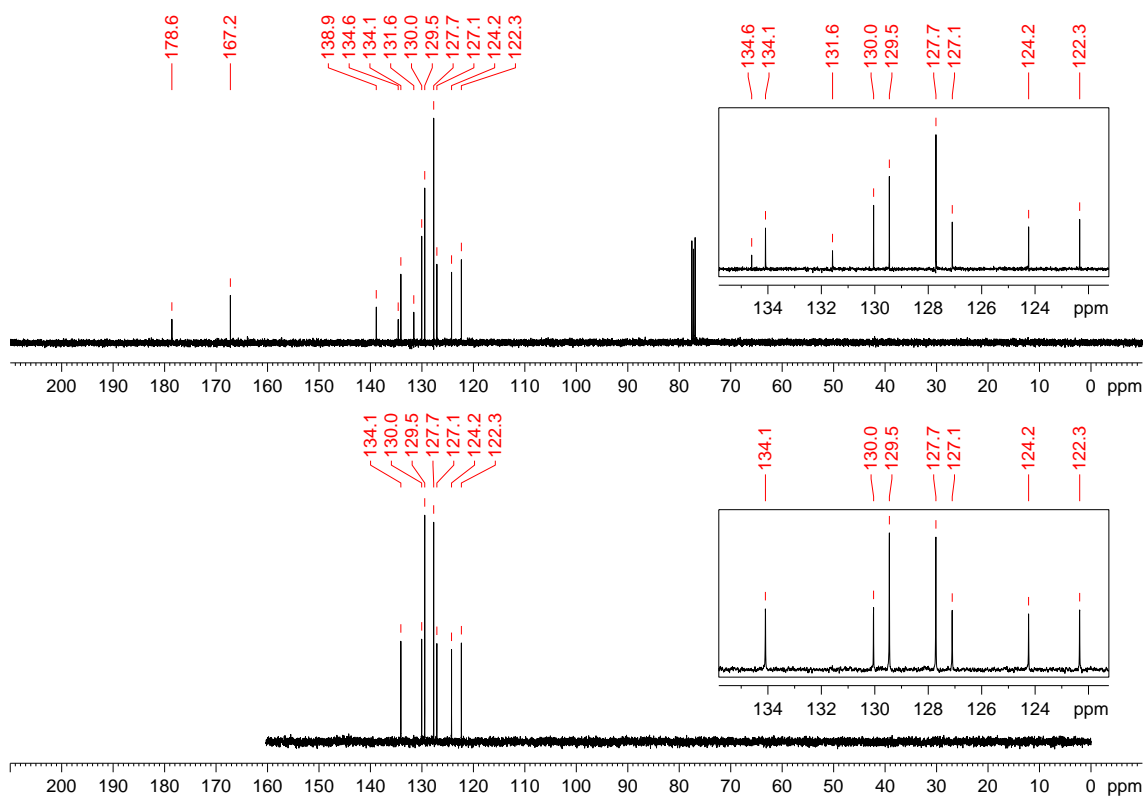
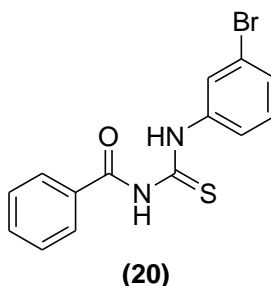
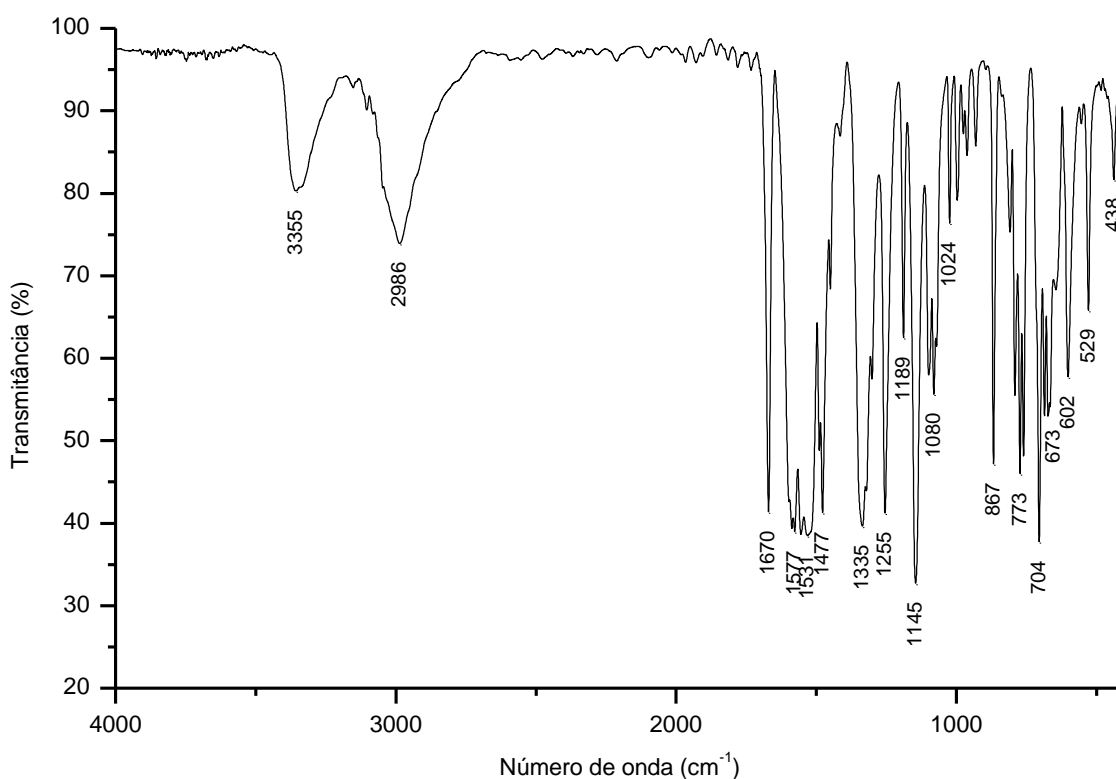


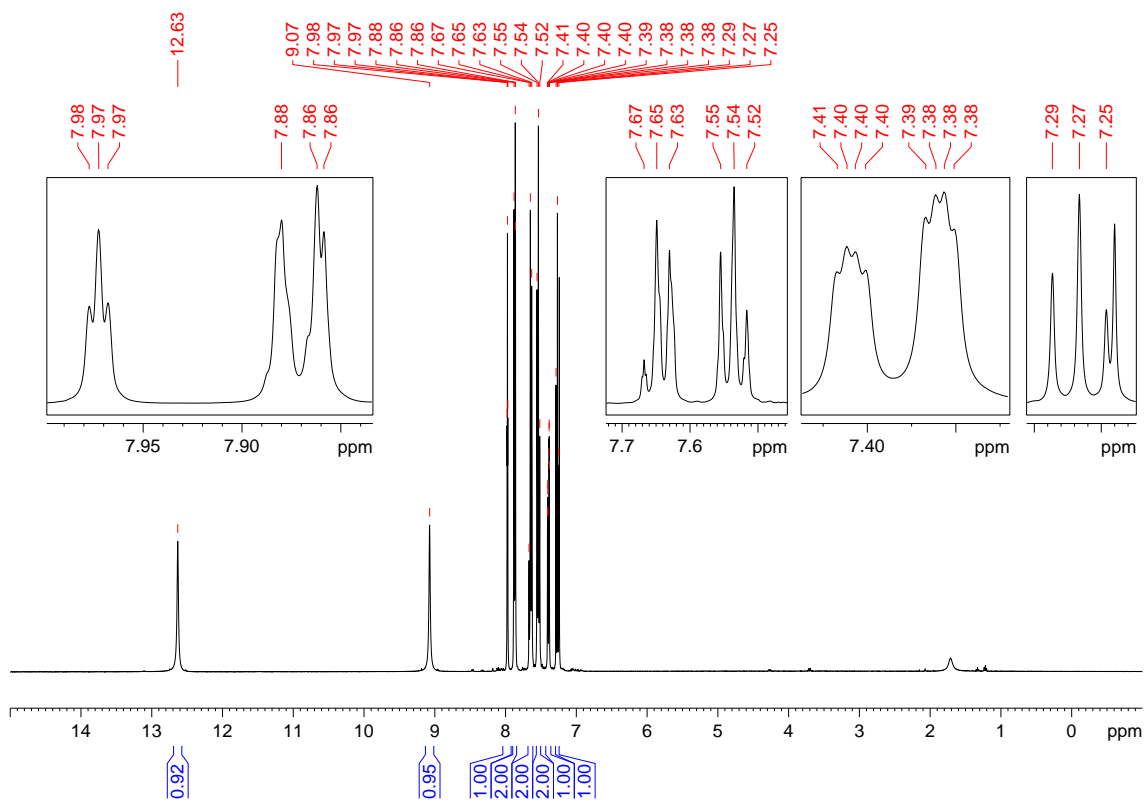
Figura 102. Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **19** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

**(20) N-benzoil-N'-(3-bromofenil)-tiourea:**

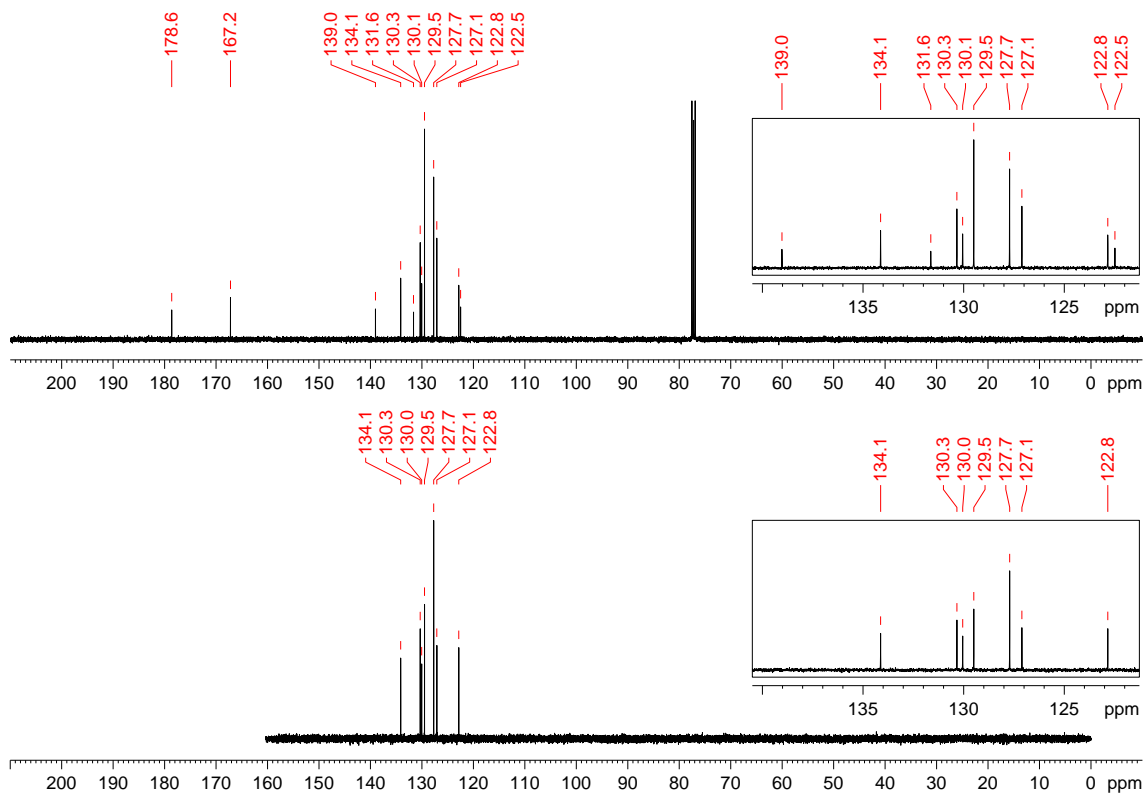
Recristalizado em etanol com rendimento de 85%. PF: 129 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3355, 2986, 1670, 1577, 1531, 1477, 1335, 1255, 1189, 1145, 1080, 1024, 867, 773, 704, 673, 602, 529, 438. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,27 (1H, t,  $^3J$  8,0 Hz), 7,40 (1H, ddd,  $^3J$  8,0 Hz,  $^4J$  2,0 Hz,  $^4J$  1,0 Hz), 7,54 (2H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,62-7,68 (2H, m), 7,85-7,89 (2H, m), 7,97 (1H, t,  $^4J$  2,0 Hz), 9,07 (1H, s, largo, CONH), 12,63 (1H, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 122,5 (C), 122,8 (+) (CH), 127,1 (+) (CH), 127,7 (+) (CH), 129,5 (+) (CH), 130,1 (+) (CH), 130,3 (+) (CH), 131,6 (C), 134,1 (+) (CH), 139,0 (C), 167,2 (C=O), 178,6 (C=S).



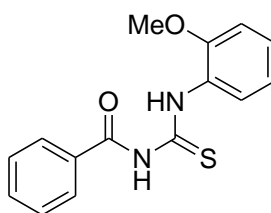
**Figura 103.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **20**.



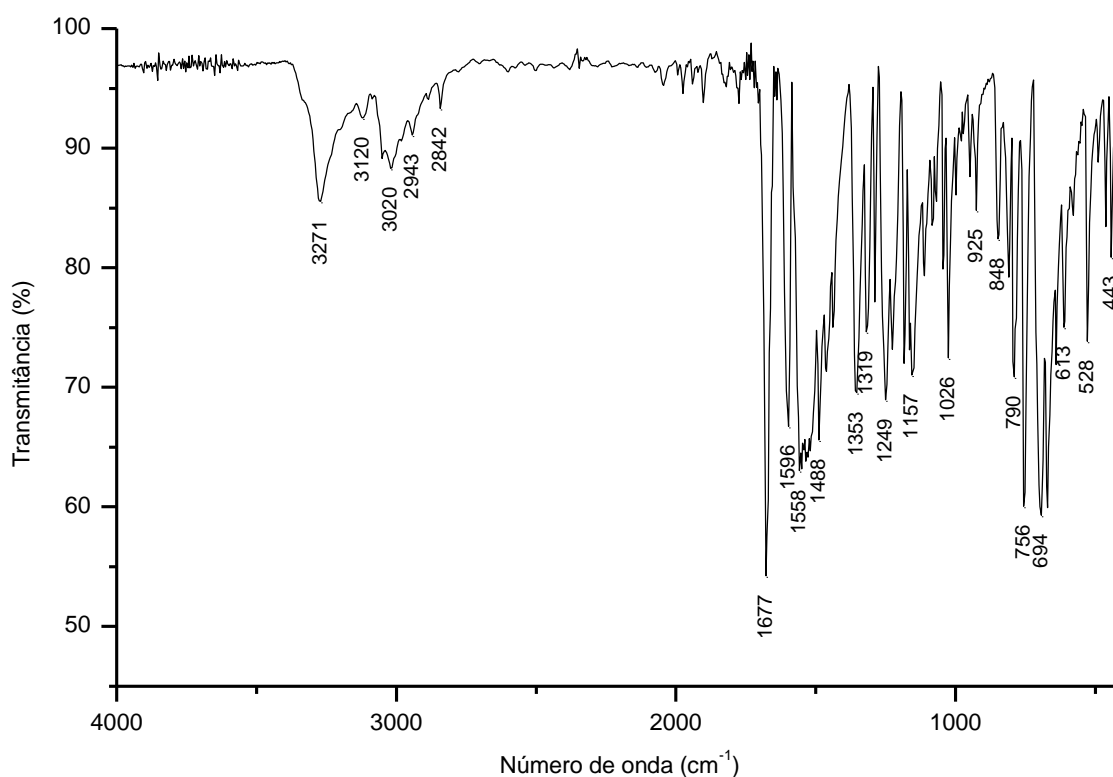
**Figura 104.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **20** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

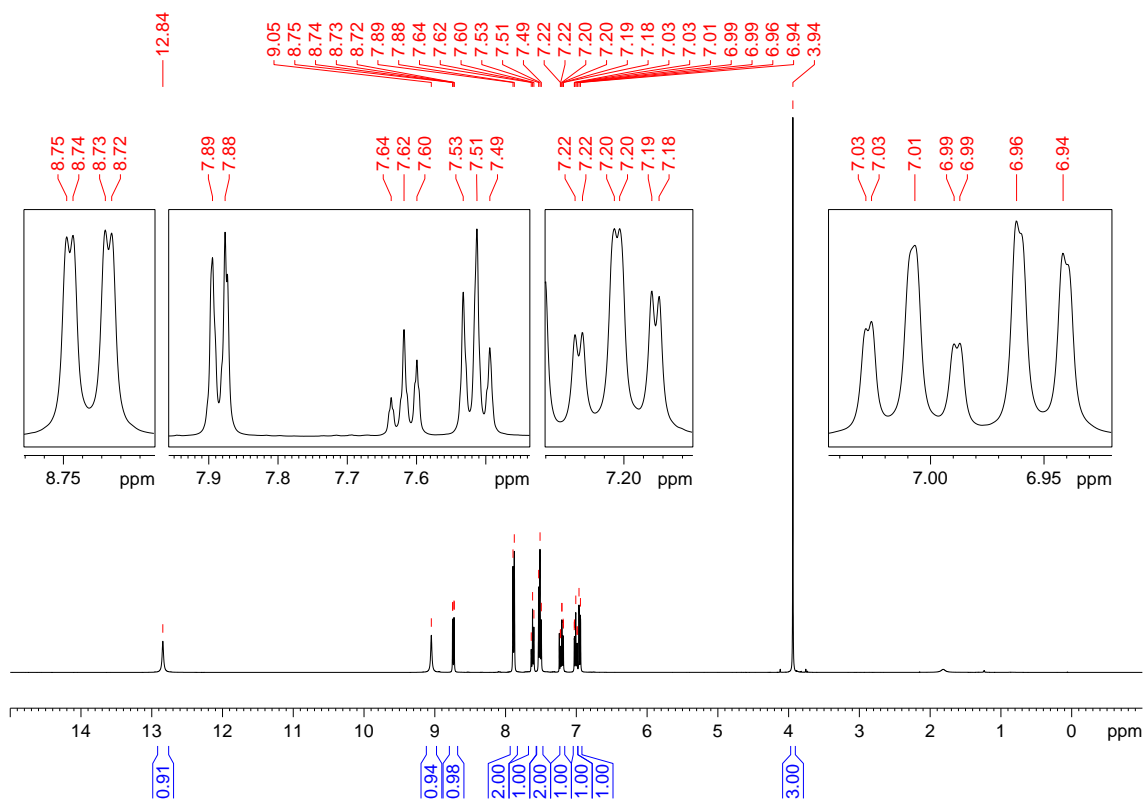


**Figura 105.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **20** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

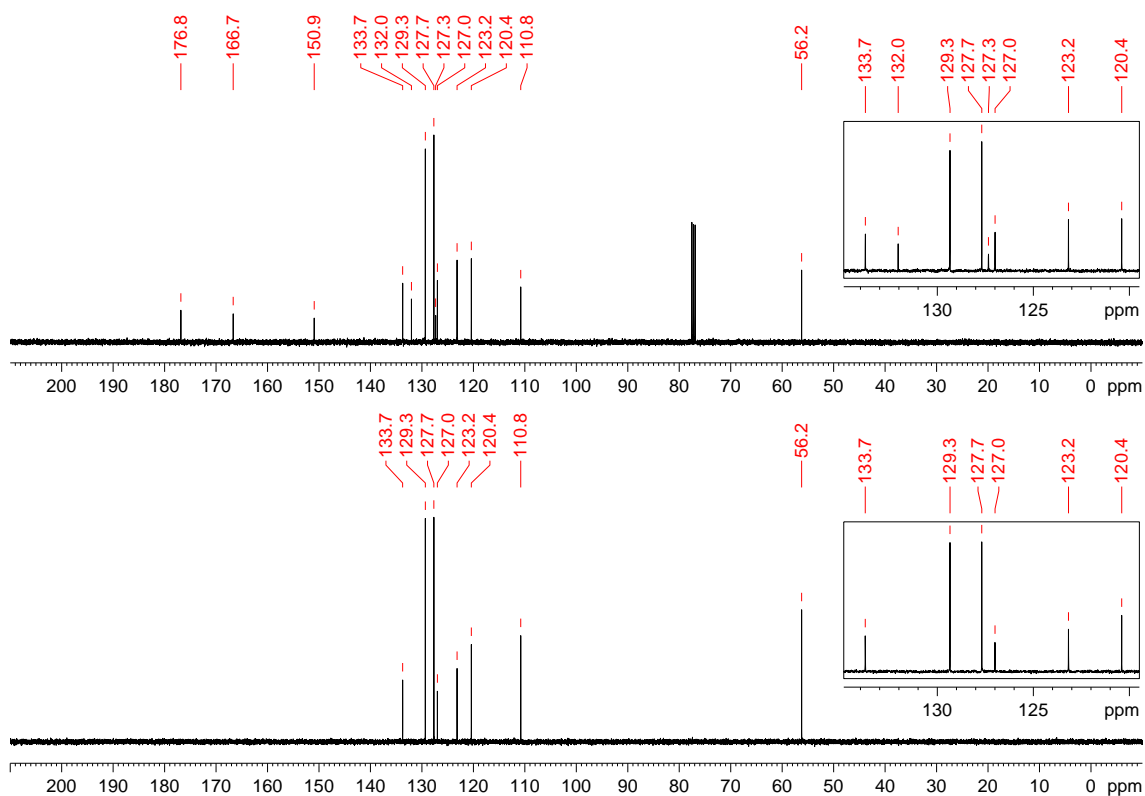
**(21) N-benzoil-N'-(2-metoxifenil)-tiourea:****(21)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 92%. PF: 150 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3271, 3120, 3020, 2943, 2842, 1677, 1596, 1558, 1488, 1353, 1319, 1249, 1157, 1026, 925, 848, 790, 756, 694, 613, 528, 443. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3,94 (3H, s), 6,95 (1H, d,  $^3J$  8,3 Hz), 7,01 (1H, dt,  $^3J$  7,8 Hz,  $^3J$  7,6 Hz), 7,20 (1H, dt,  $^3J$  7,9 Hz,  $^3J$  7,6 Hz), 7,51 (2H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,60 (1H, t,  $^3J$  7,5 Hz); 7,89 (2H, d,  $^3J$  7,4 Hz), 8,73 (1H, dd,  $^3J$  8,1 Hz,  $^4J$  1,6 Hz), 9,05 (1H, s, largo, CONH), 12,84 (1H, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 56,2(+) ( $\text{OCH}_3$ ), 110,8(+) (CH), 120,4(+) (CH), 123,2(+) (CH), 127,0(+) (CH), 127,3 (C), 127,7(+) (CH), 129,3(+) (CH), 132,0 (C), 133,7(+) (CH), 150,9 (C), 166,7 (C=O), 176,8 (C=S).

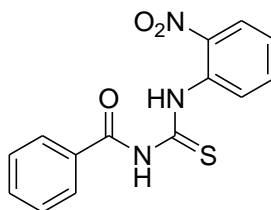
**Figura 106.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **21**.



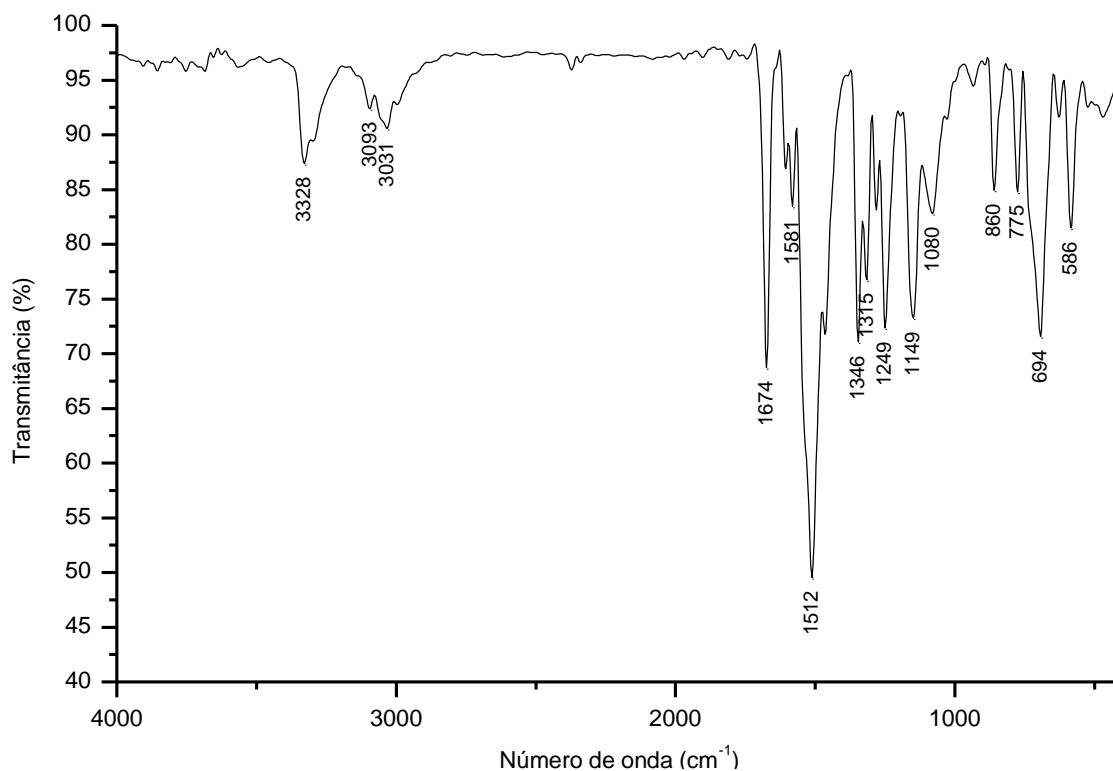
**Figura 107.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **21** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

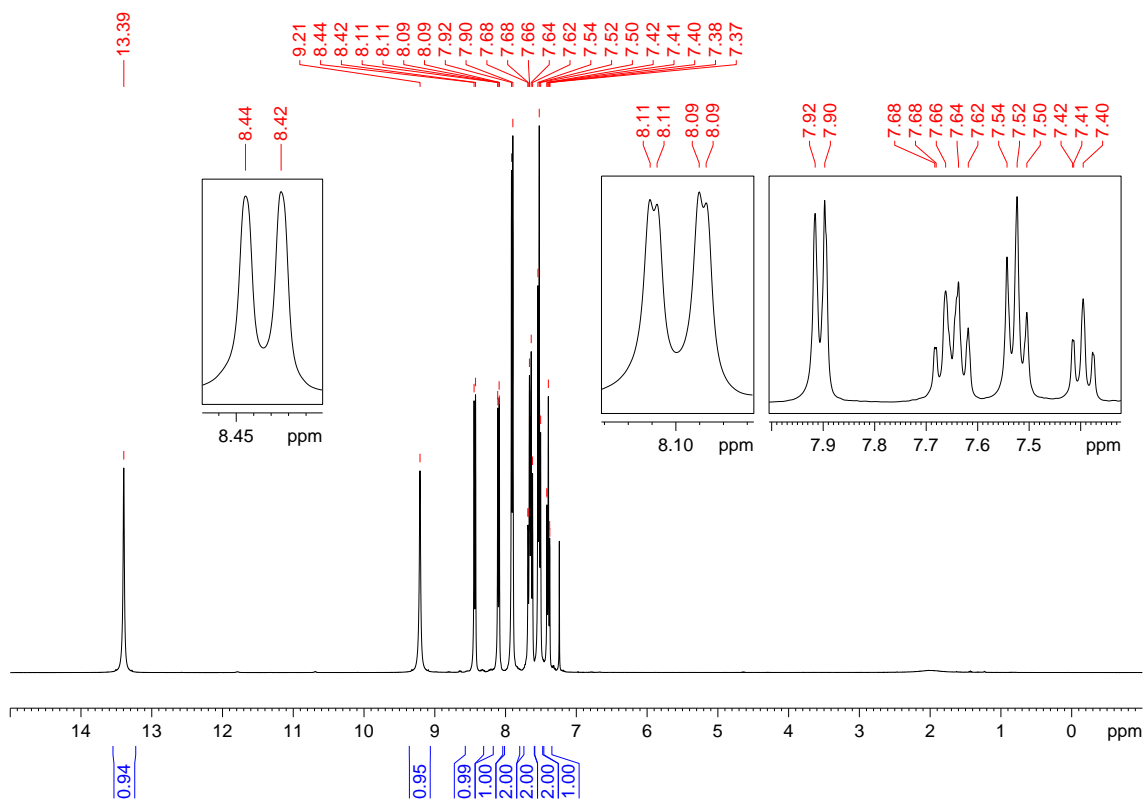


**Figura 108.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **21** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

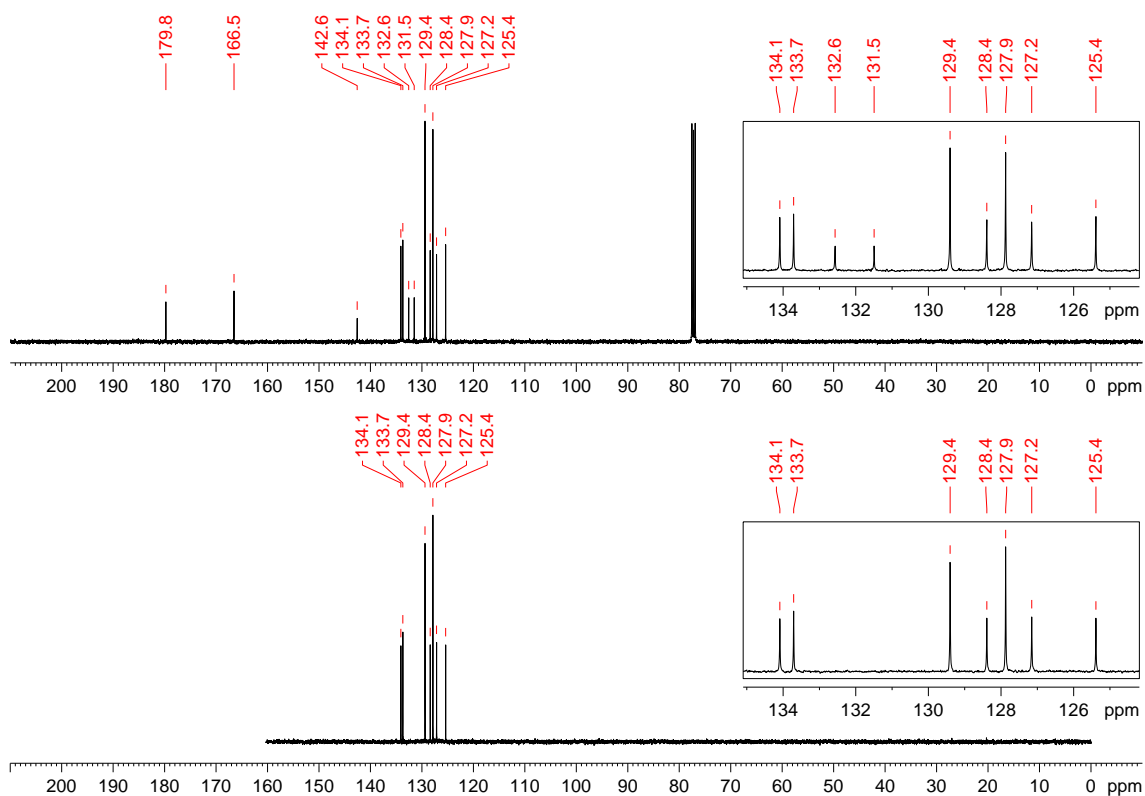
**(22) N-benzoil-N'-(2-nitrofenil)-tioureia:****(22)**

Recristalizado em etanol/acetona com rendimento 64%. PF: 146 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3328, 3093, 3031, 1674, 1512, 1346, 1315, 1249, 1149, 1080, 860, 775, 694, 586. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,40 (1H, t,  $^3J$  8,2 Hz), 7,52 (2H, t,  $^3J$  7,6 Hz), 7,61-7,69 (2H, m), 7,91 (2H, d,  $^3J$  7,5 Hz), 8,10 (1H, dd,  $^3J$  8,3 Hz,  $^4J$  1,7 Hz), 8,43 (1H, d,  $^3J$  8,3 Hz), 9,21 (1H, s, largo, CONH), 13,39 (1H, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 125,4(+) (CH), 127,2(+) (CH), 127,9(+) (CH), 128,4(+) (CH), 129,4(+) (CH), 131,5 (C), 132,6 (C), 133,7 (+) (CH), 134,1(+) (CH), 142,6 (C), 166,5 (C=O), 179,8 (C=S).

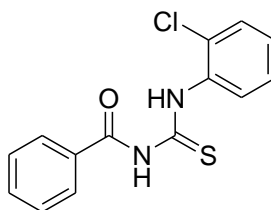
**Figura 109.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **22**.



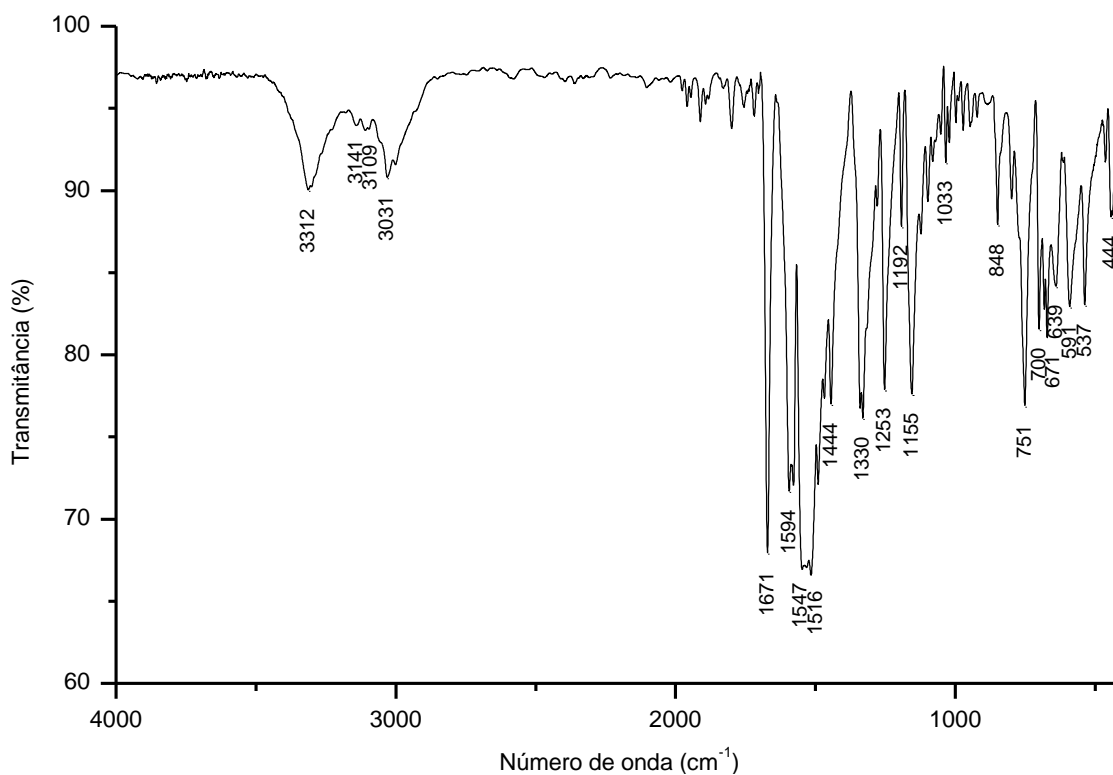
**Figura 110.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **22** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 111.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **22** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

**(23) N-benzoil-N'-(2-clorofenil)-tioureia:****(23)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 74%. PF: 141-142 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3312, 3141, 3109, 3031, 1671, 1594, 1547, 1516, 1444, 1330, 1253, 1192, 1155, 1033, 848, 751, 700, 671, 639, 591, 537, 444. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,22 (1H, dt,  $^3J$  7,8 Hz,  $^4J$  1,6 Hz), 7,33 (1H, dt,  $^3J$  7,9 Hz,  $^4J$  1,7 Hz), 7,46 (1H, dd,  $^3J$  8,0 Hz,  $^4J$  1,5 Hz), 7,53 (2H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,64 (1H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,90 (2H, d,  $^3J$  7,4 Hz), 8,38 (1H, dd,  $^3J$  8,2 Hz,  $^4J$  1,6 Hz), 9,17 (1H, s, largo, CONH), 12,73 (1H, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 126,4(+) (CH), 127,1(+) (CH), 127,8(+) (CH), 127,9(+) (CH), 128,2 (C), 129,4(+) (CH), 129,9(+) (CH), 131,7 (C), 134,0(+) (CH), 135,2 (C), 166,9 (C=O), 178,9 (C=S).

**Figura 112.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **23**.

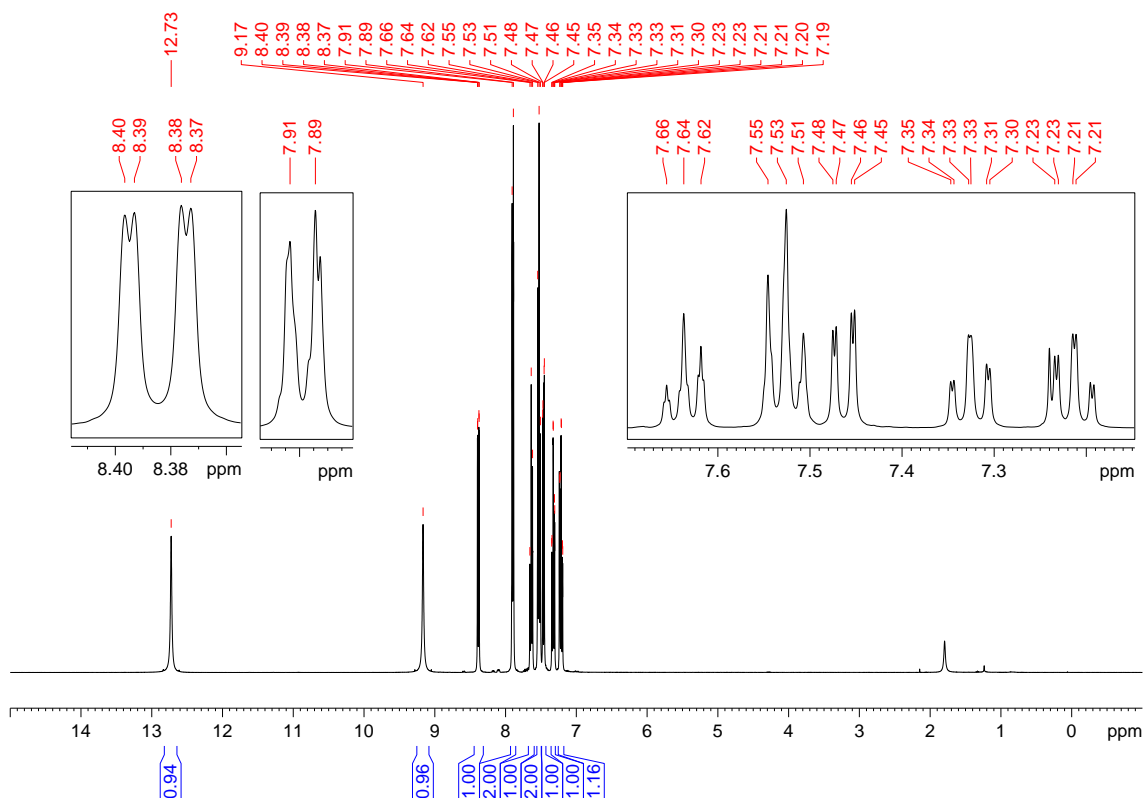


Figura 113. Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **23** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

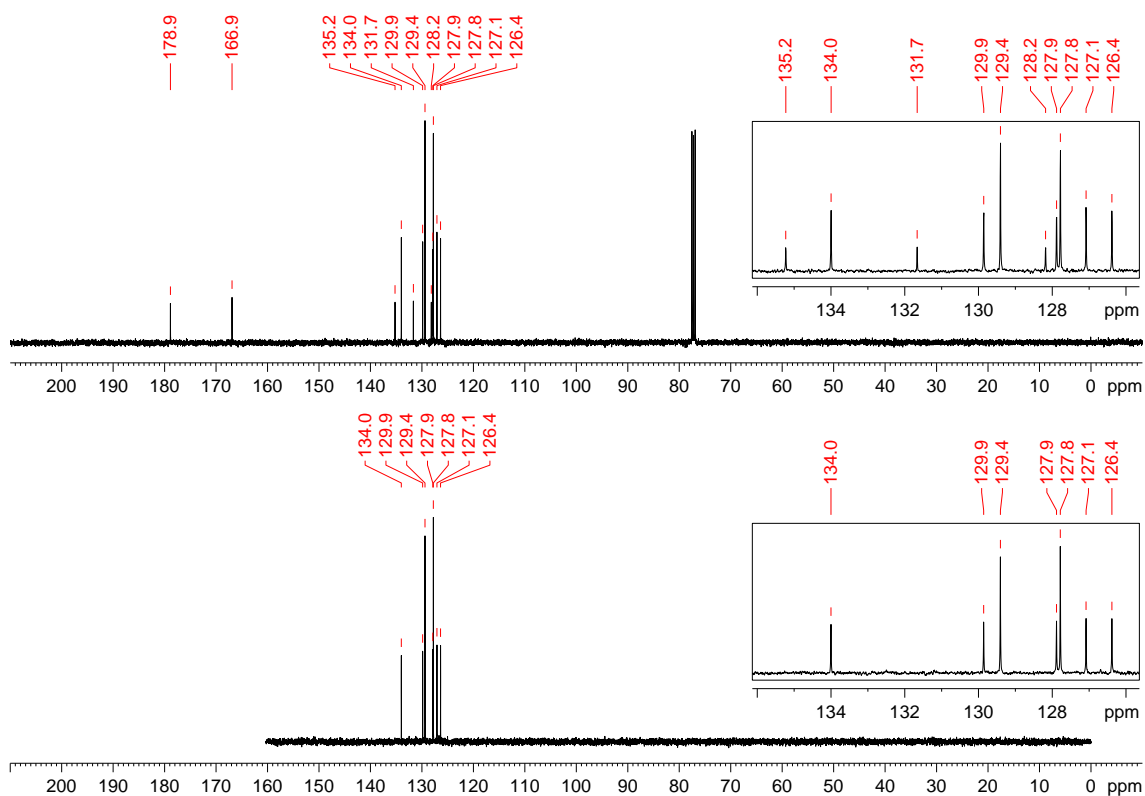
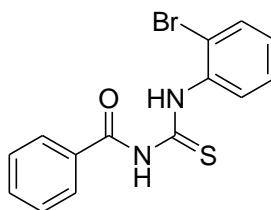
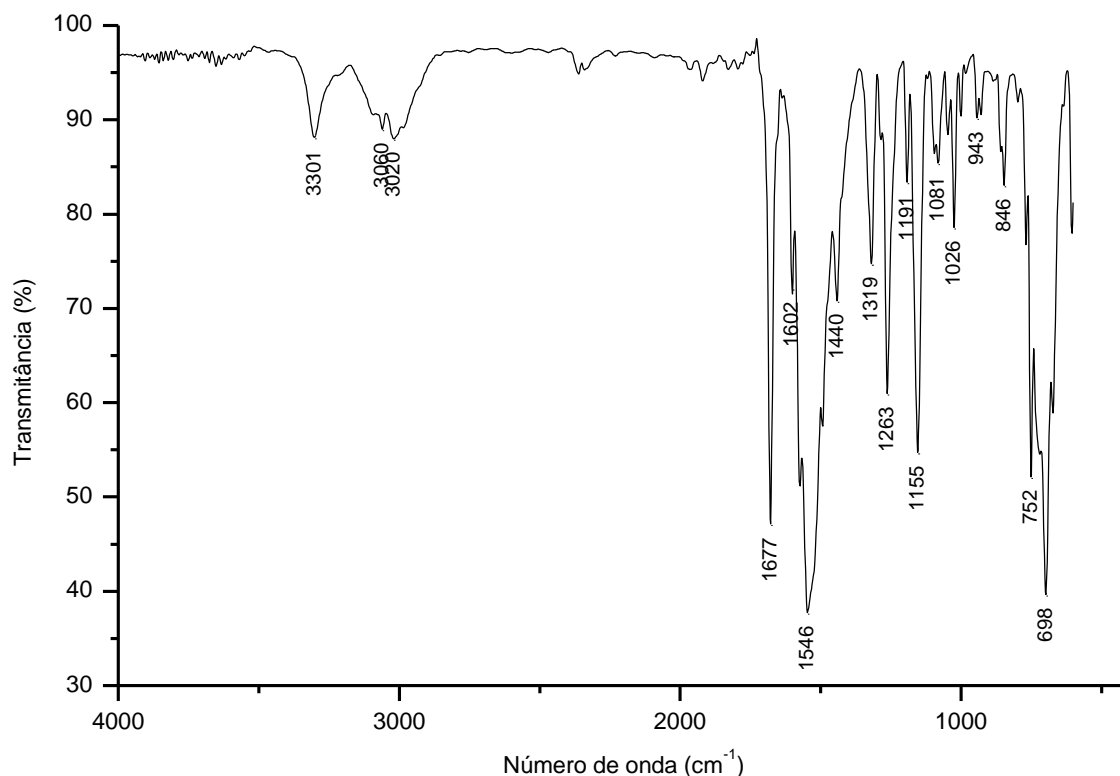
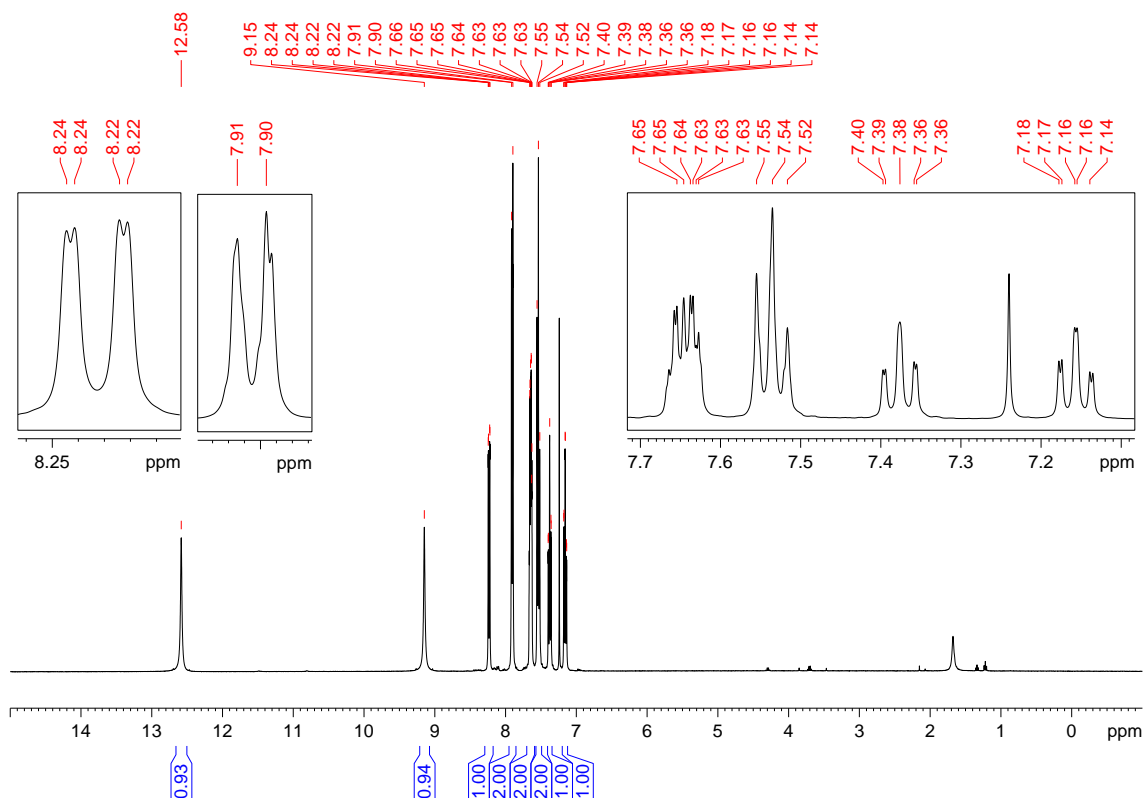


Figura 114. Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **23** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

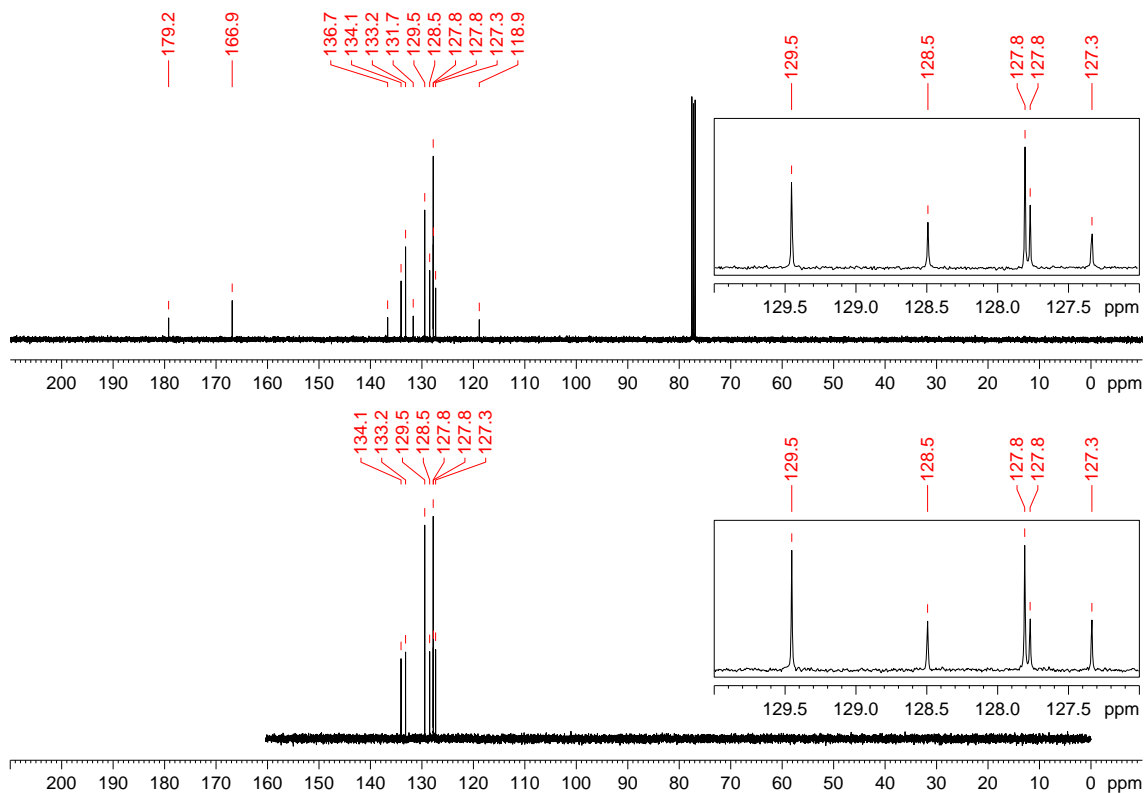
**(24) N-benzoil-N'-(2-bromofenil)-tiourea:****(24)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 86%. PF: 133-134 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3301, 3060, 3020, 1677, 1602, 1546, 1440, 1319, 1263, 1191, 1155, 1081, 1026, 943, 846, 752, 698. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,16 (1H, dt,  $^3J$  7,8 Hz,  $^4J$  1,6 Hz), 7,35-7,40 (1H, m), 7,54 (2H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,62-7,67 (2H, m), 7,90 (2H, d,  $^3J$  7,4 Hz), 8,23 (1H, dd,  $^3J$  8,1 Hz,  $^4J$  1,5 Hz), 9,15 (1H, s, largo, CONH), 12,58 (1H, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 118,9 (C), 127,3(+) (CH), 127,8(+) (CH), 127,8(+) (CH), 128,5(+) (CH), 129,5(+) (CH), 131,7 (C), 133,2(+) (CH), 134,1(+) (CH), 136,7 (C), 166,9 (C=O), 179,2 (C=S).

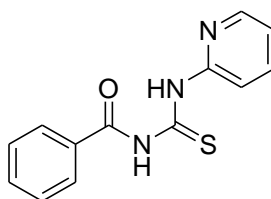
**Figura 115.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **24**.



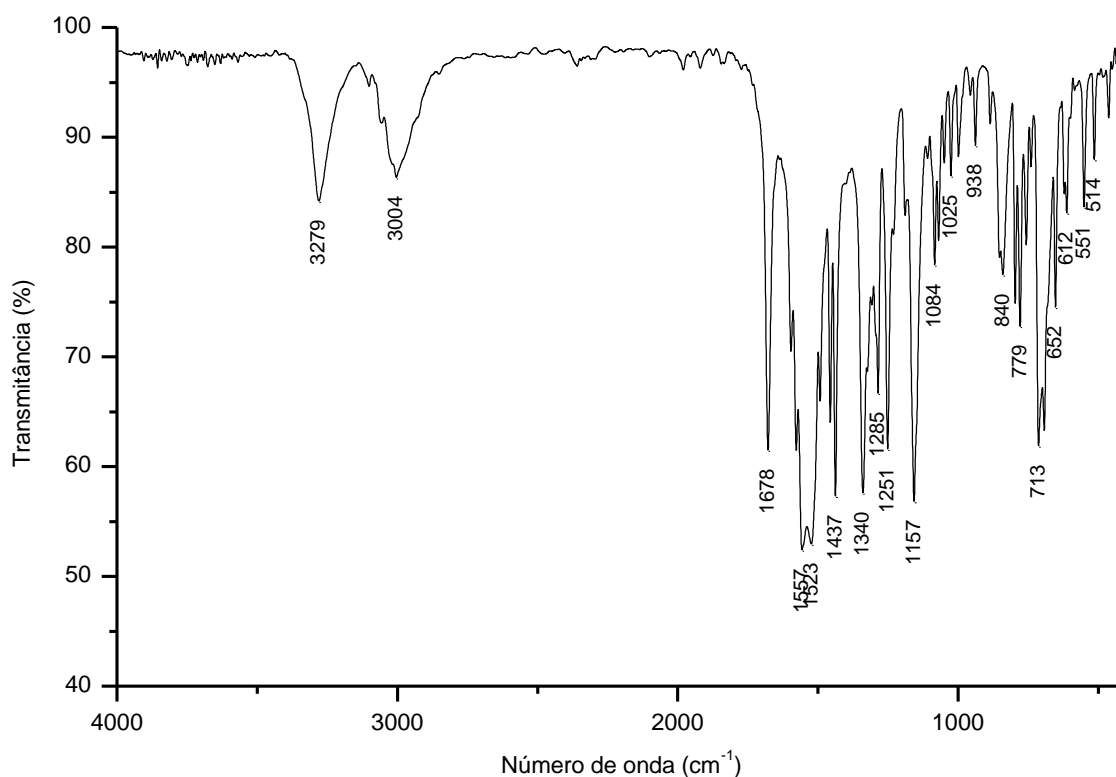
**Figura 116.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **24** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

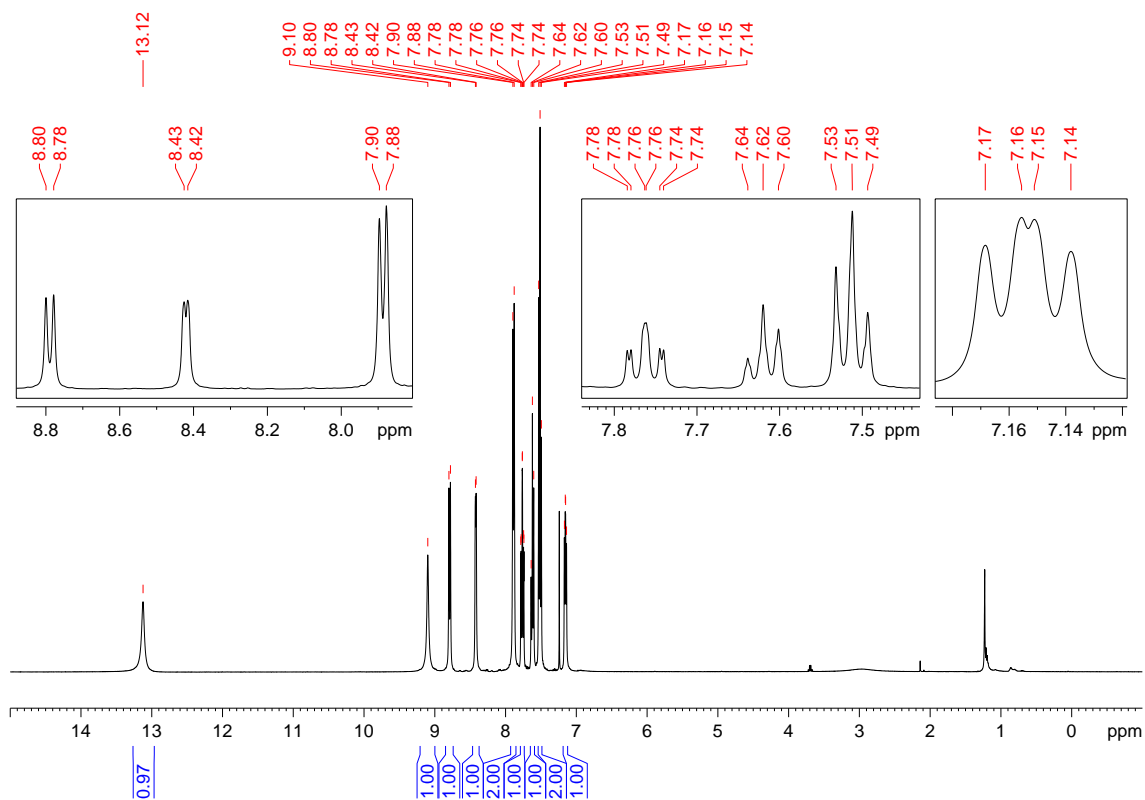


**Figura 117.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **24** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

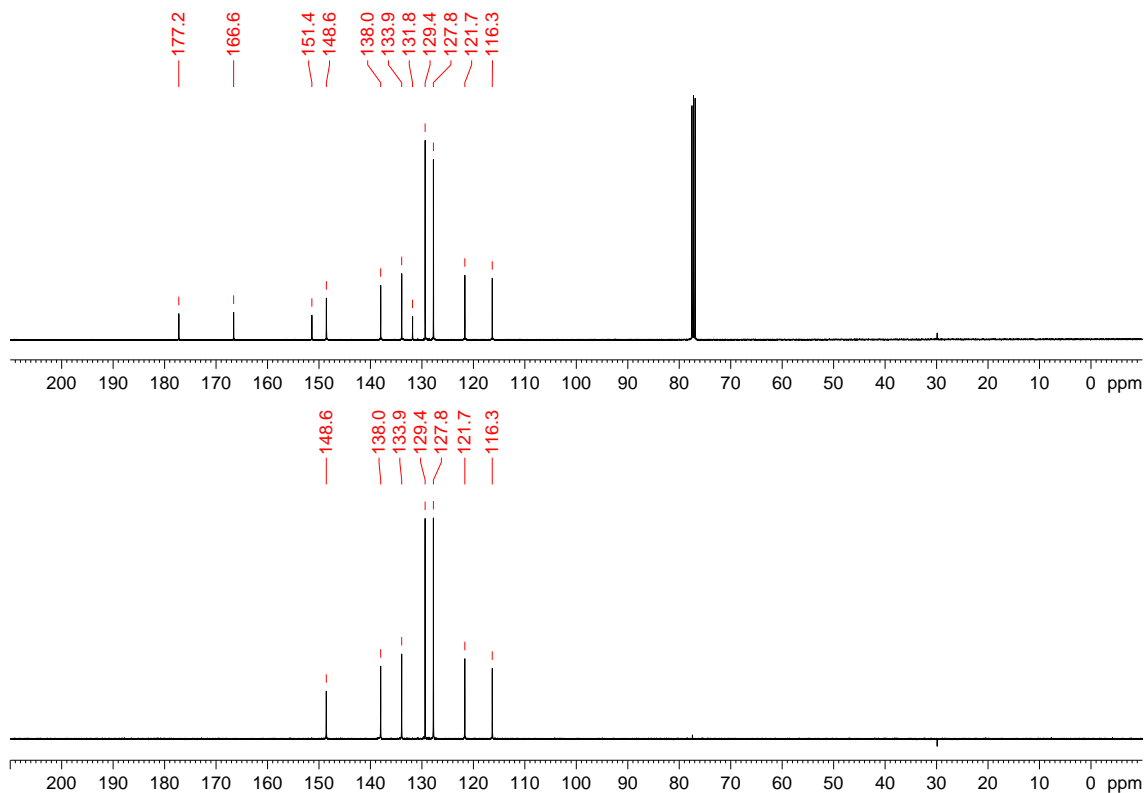
**(25) N-benzoil-N'-(2-piridinil)-tioureia:****(25)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 71%. PF: 136-137 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3279, 3004, 1678, 1557, 1523, 1437, 1340, 1285, 1251, 1157, 1084, 1025, 938, 840, 779, 713, 652, 612, 551, 514. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,15 (1H, dd,  $^3J$  7,1 Hz,  $^3J$  4,7 Hz), 7,51 (2H, t,  $^3J$  7,6 Hz), 7,62 (1H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,76 (1H, dt,  $^3J$  8,4 Hz,  $^4J$  1,9 Hz), 7,89 (2H, d,  $^3J$  7,6 Hz), 8,42 (1H, d,  $^3J$  4,4 Hz), 8,79 (1H, d,  $^3J$  8,4 Hz), 9,10 (1H, s, largo, CONH), 13,12 (1H, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 116,3(+) (CH), 121,7(+) (CH), 127,8(+) (CH), 129,4(+) (CH), 131,8 (C), 133,9(+) (CH), 138,0(+) (CH), 148,6(+) (CH), 151,4 (C), 166,6 (C=O), 177,2 (C=S).

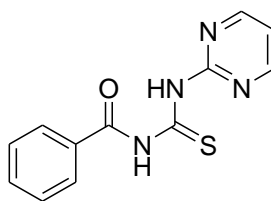
**Figura 118.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **25**.



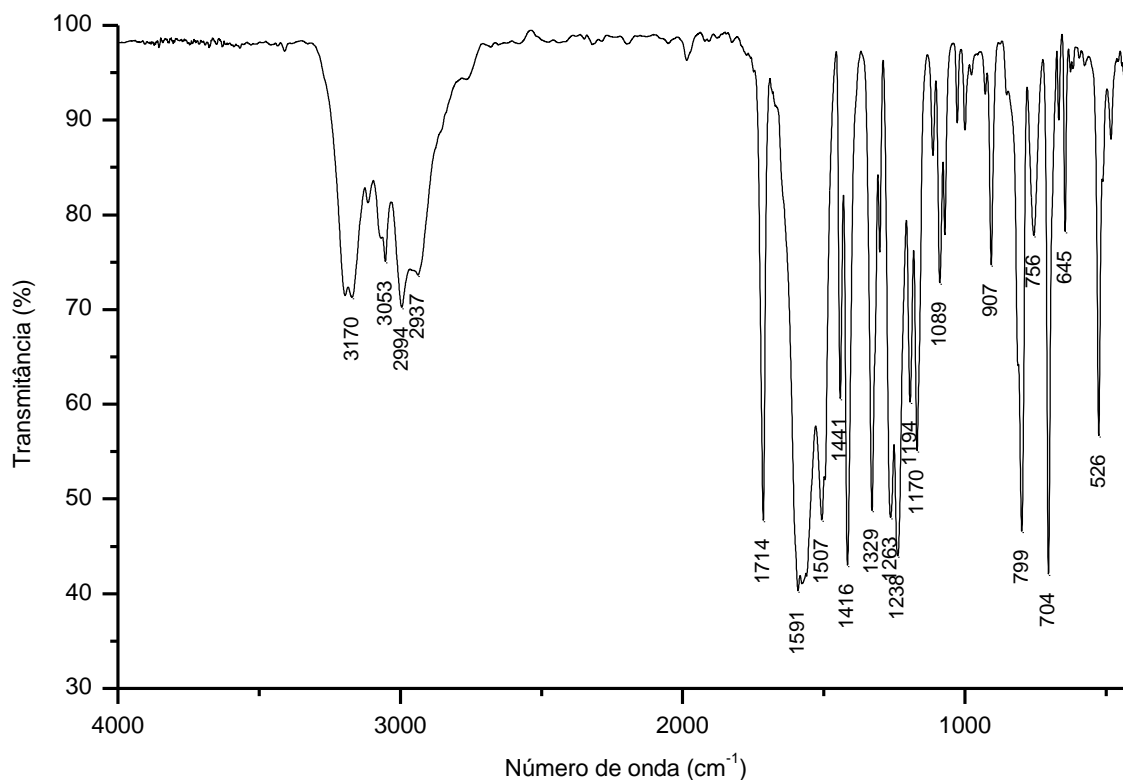
**Figura 119.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **25** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

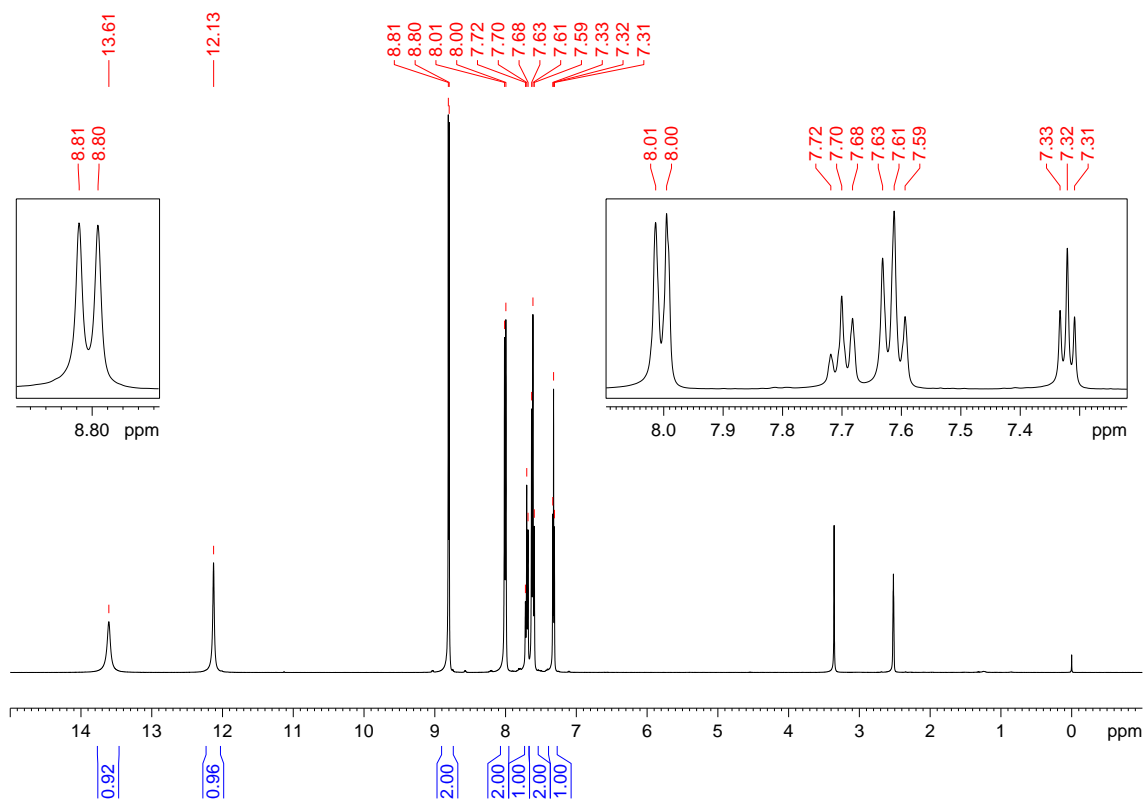


**Figura 120.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **25** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

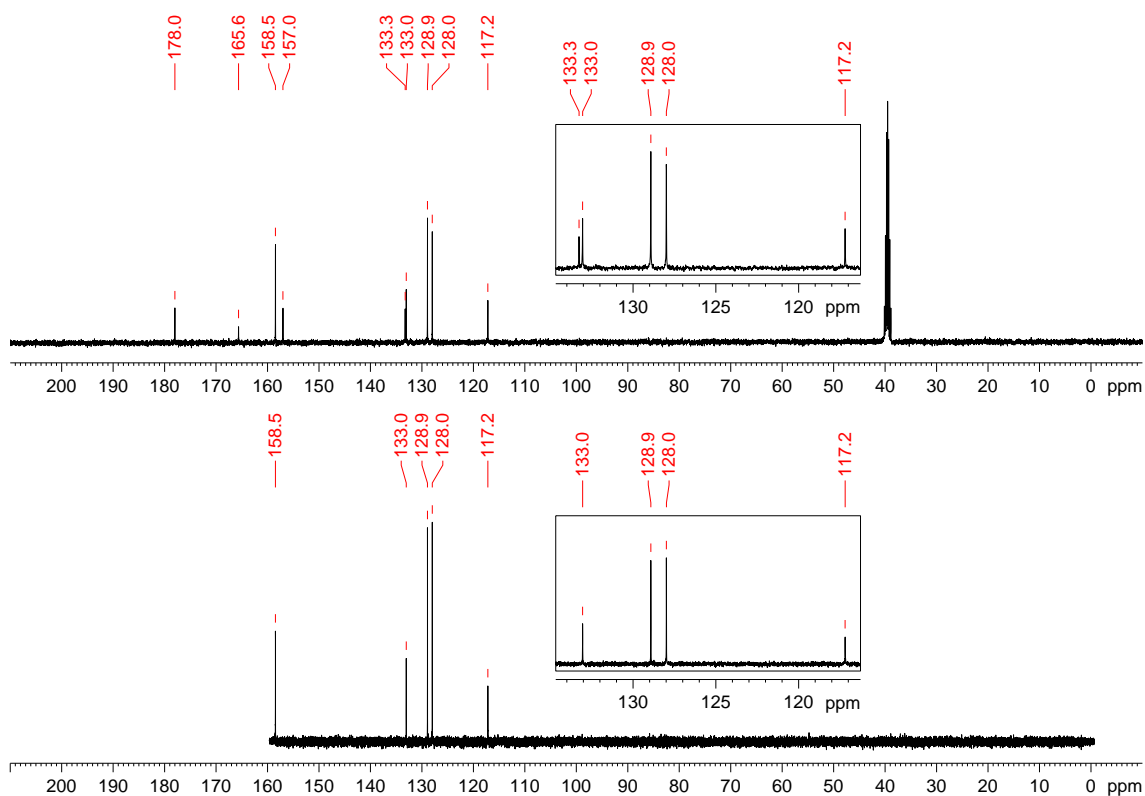
**(26) N-benzoil-N'-pirimidinil-tioureia:****(26)**

Recristalizado em etanol/acetona com rendimento de 73%. PF: 175-176 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3170, 3053, 2994, 2937, 1714, 1591, 1507, 1441, 1416, 1329, 1263, 1238, 1194, 1170, 1089, 907, 799, 704, 645, 526. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7,32 (1H, t,  $^3J$  4,9 Hz), 7,61 (2H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,70 (1H, t,  $^3J$  7,4 Hz), 8,00 (2H, d,  $^3J$  7,4 Hz), 8,80 (2H, d,  $^3J$  4,9 Hz), 12,13 (1H, s, largo, CONH), 13,60 (1H, s, largo, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 117,2(+) (CH), 128,0(+) (CH), 128,9(+) (CH), 133,0(+) (CH), 133,3 (C), 157,0 (C), 158,5(+) (CH), 165,6 (C=O), 178,0 (C=S).

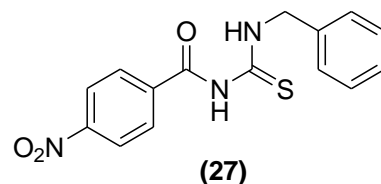
**Figura 121.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **26**.



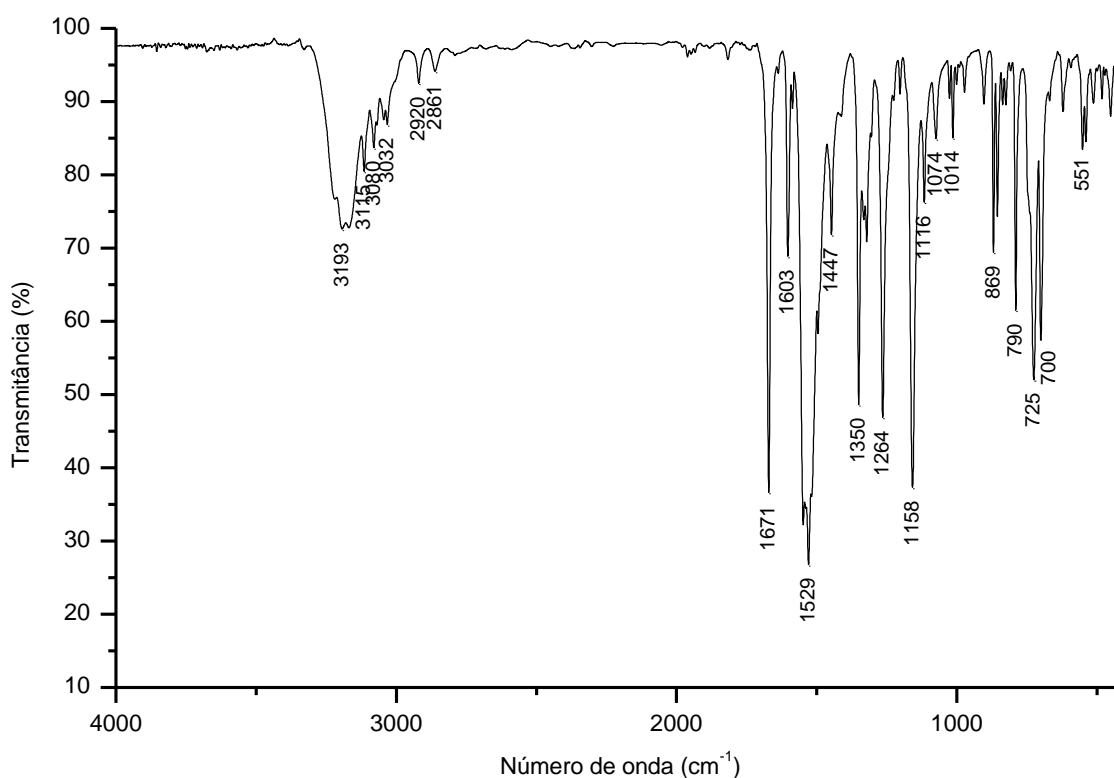
**Figura 122.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **26** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



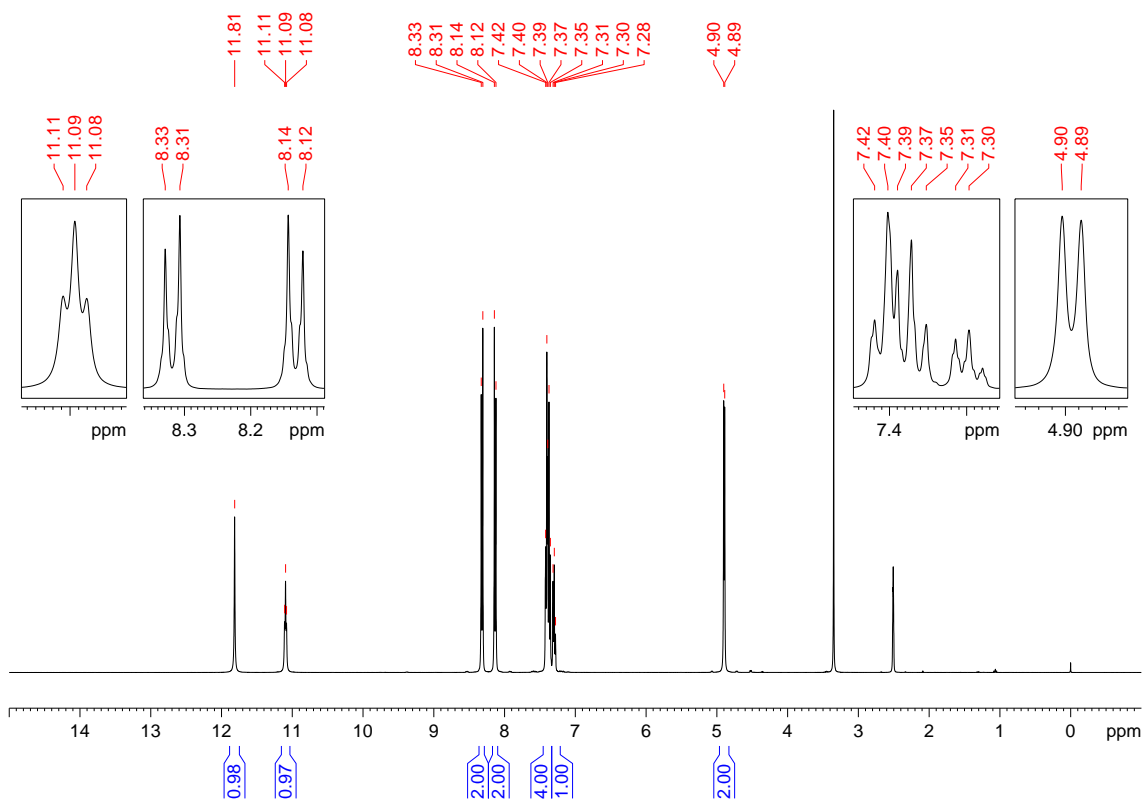
**Figura 123.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **26** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

**(27) *N*-(4-nitrobenzoi)-*N'*-benzil-tioureia**

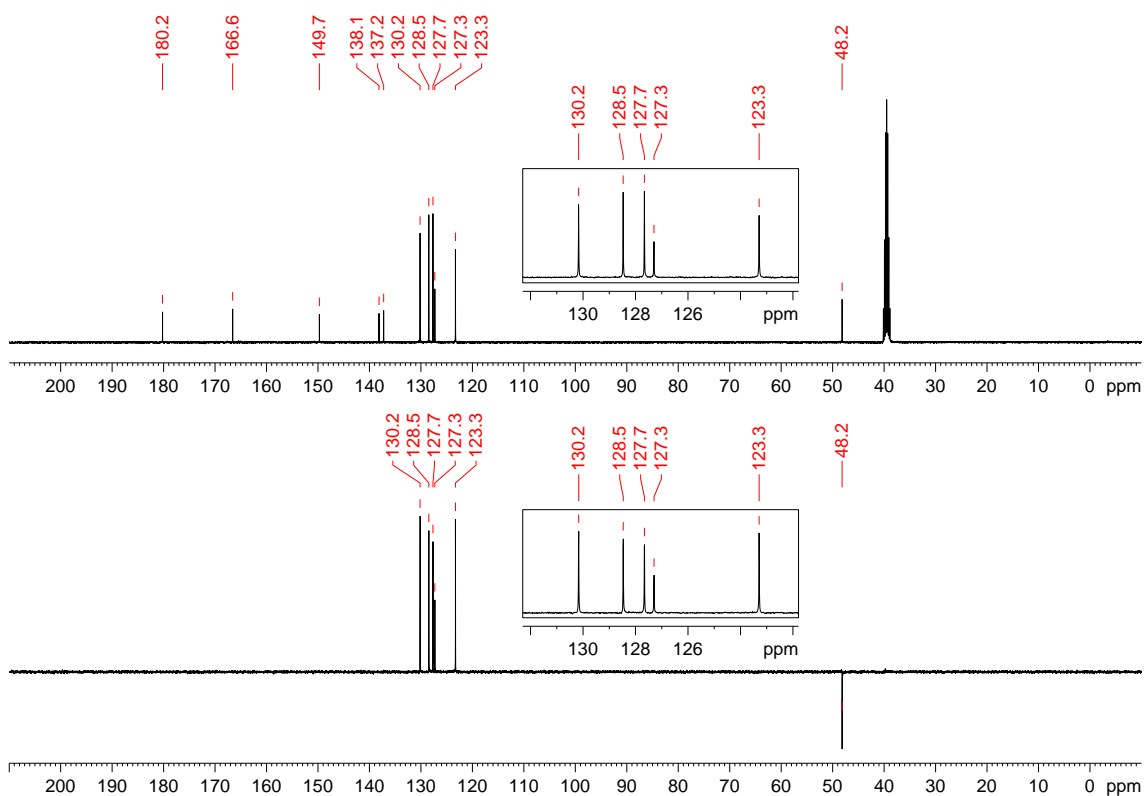
Recristalizado em etanol com rendimento de 49%. PF: 143 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3193, 3115, 3080, 3032, 2920, 2861, 1671, 1603, 1529, 1447, 1350, 1264, 1158, 1116, 1074, 1014, 869, 790, 725, 700, 551. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 4,89 (2H, d,  $^3J$  5,7 Hz), 7,30 (1H, t,  $^3J$  7,0 Hz), 7,35-7,42 (4H, m), 8,13 (2H, d,  $^3J$  8,8 Hz), 8,32 (2H, d,  $^3J$  8,8 Hz), 11,09 (1H, t,  $^3J$  5,7 Hz,  $\text{CSNH}$ ), 11,81 (1H, s,  $\text{CONH}$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 48,2(-) ( $\text{CH}_2$ ), 123,3(+) ( $\text{CH}$ ), 127,3(+) ( $\text{CH}$ ), 127,7(+) ( $\text{CH}$ ), 128,5(+) ( $\text{CH}$ ), 130,2(+) ( $\text{CH}$ ), 137,2 (C), 138,1 (C), 149,7 (C), 166,6 ( $\text{C=O}$ ), 180,2 ( $\text{C=S}$ ).



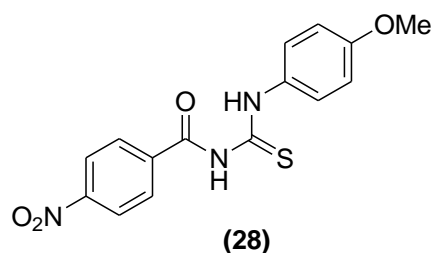
**Figura 124.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **27**.



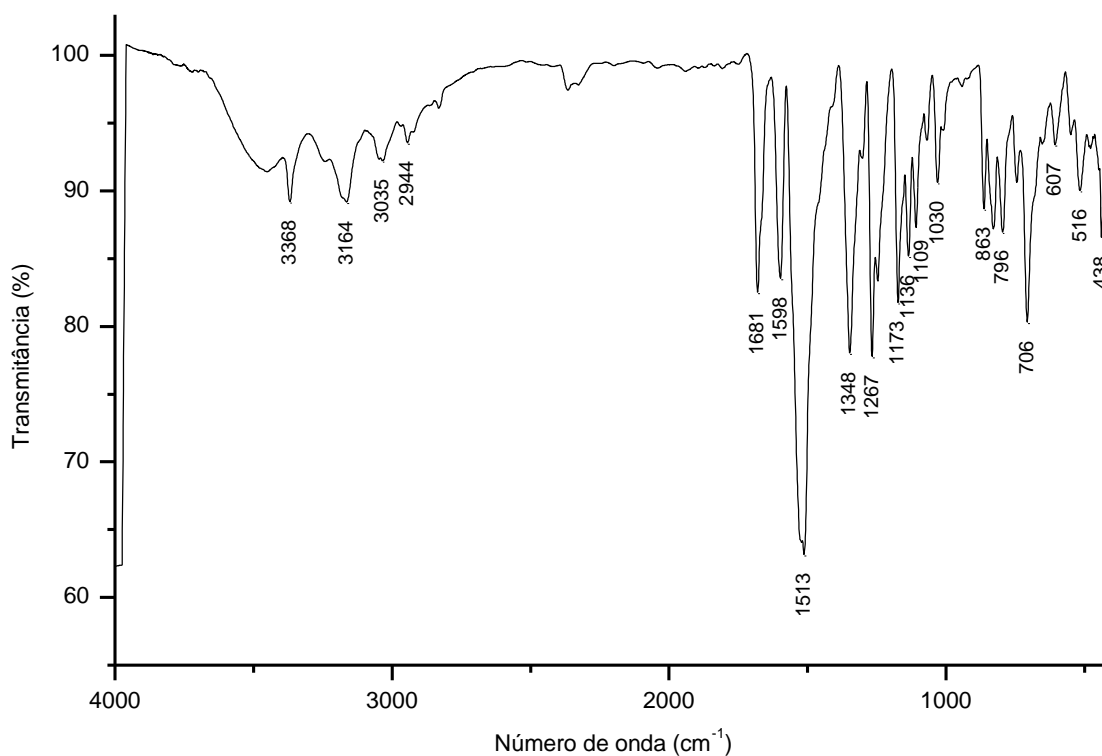
**Figura 125.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **27** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



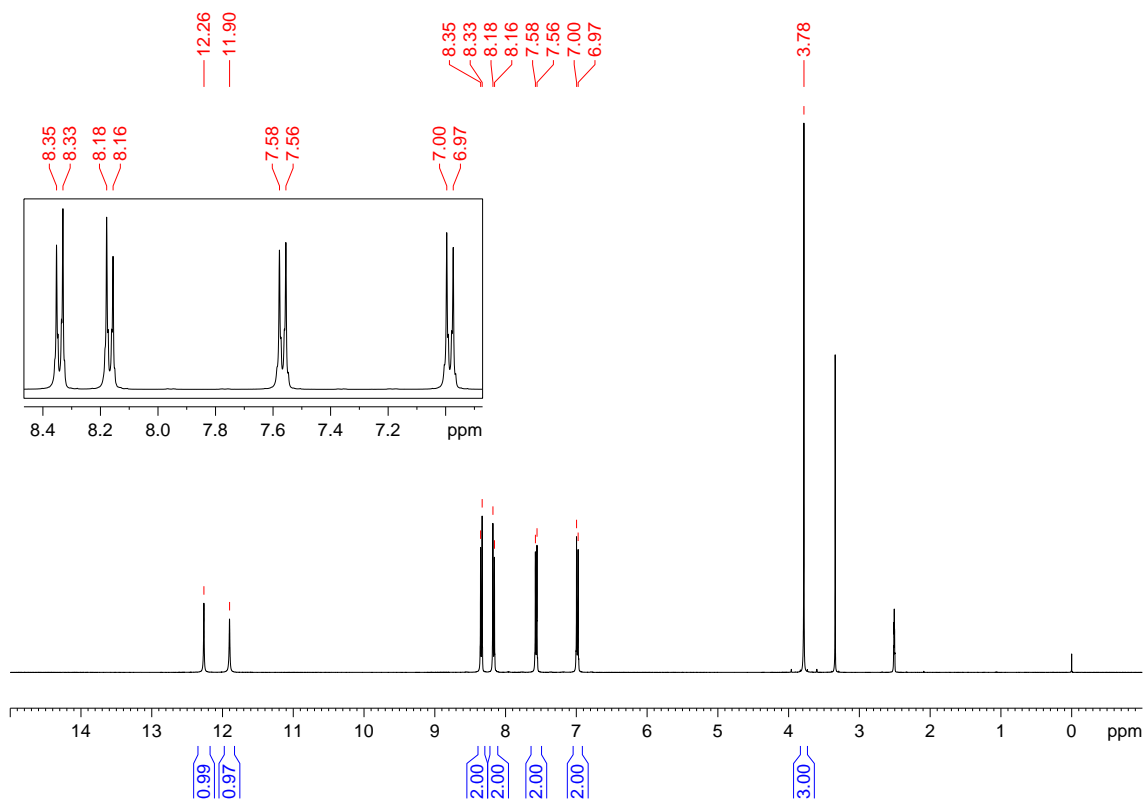
**Figura 126.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **27** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

**(28) *N*-(4-nitrobenzoil)-*N'*-(4-metoxifenil)-tiourea**

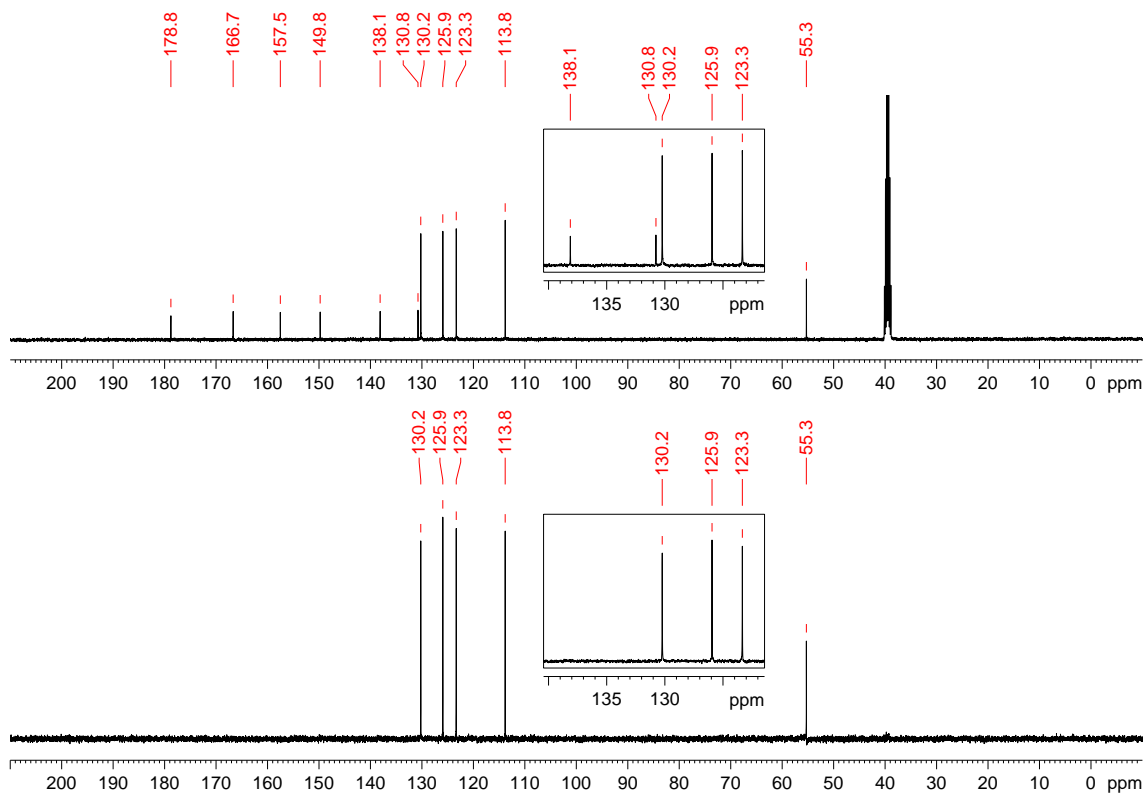
Recristalizado em etanol/acetona com rendimento de 76%. PF: 149 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3368, 3164, 3035, 2944, 1681, 1598, 1513, 1348, 1267, 1173, 1136, 1109, 1030, 863, 796, 706, 607, 516, 438. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 3,78 (3H, s), 6,98 (2H, d,  $^3J$  9,0 Hz), 7,57 (2H, d,  $^3J$  9,0 Hz), 8,17 (2H, d,  $^3J$  9,0 Hz), 8,34 (2H, d,  $^3J$  9,0 Hz), 11,90 (1H, s, CONH), 12,26 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 55,3(+) ( $\text{CH}_3$ ), 113,8(+) (CH), 123,3(+) (CH), 125,9(+) (CH), 130,2(+) (CH), 130,8 (C), 138,1 (C), 149,8 (C), 157,5 (C), 166,7 (C=O), 178,8 (C=S).



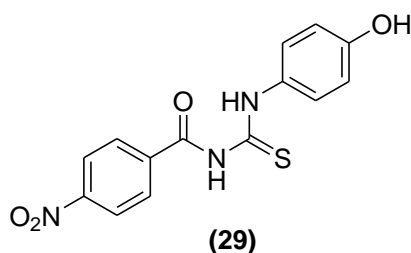
**Figura 127.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **28**.



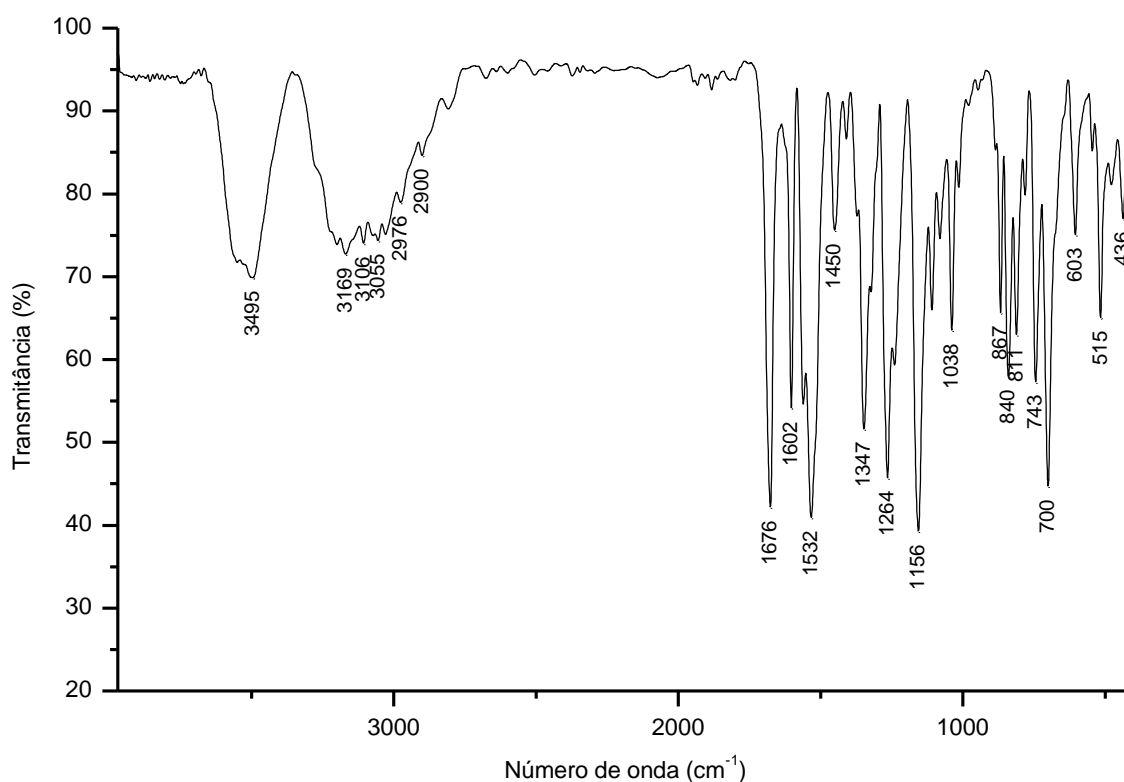
**Figura 128.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **28** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



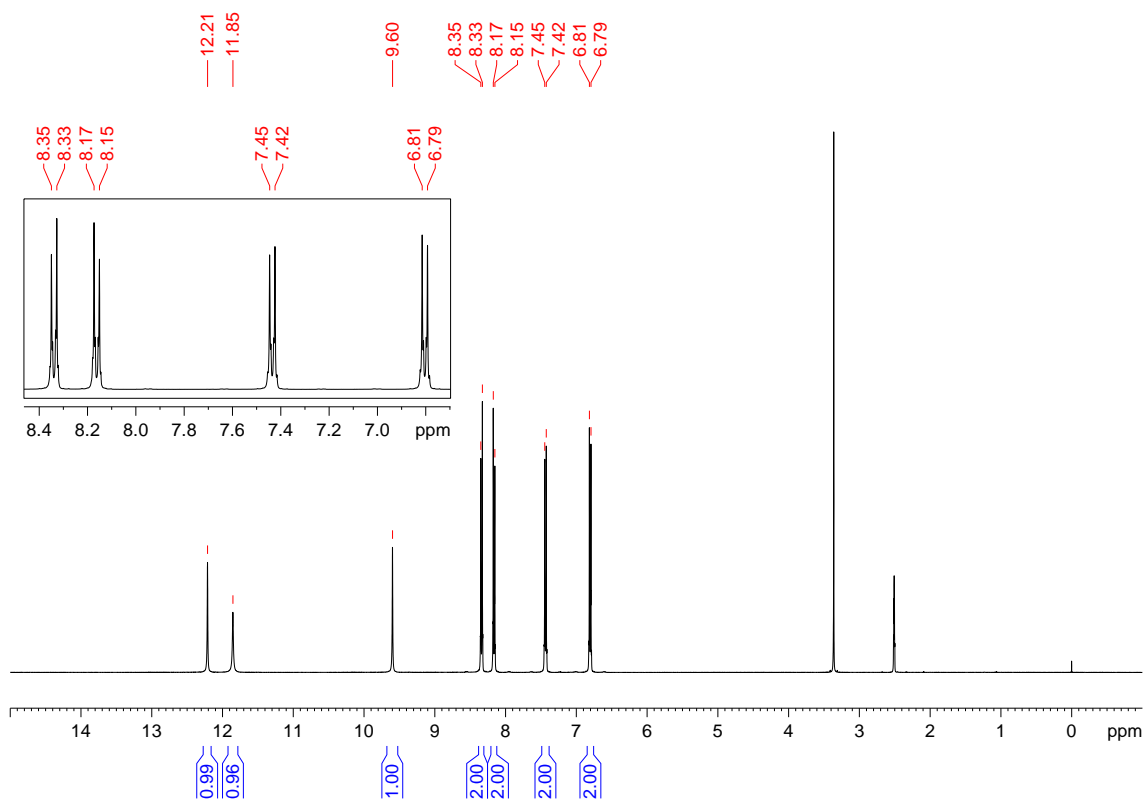
**Figura 129.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **28** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

**(29) *N*-(4-nitrobenzoi)-*N'*-(4-hidroxifenil)-tiourea:**

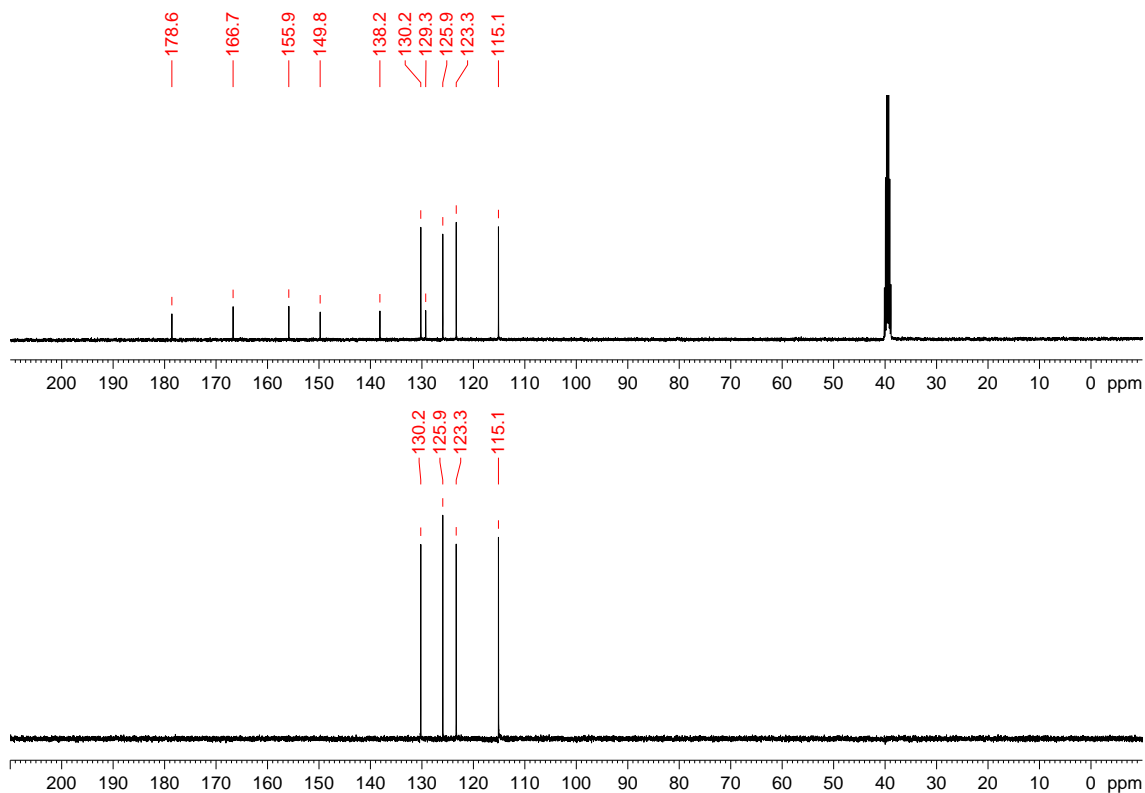
Recristalizado em etanol com rendimento de 68%. PF: 172 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3495, 3169, 3106, 3055, 2976, 2900, 1676, 1602, 1532, 1450, 1347, 1264, 1156, 1038, 867, 840, 811, 743, 700, 603, 515, 436. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 6,80 (2H, d,  $^3J$  8,8 Hz), 7,43 (2H, d,  $^3J$  8,8 Hz), 8,16 (2H, d,  $^3J$  8,9 Hz), 8,33 (2H, d,  $^3J$  8,9 Hz), 9,60 (1H, s, OH), 11,85 (1H, s, CONH), 12,21 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 115,1(+) (CH), 123,3(+) (CH), 125,9(+) (CH), 129,3 (C), 130,2(+) (CH), 138,2 (C), 149,8 (C), 155,9 (C), 166,7 (C=O), 178,6 (C=S).



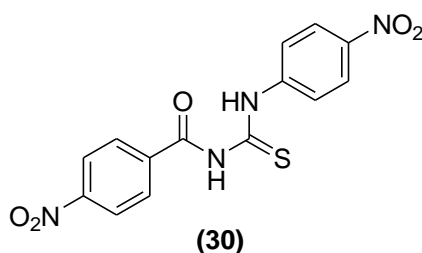
**Figura 130.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **29**.



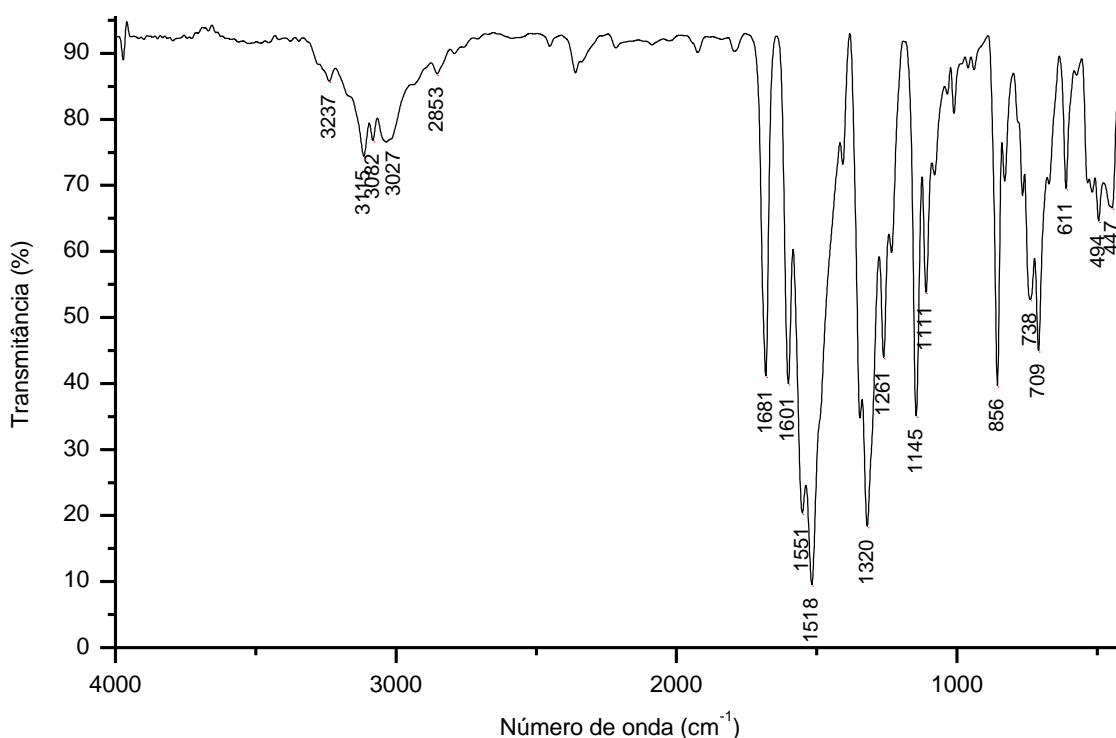
**Figura 131.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **29** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



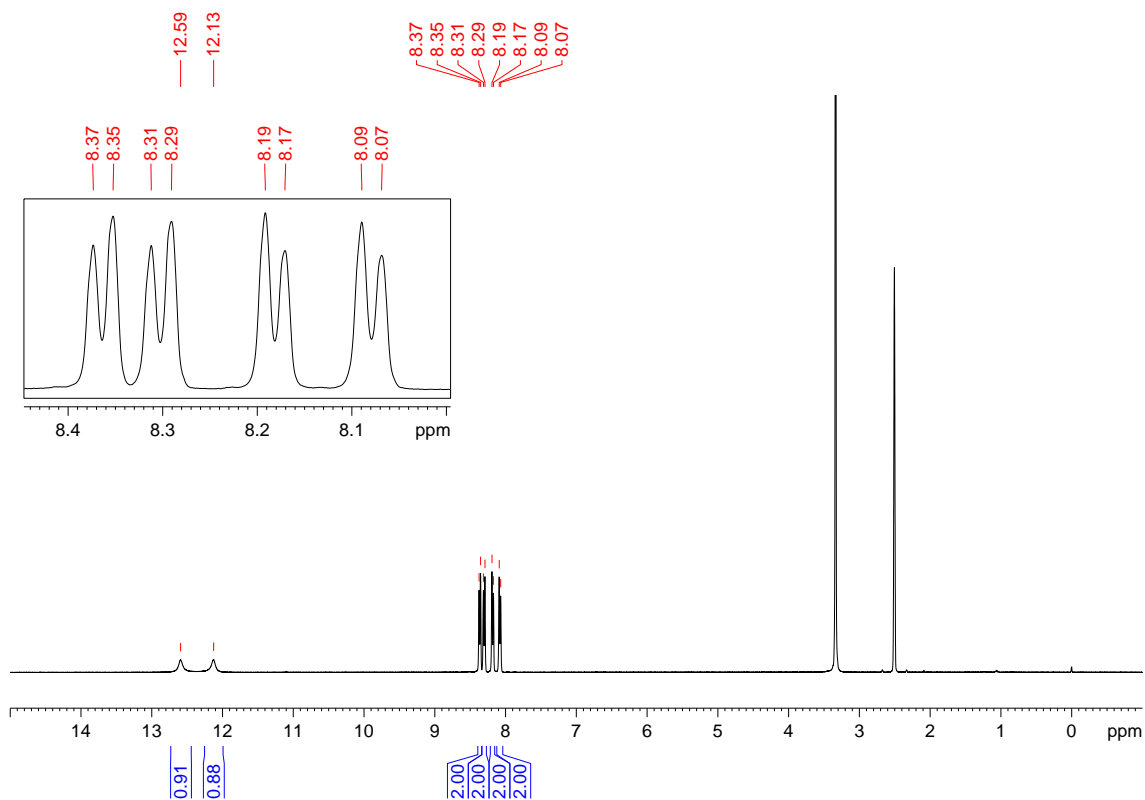
**Figura 132.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **29** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

**(30) N-(4-nitrobenzoyl)-N'-(4-nitrofenil)-tiourea**

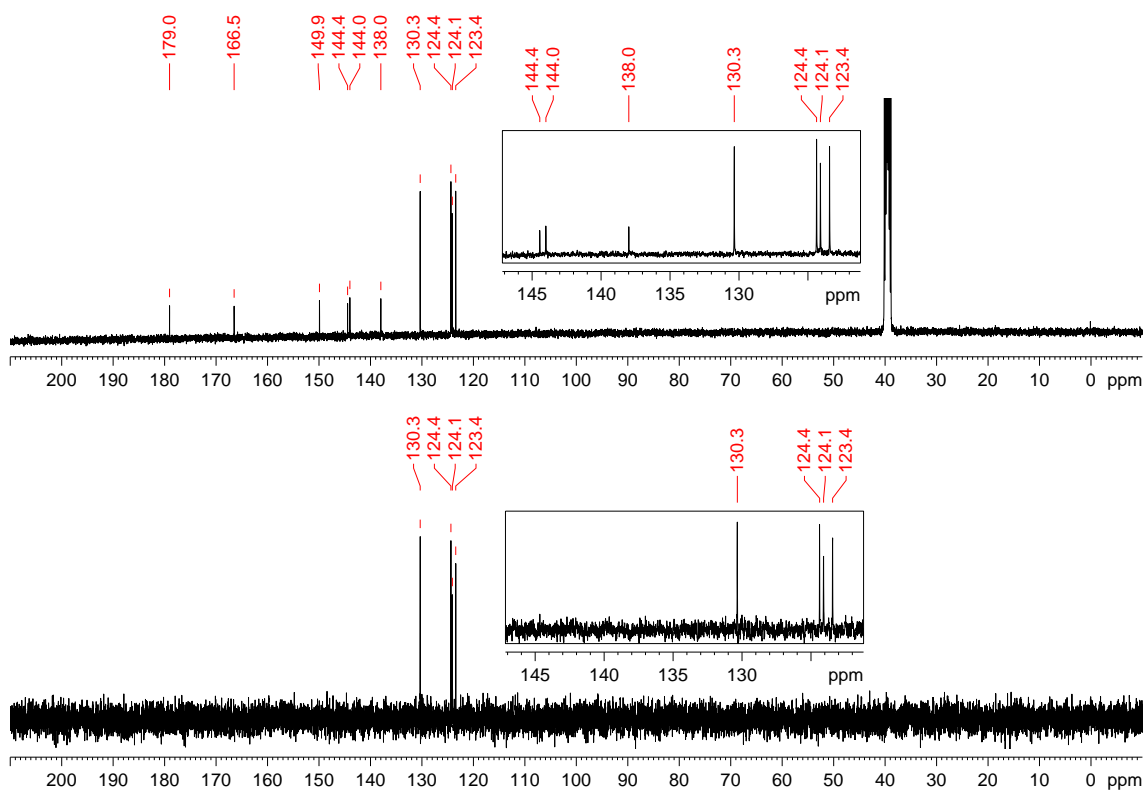
Recristalizado em etanol/acetona com rendimento de 95%. PF: 192 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3237, 3115, 3082, 3027, 2853, 1681, 1601, 1551, 1518, 1320, 1261, 1145, 1111, 856, 738, 709, 611, 494, 447. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 8,08 (2H, d,  $^3J$  8,4 Hz), 8,18 (2H, d,  $^3J$  8,4 Hz), 8,30 (2H, d,  $^3J$  8,6 Hz), 8,36 (2H, d,  $^3J$  8,6 Hz), 12,13 (1H, s, CONH), 12,59 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 123,4(+) (CH), 124,1(+) (CH), 124,4(+) (CH), 130,3(+) (CH), 138,0 (C), 144,0 (C), 144,4 (C), 149,9 (C), 166,5 (C=O), 179,0 (C=S).



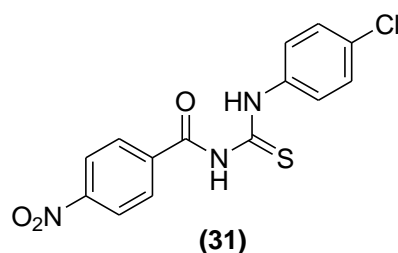
**Figura 133.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **30**.



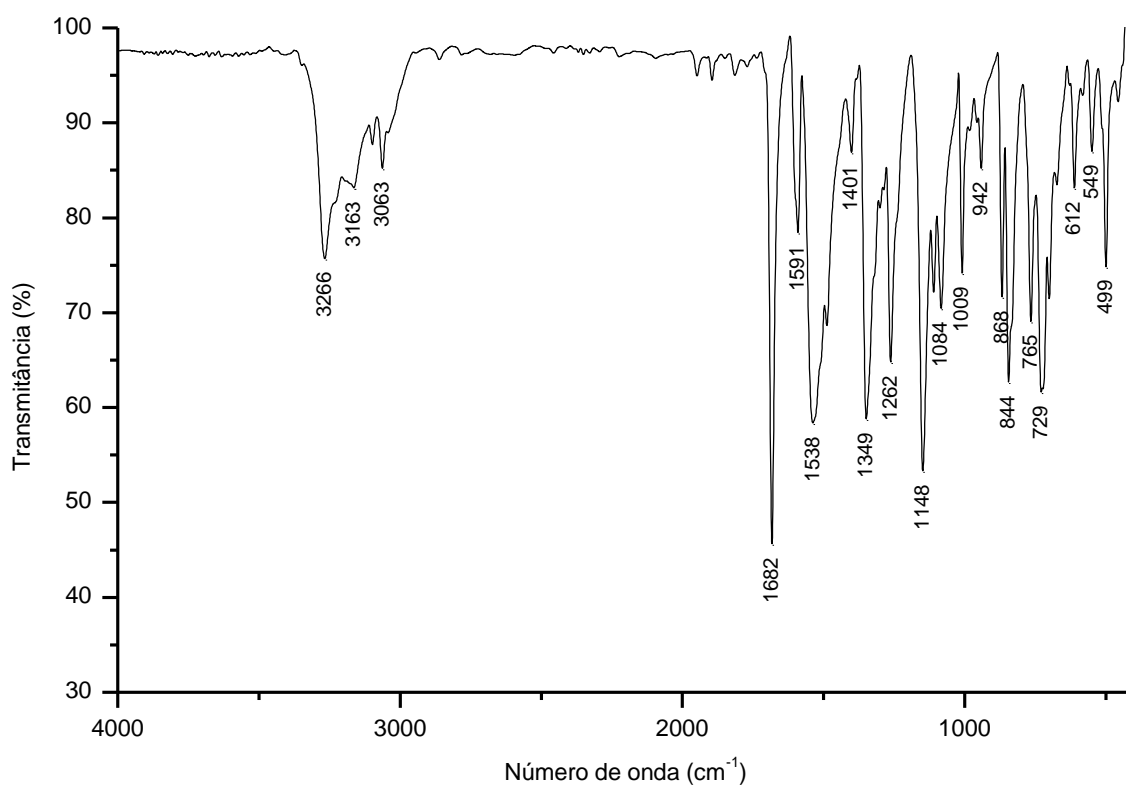
**Figura 134.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **30** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



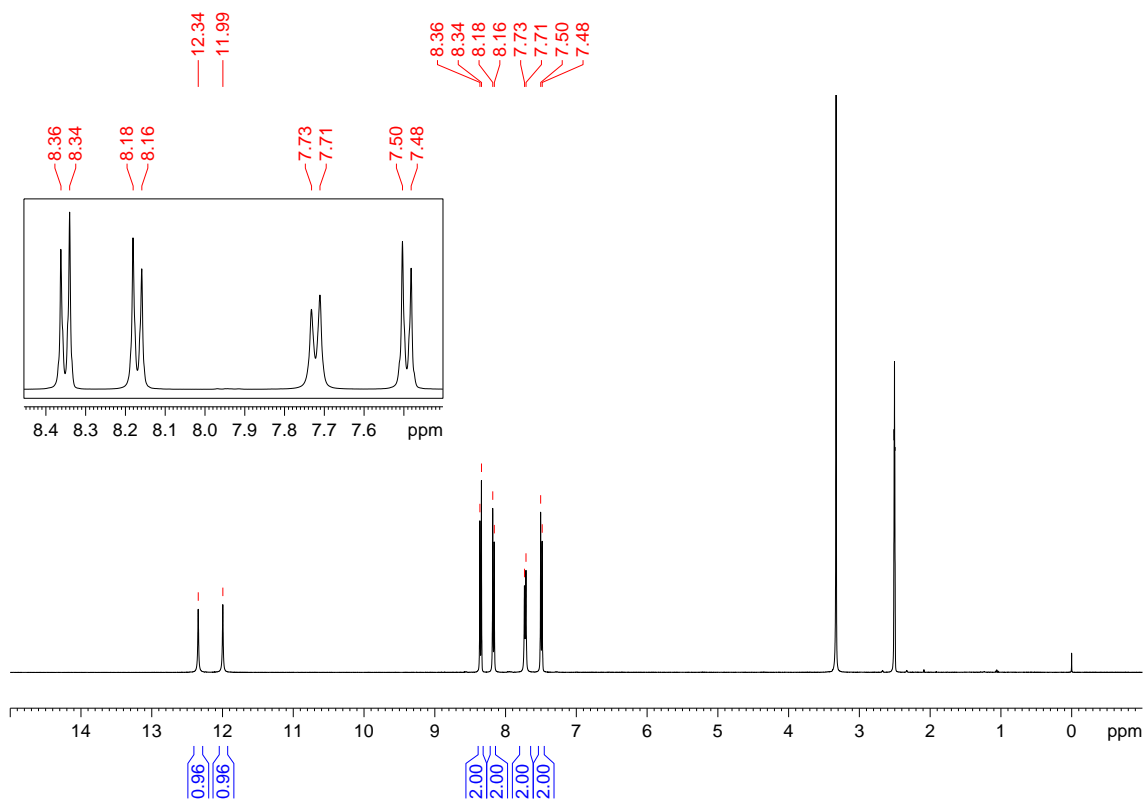
**Figura 135.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **30** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

**(31) *N*-(4-nitrobenzoil)-*N'*-(4-clorofenil)-tioureia:**

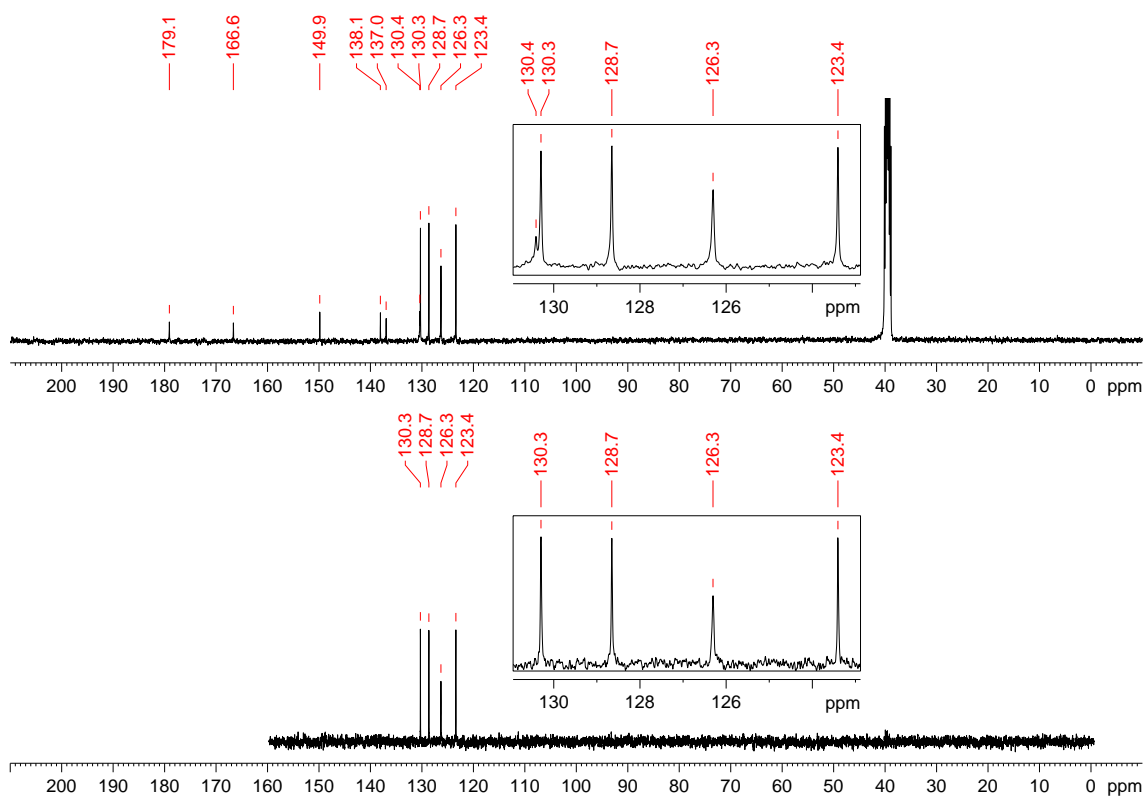
Recristalizado em etanol/acetona com rendimento de 83%. PF: 173 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3266, 3163, 3063, 1682, 1591, 1538, 1401, 1349, 1262, 1148, 1084, 1009, 942, 868, 844, 765, 729, 612, 549, 499. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7,49 (2H, d,  $^3J$  8,7 Hz), 7,72 (2H, d,  $^3J$  8,7 Hz), 8,17 (2H, d,  $^3J$  8,7 Hz), 8,35 (2H, d,  $^3J$  8,7 Hz), 11,99 (1H, s, CONH), 12,34 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 123,4(+) (CH), 126,3(+) (CH), 128,7(+) (CH), 130,3(+) (CH), 130,4 (C), 137,0 (C), 138,1 (C), 149,9 (C), 166,6 (C=O), 179,1 (C=S).



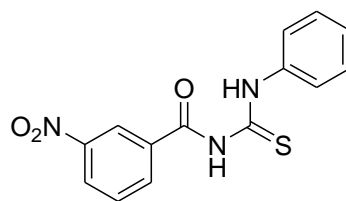
**Figura 136.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **31**.



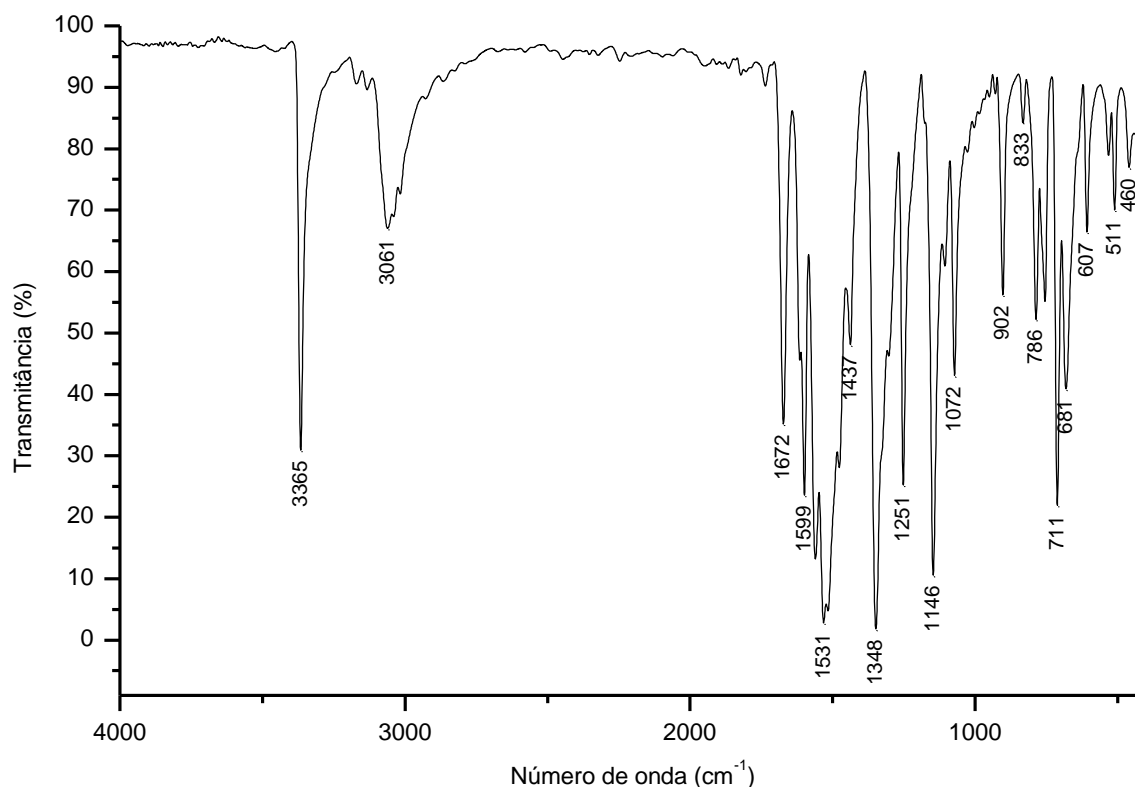
**Figura 137.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **31** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



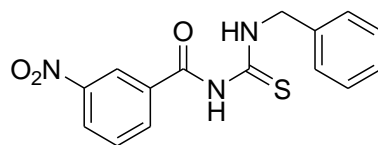
**Figura 138.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **31** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

**(32) *N*-(3-nitrobenzoyl)-*N'*-fenil-tioureia:****(32)**

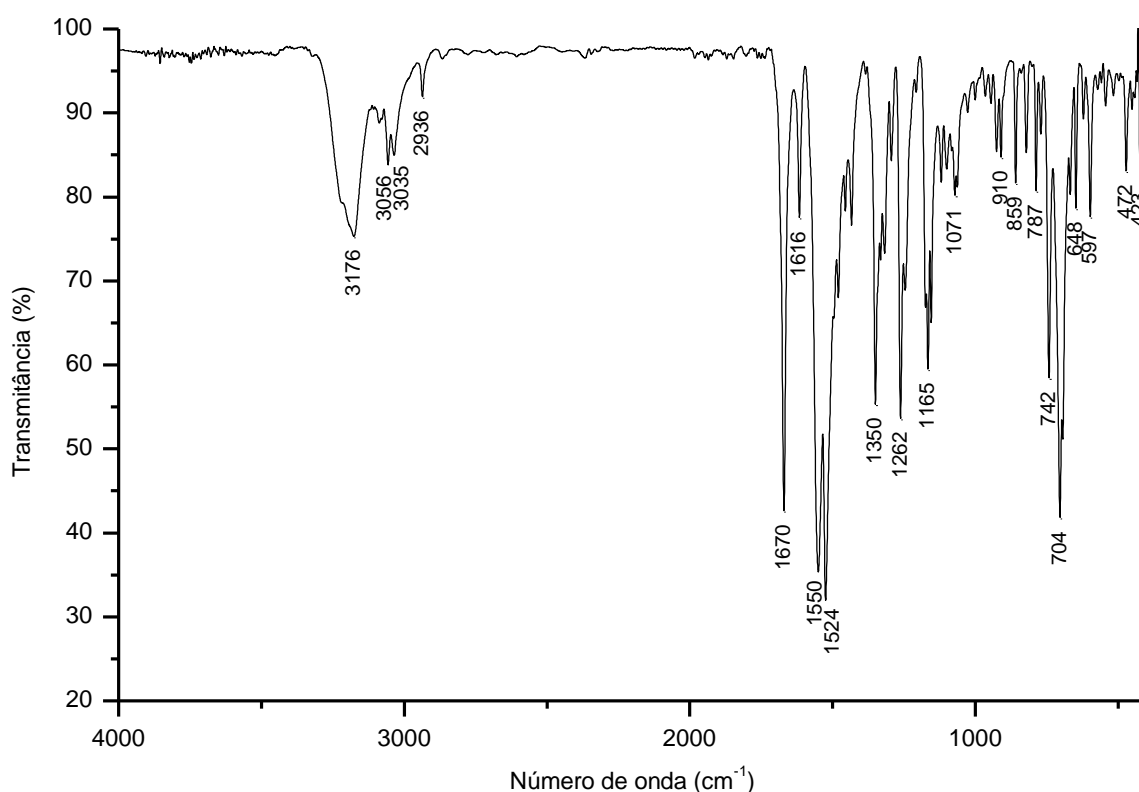
Recristalizado em etanol com rendimento de 73%. PF: 149 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3365, 3061, 1672, 1599, 1531, 1437, 1348, 1251, 1146, 1072, 902, 833, 786, 711, 681, 607, 511, 460. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7,29 (1H, t,  $^3J$  7,3 Hz), 7,44 (2H, t,  $^3J$  7,7 Hz), 7,70 (2H, d,  $^3J$  7,7 Hz), 7,83 (1H, t,  $^3J$  7,9 Hz), 8,37 (1H, d,  $^3J$  Hz), 8,49 (1H, d,  $^3J$  7,9 Hz), 8,79 (1H, s), 12,03 (1H, s, CONH), 12,44 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 123,7(+) (CH), 124,3(+) (CH), 126,4(+) (CH), 127,3(+) (CH), 128,7(+) (CH), 130,1(+) (CH), 133,9 (C), 135,1(+) (CH), 137,9 (C), 147,4 (C), 166,3 (C=O), 178,9 (C=S).

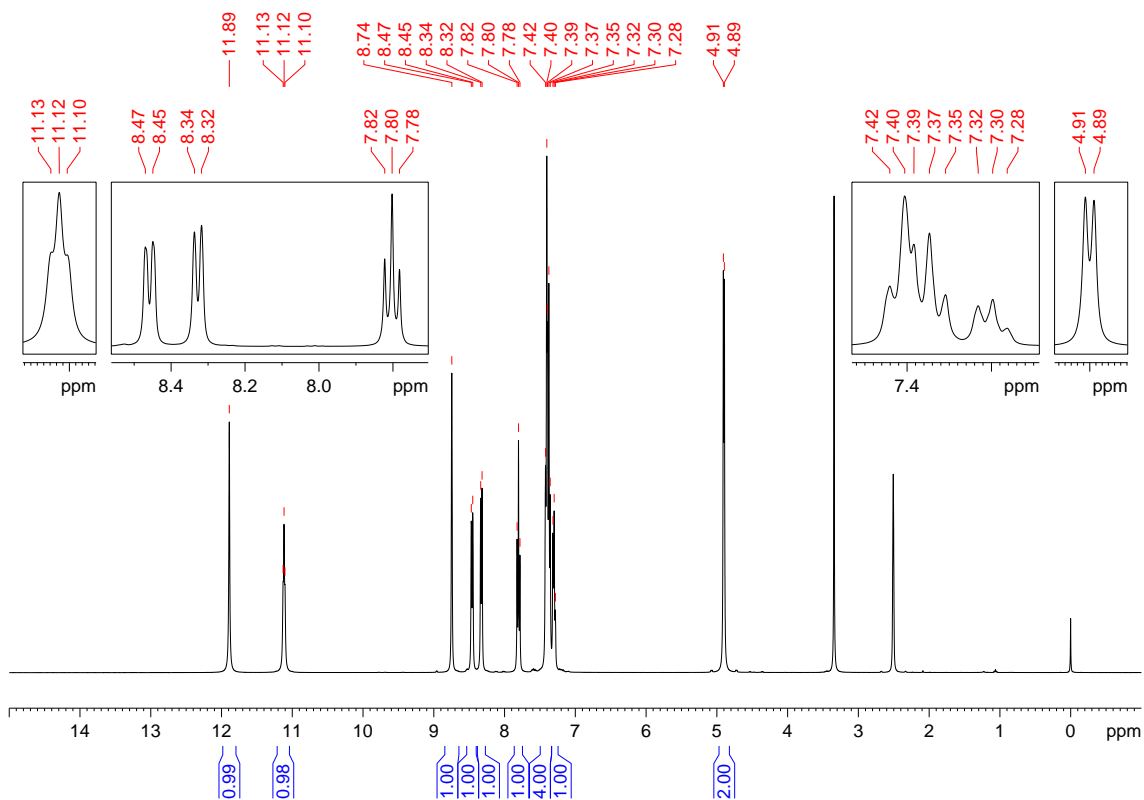
**Figura 139.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **32**.



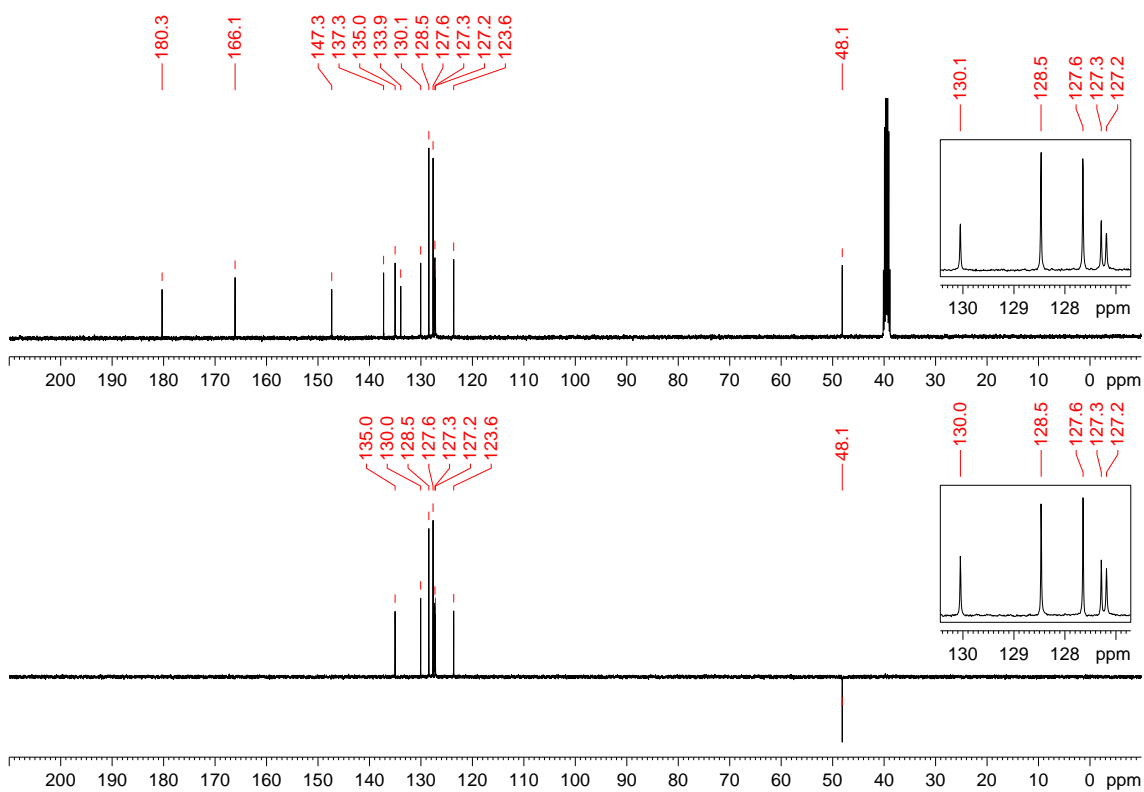
**(33) *N*-(3-nitrobenzoi)-*N'*-benzil-tioureia:****(33)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 73%. PF: 104 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3176, 3056, 3035, 2936, 1670, 1616, 1550, 1524, 1350, 1262, 1165, 1071, 910, 859, 787, 742, 704, 648, 597, 472, 423. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 4,90 (2H, d,  $^3J$  5,4 Hz), 7,30 (1H, t,  $^3J$  7,0 Hz), 7,35-7,42 (4H, m), 7,80 (1H, t,  $^3J$  8,1 Hz), 8,33 (1H, d,  $^3J$  7,0 Hz), 8,46 (1H, d,  $^3J$  8,1 Hz), 8,74 (1H, s), 11,12 (1H, t,  $^3J$  5,4 Hz,  $\text{CSNH}$ ), 11,89 (1H, s,  $\text{CONH}$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 123,6(+) (CH), 127,2(+) (CH), 127,3(+) (CH), 127,6(+) (CH), 128,5(+) (CH), 130,1(+) (CH), 133,9 (C), 135,0(+) (CH), 137,3 (C), 147,3 (C), 166,1 (C=O), 180,3 (C=S).

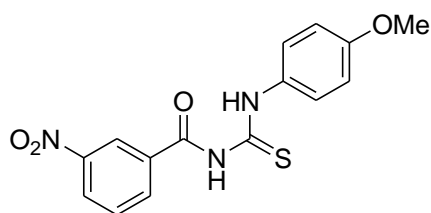
**Figura 142.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **33**.



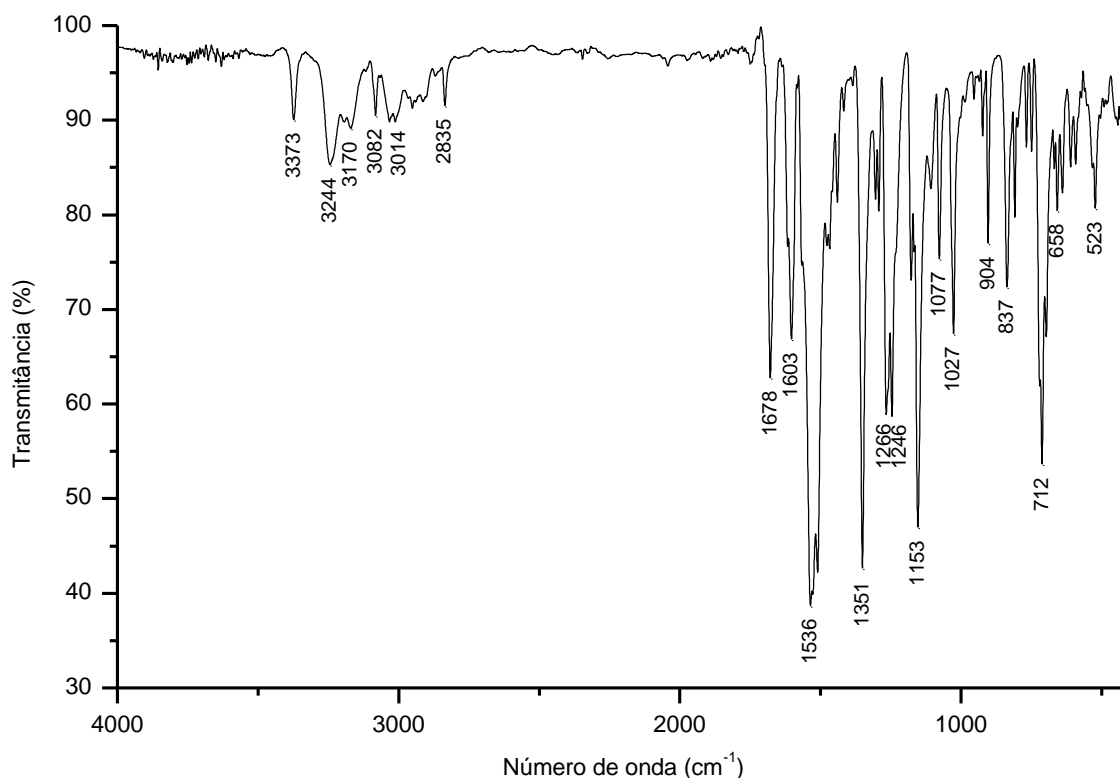
**Figura 143.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **33** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-d}_6$ ).

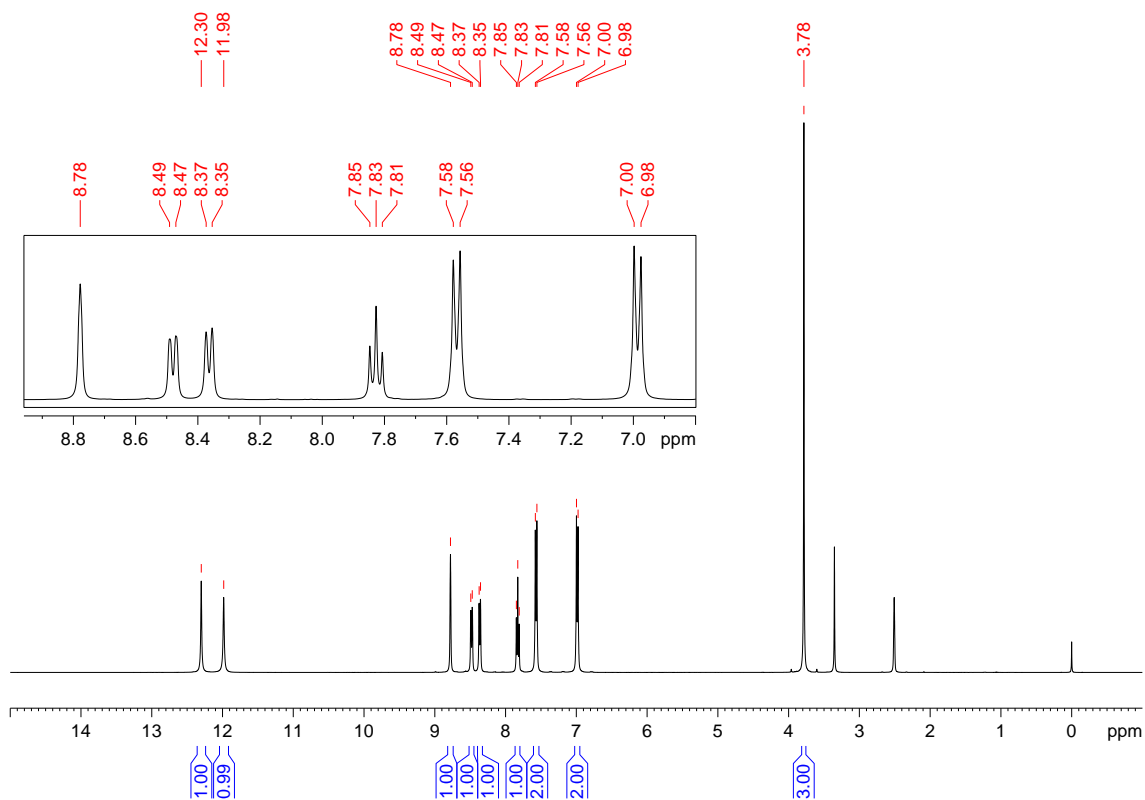


**Figura 144.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **33** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-d}_6$ ).

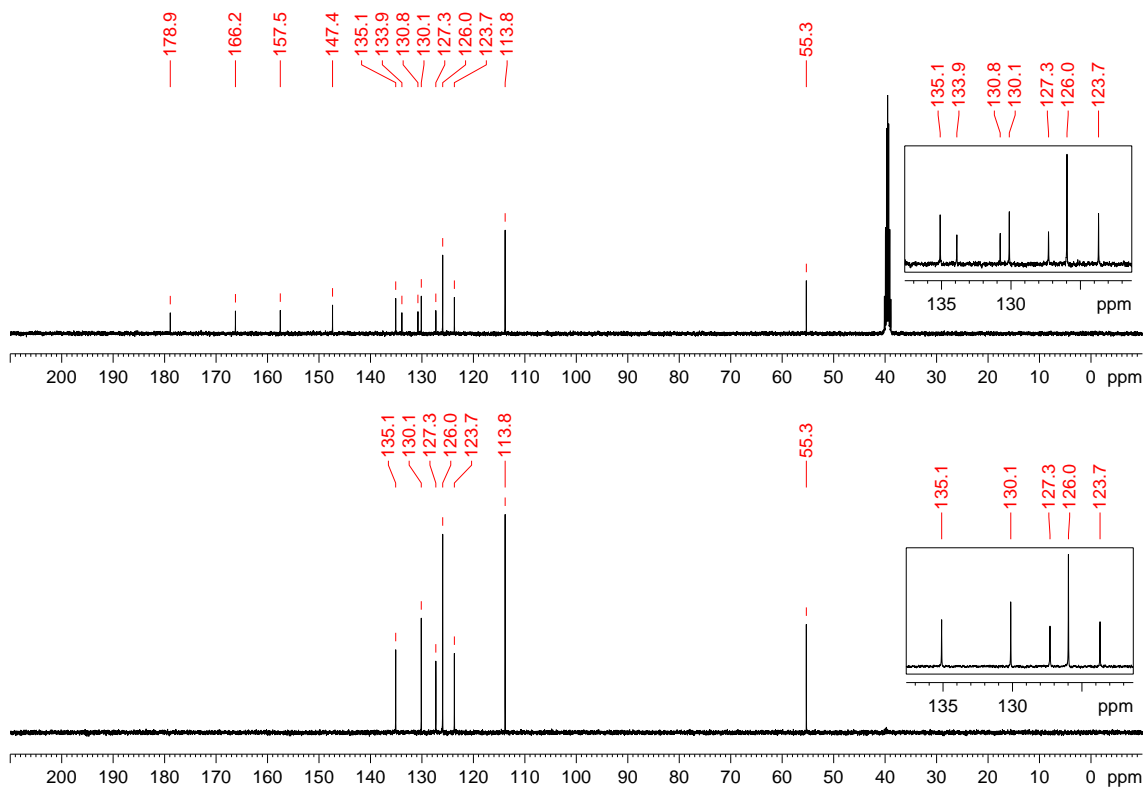
**(34) *N*-(3-nitrobenzoyl)-*N'*-(4-metoxifenil)-tiourea:****(34)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 77%. PF: 156 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3373, 3244, 3170, 3082, 3014, 2835, 1678, 1603, 1536, 1351, 1266, 1246, 1153, 1077, 904, 837, 712, 658, 523. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 3,78, (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 6,99 (2H, d,  $^3J$  8,9 Hz), 7,57 (2H, d,  $^3J$  8,9 Hz), 7,83 (1H, t,  $^3J$  8,1 Hz), 8,36 (1H, d,  $^3J$  8,1 Hz), 8,48 (1H, d,  $^3J$  8,1 Hz), 8,78 (s, 1H), 11,98 (s, 1H, CONH), 12,30 (s, 1H, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 55,3(+) ( $\text{OCH}_3$ ), 113,8(+) (CH), 123,7(+) (CH), 126,0(+) (CH), 127,3(+) (CH), 130,1(+) (CH), 130,8 (C), 133,9 (C), 135,1(+) (CH), 147,4 (C), 157,5 (C), 166,2 (C=O), 178,9 (C=S).

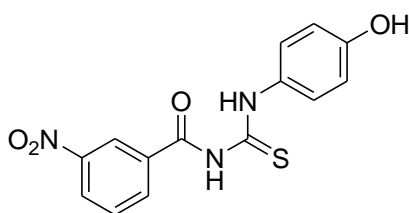
**Figura 145.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **34**.



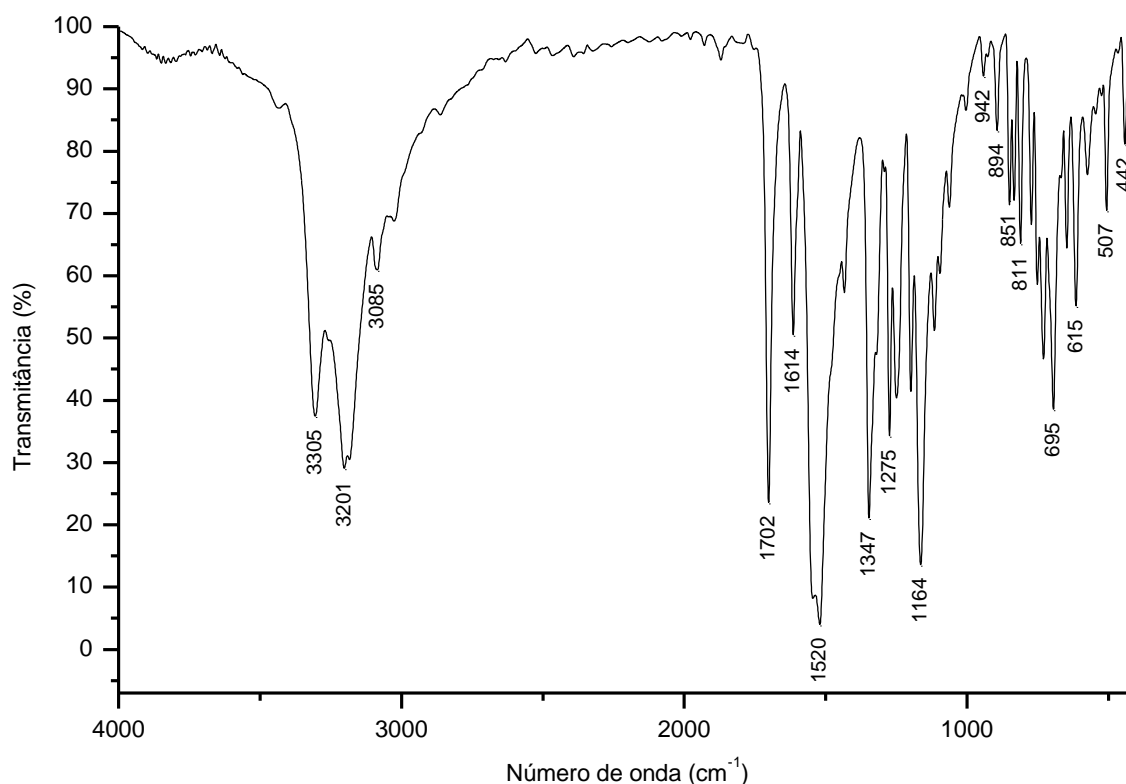
**Figura 146.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **34** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

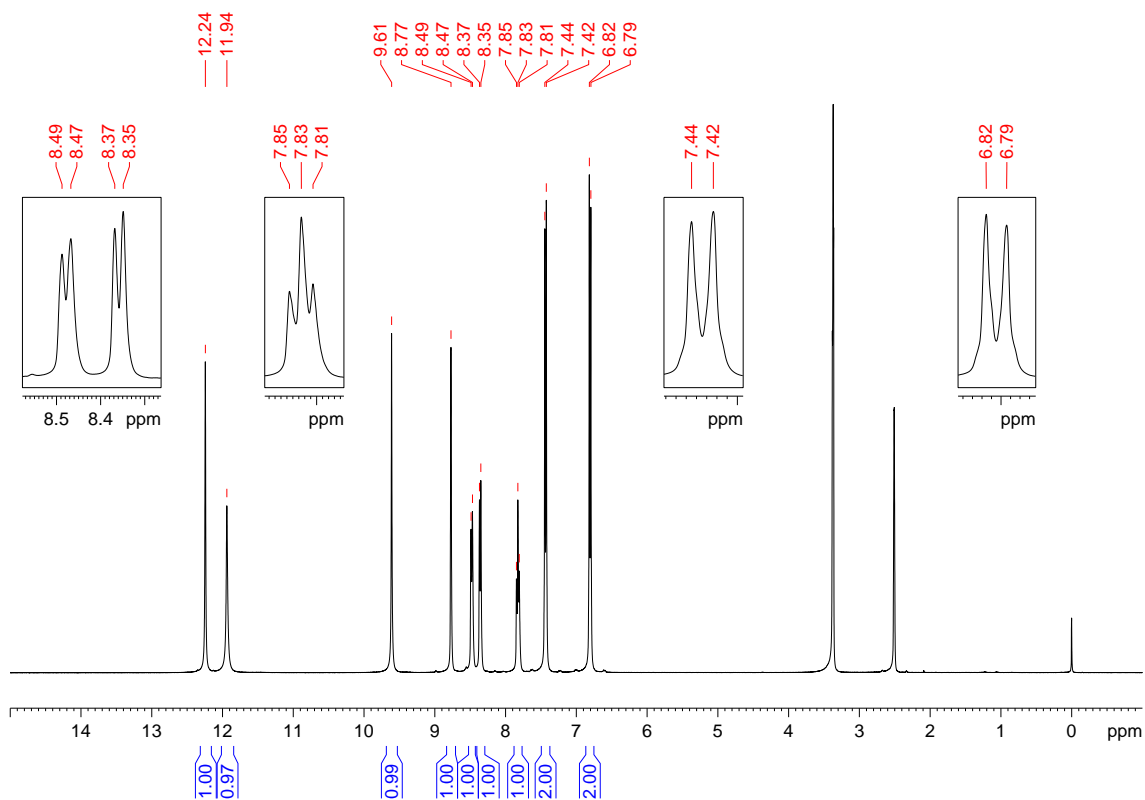


**Figura 147.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **34** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

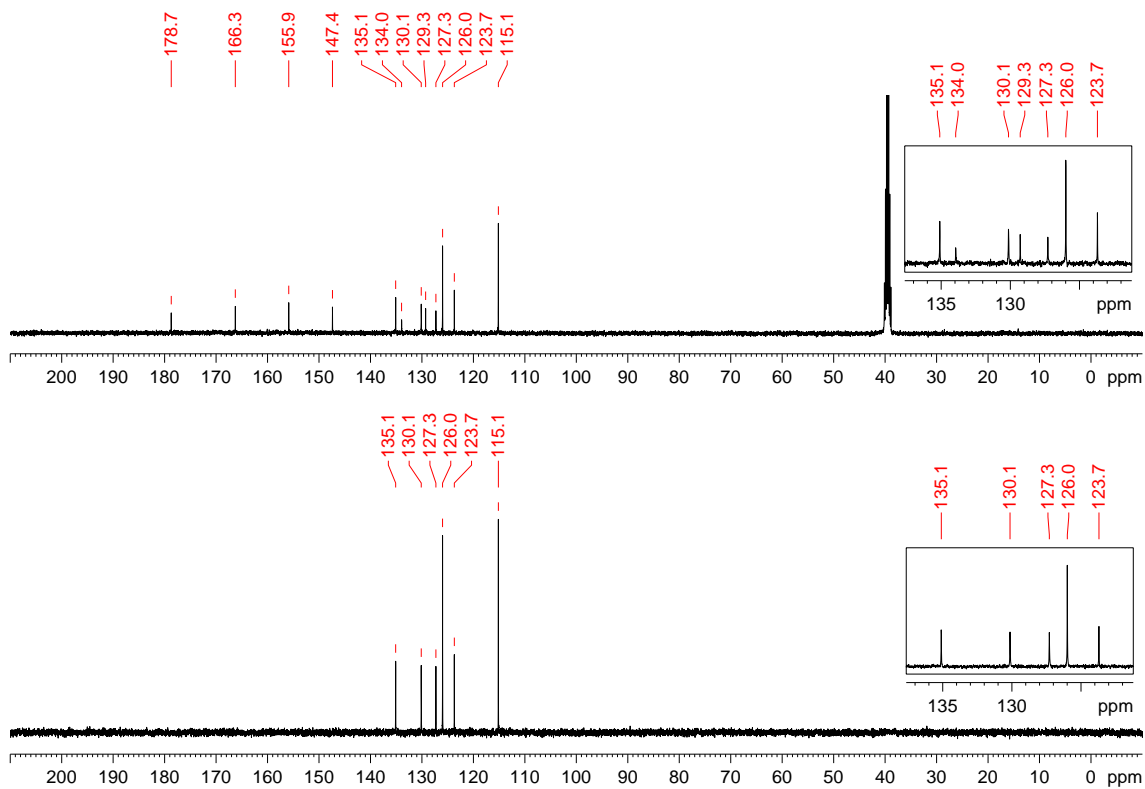
**(35) *N*-(3-nitrobenzoi)-*N'*-(4-hidroxifenil)-tiourea:****(35)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 81%. PF: 195 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3305, 3201, 3085, 1702, 1614, 1520, 1347, 1275, 1164, 942, 894, 851, 811, 695, 615, 507, 442. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 6,80 (2H, d,  $^3J$  8,6 Hz), 7,43 (2H, d,  $^3J$  8,6 Hz), 7,83 (1H, t,  $^3J$  7,9 Hz), 8,36 (1H, d,  $^3J$  7,9 Hz), 8,48 (1H, d,  $^3J$  7,9 Hz), 8,77 (1H, s), 9,61 (1H, s, OH), 11,94 (1H, s, CONH), 12,24 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 115,1(+) (CH), 123,7(+) (CH), 126,0(+) (CH), 127,3(+) (CH), 129,3 (C), 130,1(+) (CH), 134,0 (C), 135,1(+) (CH), 147,4 (C), 155,9 (C), 166,3 (C=O), 178,7 (C=S).

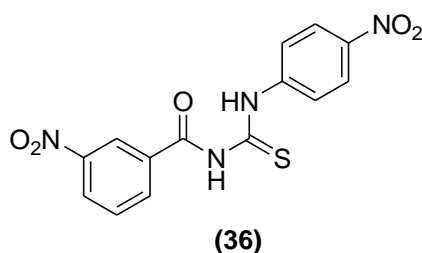
**Figura 148.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **35**.



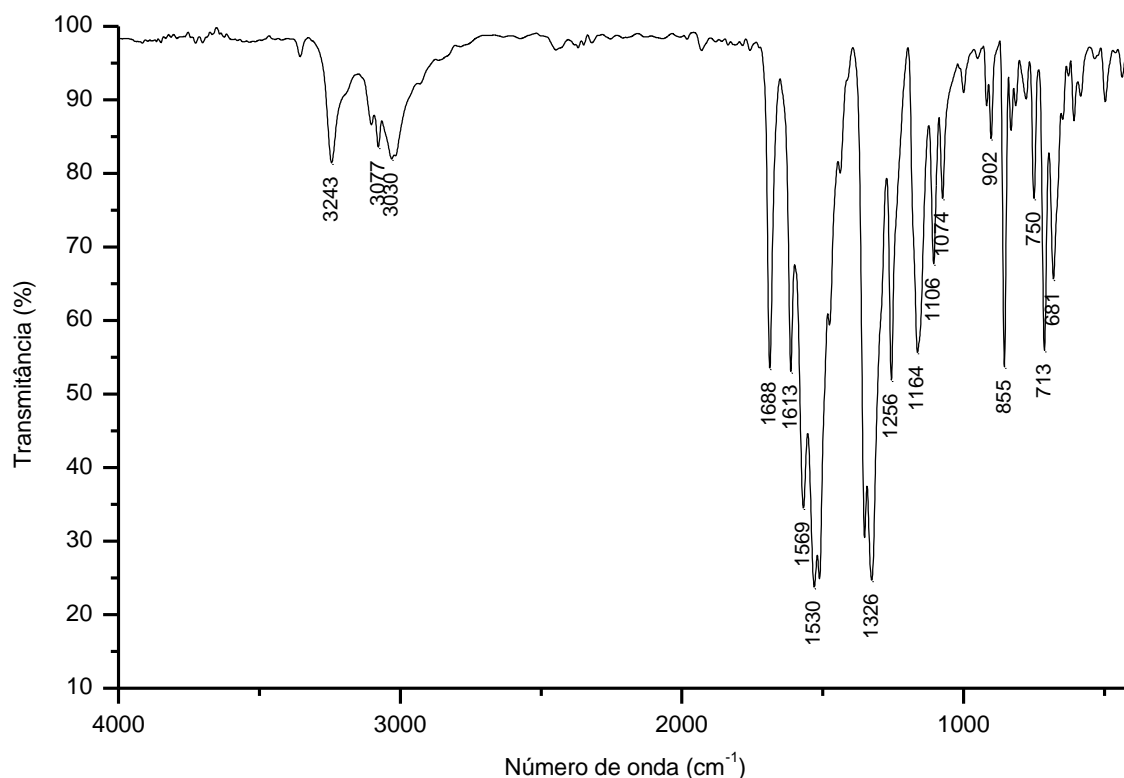
**Figura 149.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **35** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



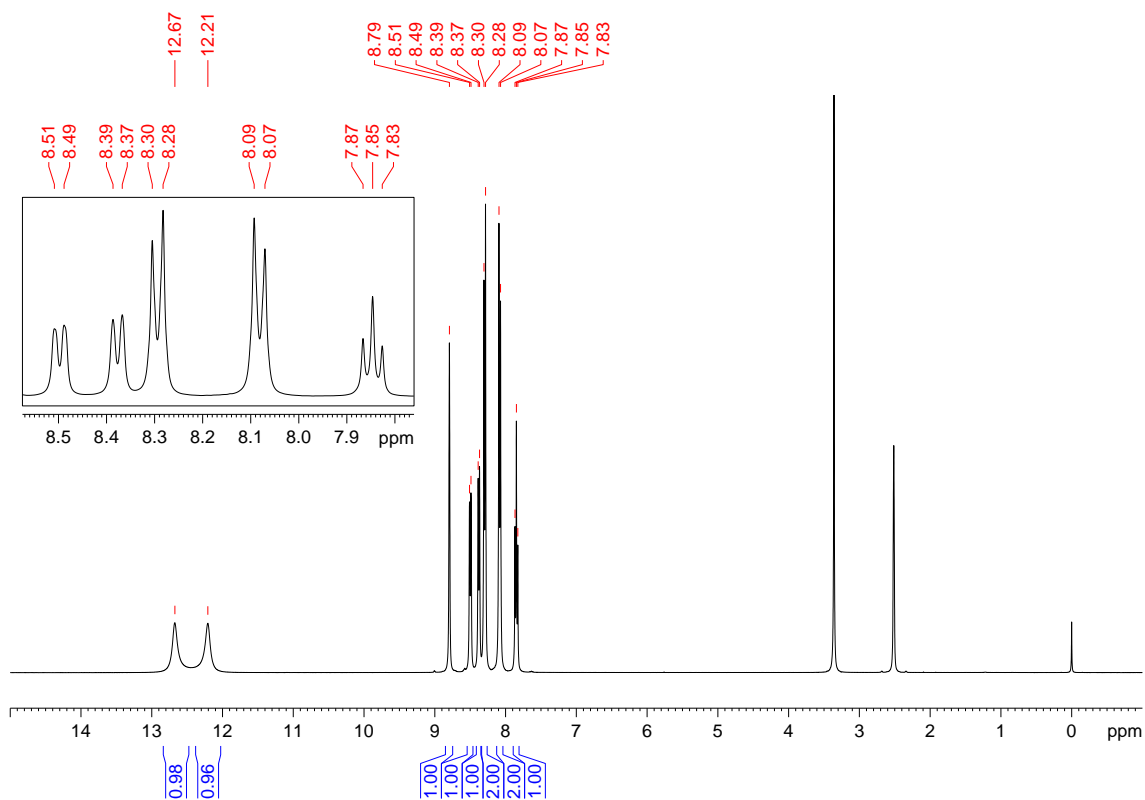
**Figura 150.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **35** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

**(36) *N*-(3-nitrobenzoil)-*N'*-(4-nitrofenil)-tiourea:**

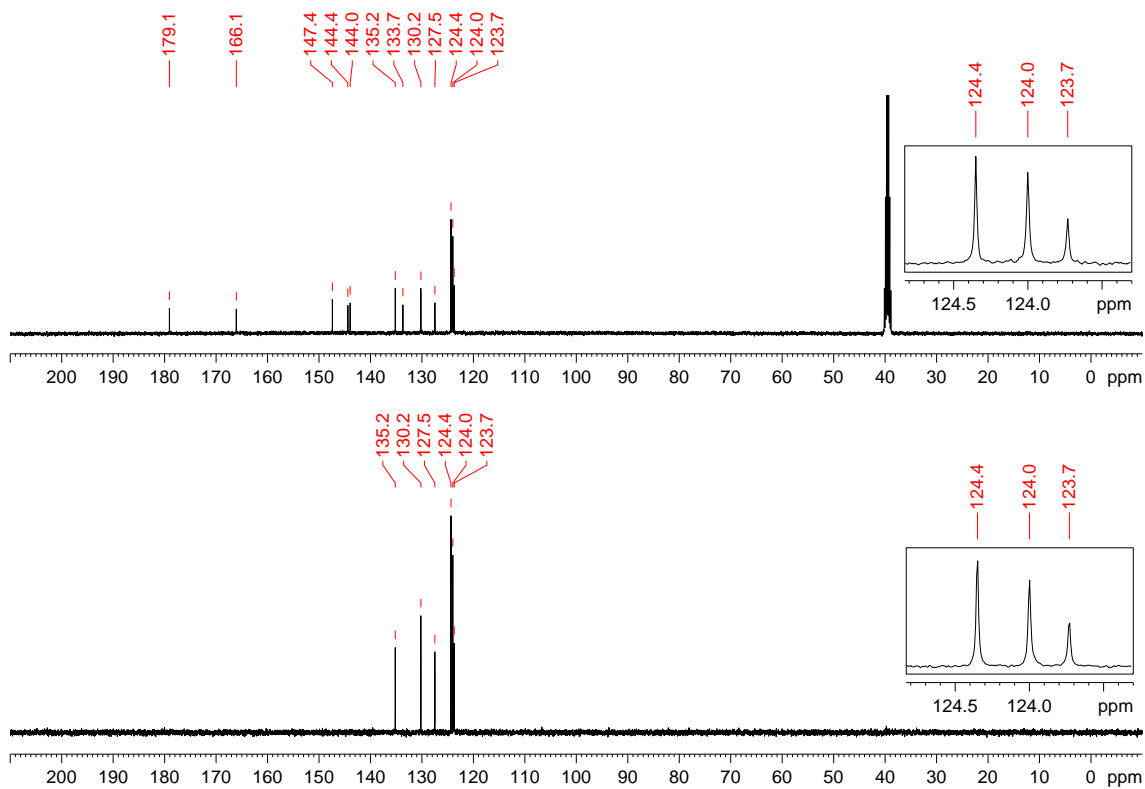
Recristalizado em etanol/acetona com rendimento de 89%. PF: 173 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3243, 3077, 3030, 1688, 1613, 1569, 1530, 1326, 1256, 1164, 1106, 1074, 902, 855, 750, 713, 681. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7,85 (1H, t,  $^3J$  7,9 Hz), 8,08 (2H, d,  $^3J$  8,9 Hz), 8,29 (2H, d,  $^3J$  8,9 Hz), 8,38 (1H, d,  $^3J$  7,9 Hz), 8,50 (1H, d,  $^3J$  7,9 Hz), 8,79 (1H, s), 12,21 (1H, s, CONH), 12,67 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 123,7(+) (CH), 124,0(+) (CH), 124,4(+) (CH), 127,5(+) (CH), 130,2(+) (CH), 133,7 (C), 135,2(+) (CH), 144,0 (C), 144,4 (C), 147,4 (C), 166,1 (C=O), 179,1 (C=S).



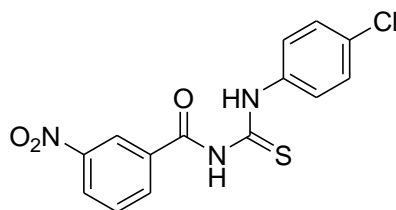
**Figura 151.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **36**.



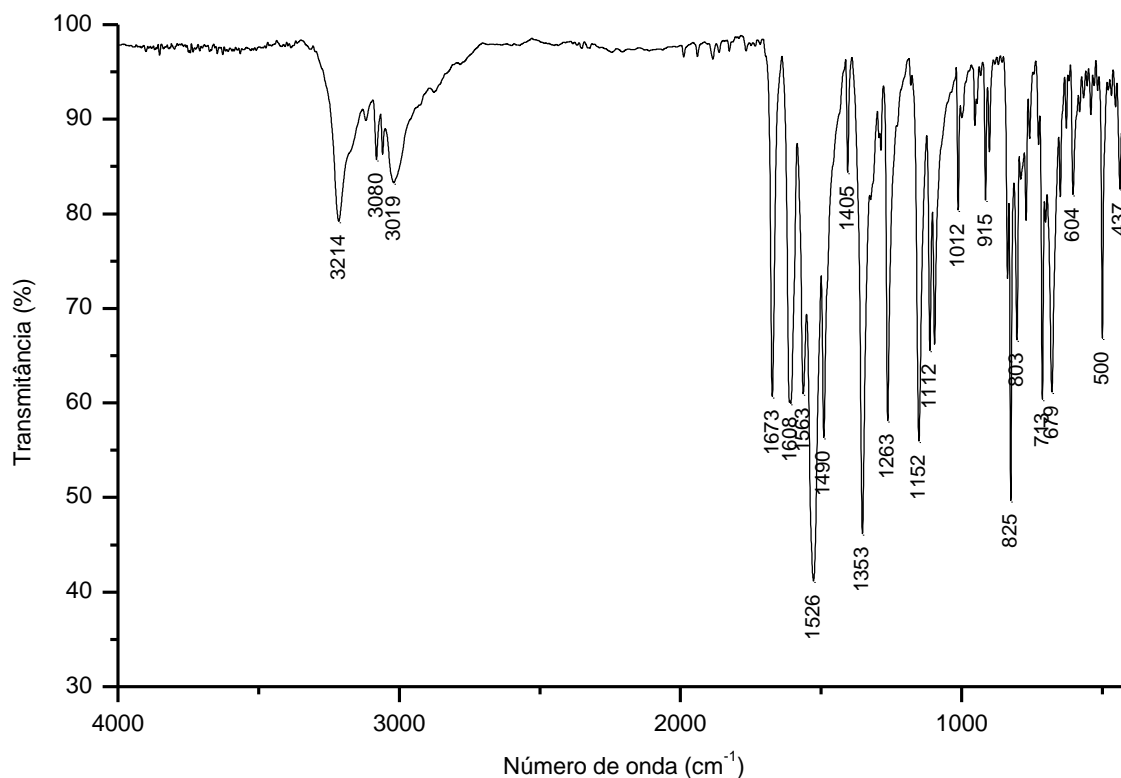
**Figura 152.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **36** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

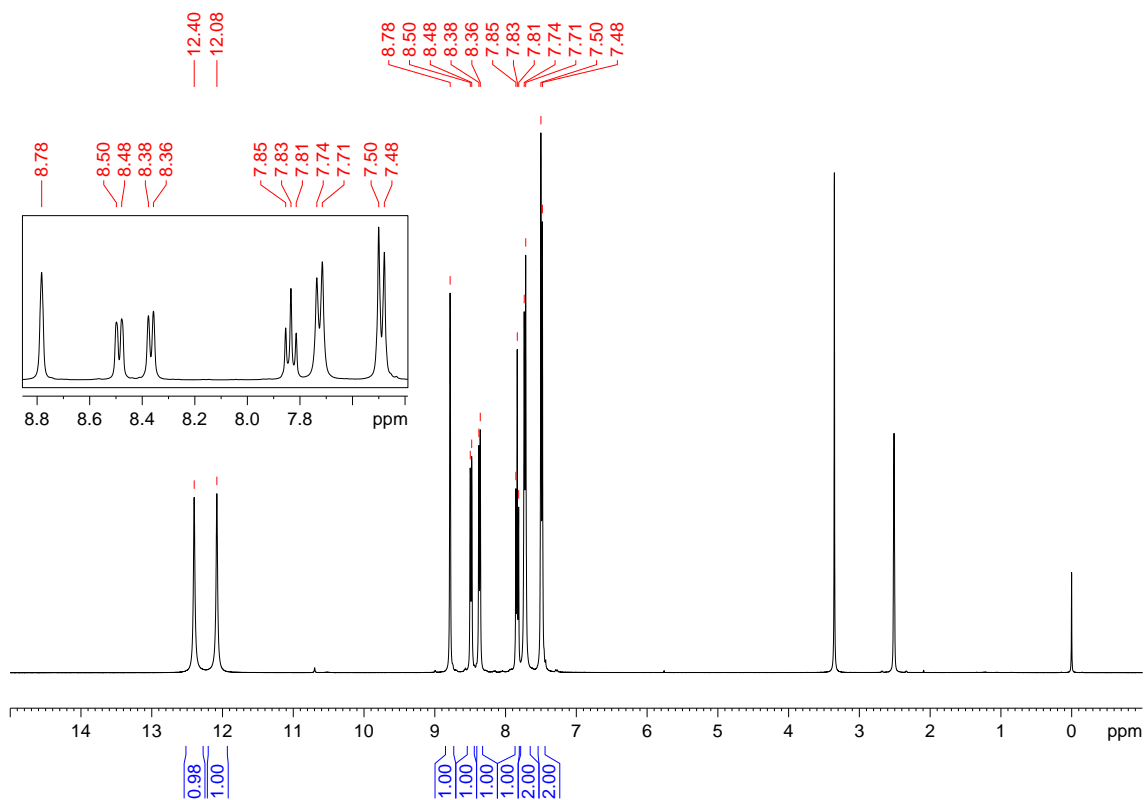


**Figura 153.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **36** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

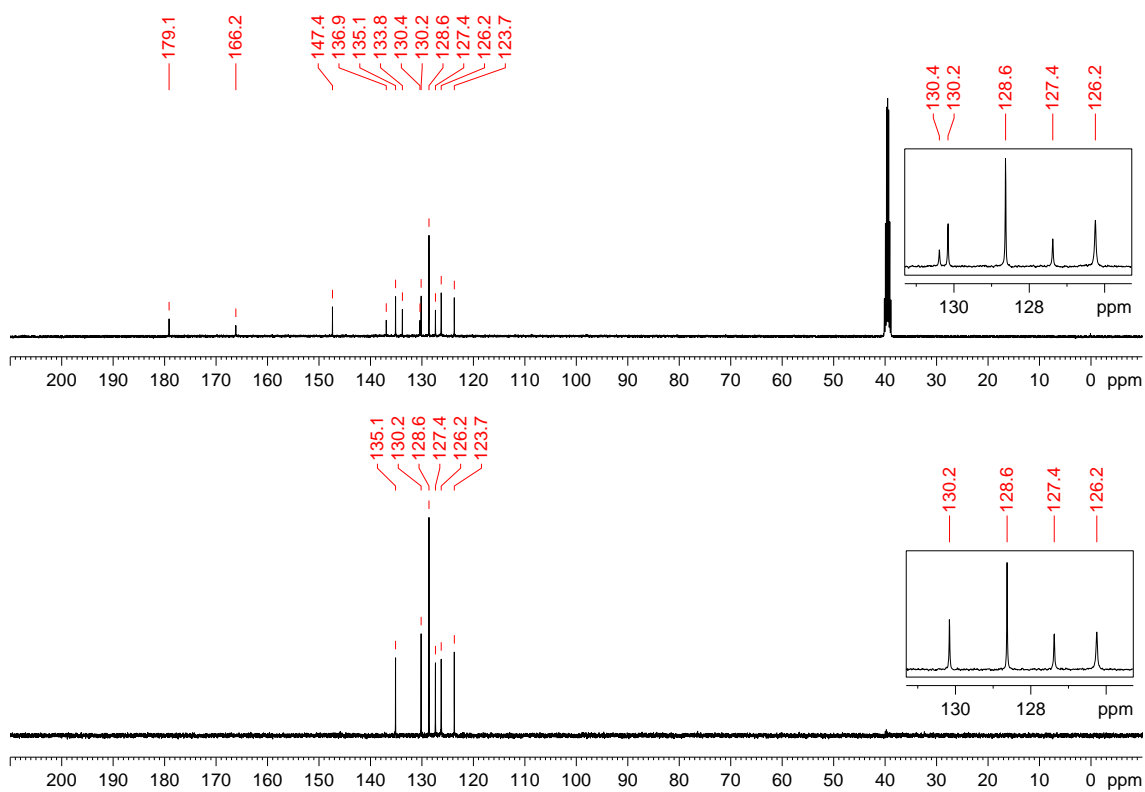
**(37) *N*-(3-nitrobenzoyl)-*N'*-(4-clorofenil)-tiureia:****(37)**

Recristalizado em etanol/acetona com rendimento de 89%. PF: 155 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3214, 3080, 3019, 1673, 1608, 1563, 1526, 1490, 1405, 1353, 1263, 1152, 1112, 1012, 915, 825, 803, 713, 679, 604, 500, 437. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7,49 (2H, d,  $^3J$  8,5 Hz), 7,72 (2H, d,  $^3J$  8,5 Hz), 7,83 (1H, t,  $^3J$  7,9 Hz), 8,37 (1H, d,  $^3J$  7,9 Hz), 8,49 (1H, d,  $^3J$  7,9 Hz), 8,78 (1H, s), 12,08 (1H, s, CONH), 12,40 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 123,7(+) (CH), 126,2(+) (CH), 127,4(+) (CH), 128,6(+) (CH), 130,2(+) (CH), 130,4 (C), 133,8 (C), 135,1(+) (CH), 136,9 (C), 147,4 (C), 166,2 (C=O), 179,1 (C=S).

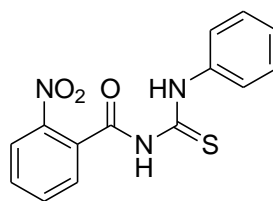
**Figura 154.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **37**.



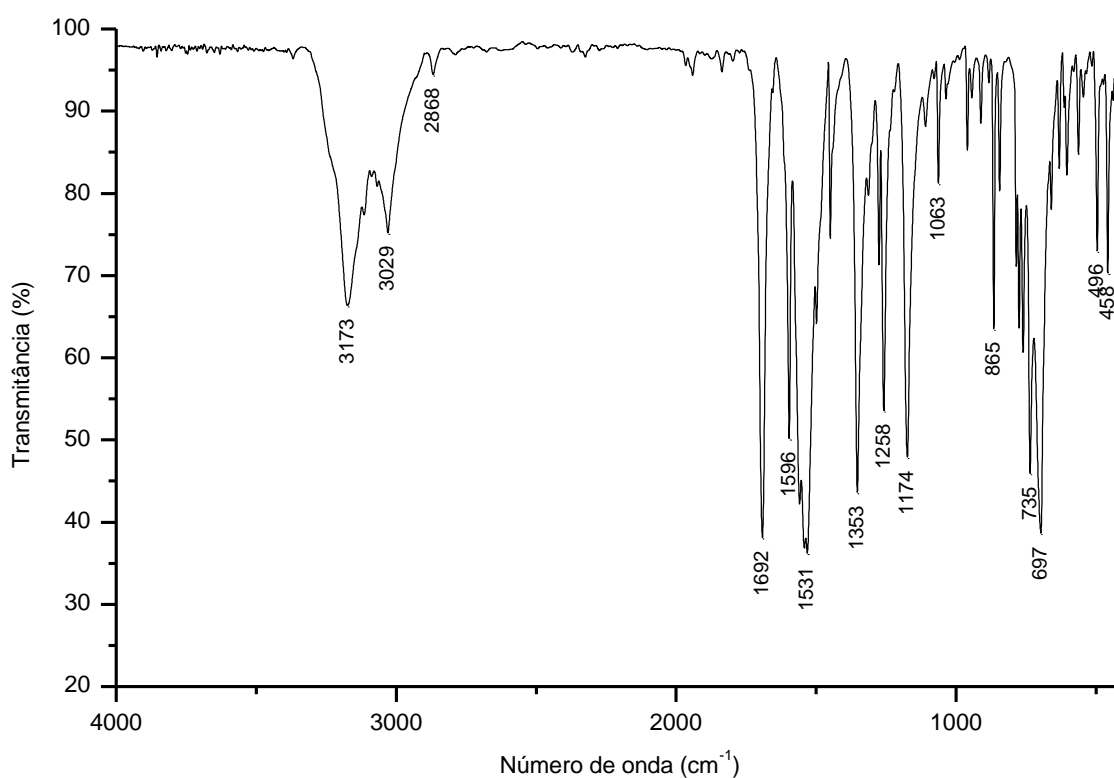
**Figura 155.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **37** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

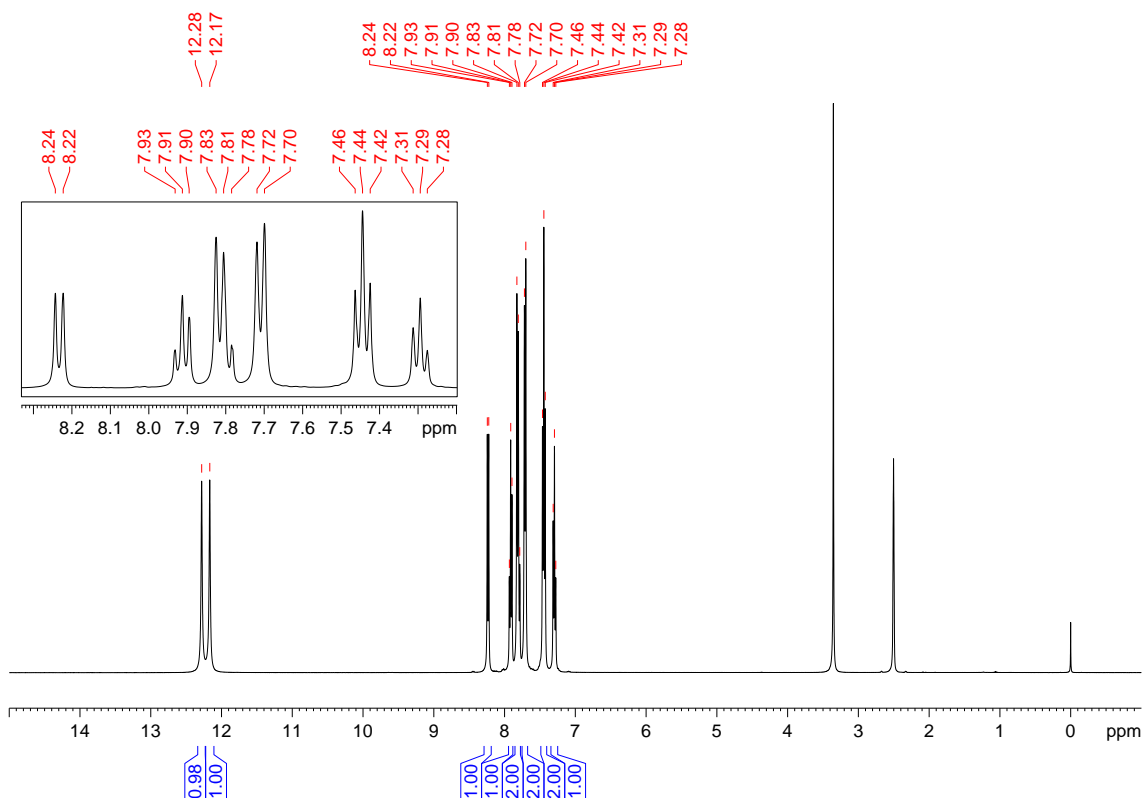


**Figura 156.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **37** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

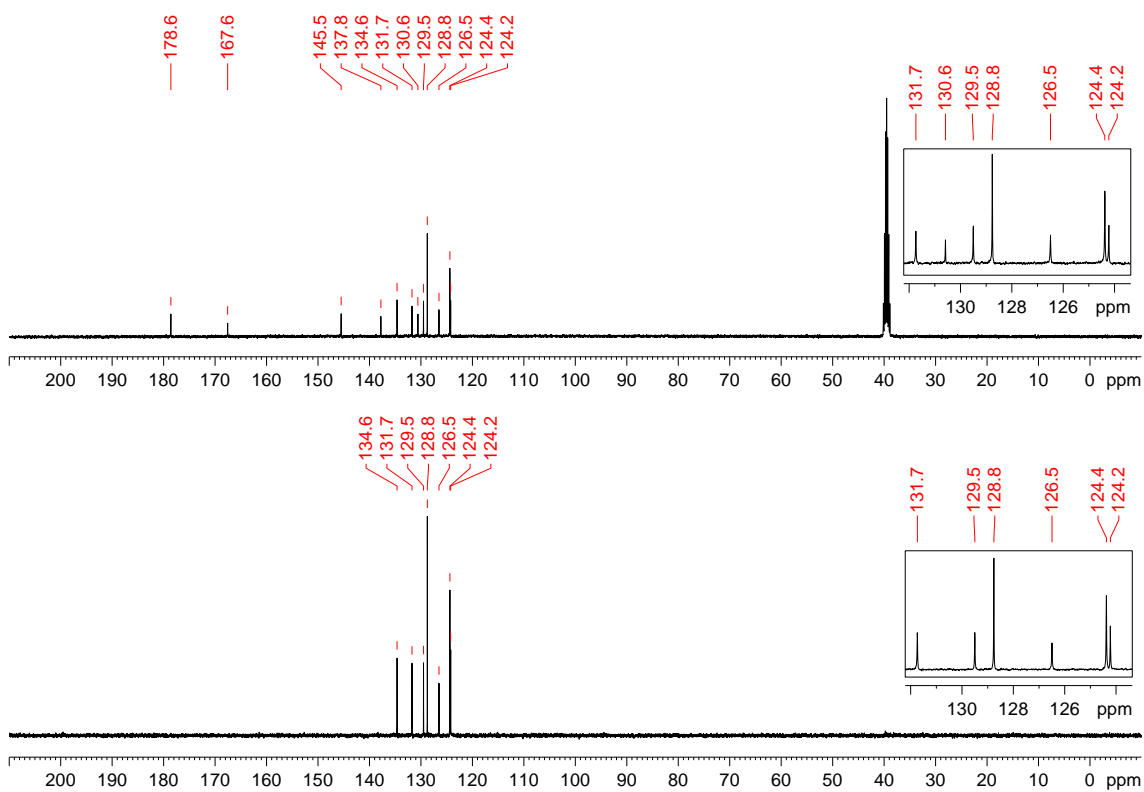
**(38) *N*-(2-nitrobenzoi)-*N'*-fenil-tioureia:****(38)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 82%. PF: 172 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3173, 3029, 2868, 1692, 1596, 1531, 1353, 1258, 1174, 1063, 865, 735, 697, 496, 458. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7,29 (1H, t,  $^3J$  7,4 Hz), 7,44 (2H, t,  $^3J$  7,8), 7,71 (2H, d,  $^3J$  7,6), 7,81 (2H, m), 7,91 (1H, m), 8,23 (2H, d,  $^3J$  8,2 Hz), 12,17 (1H, s, CONH), 12,28 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 124,2(+) (CH), 124,4(+) (CH), 126,5(+) (CH), 128,8(+) (CH), 129,5(+) (CH), 130,6 (C), 131,7(+) (CH), 134,6(+) (CH), 137,8 (C), 145,5 (C), 167,6 (C=O), 178,6 (C=S).

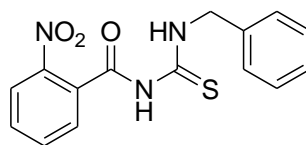
**Figura 157.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **38**.



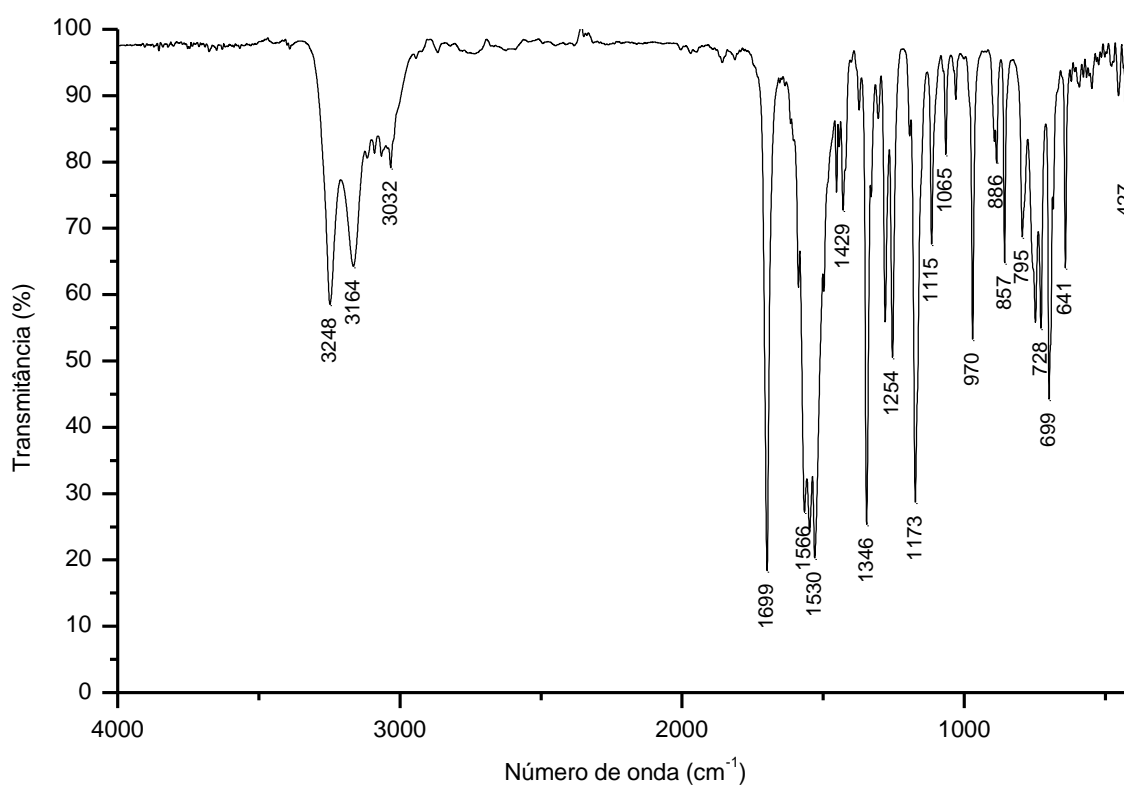
**Figura 158.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **38** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

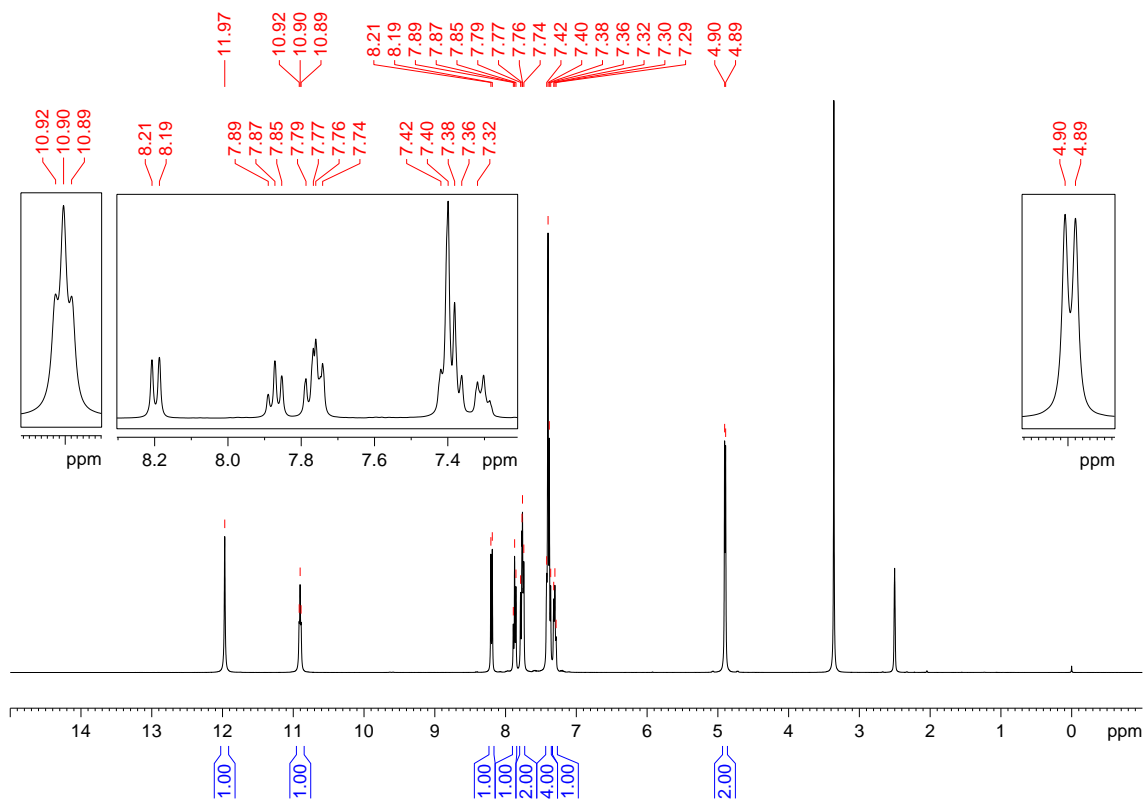


**Figura 159.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **38** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

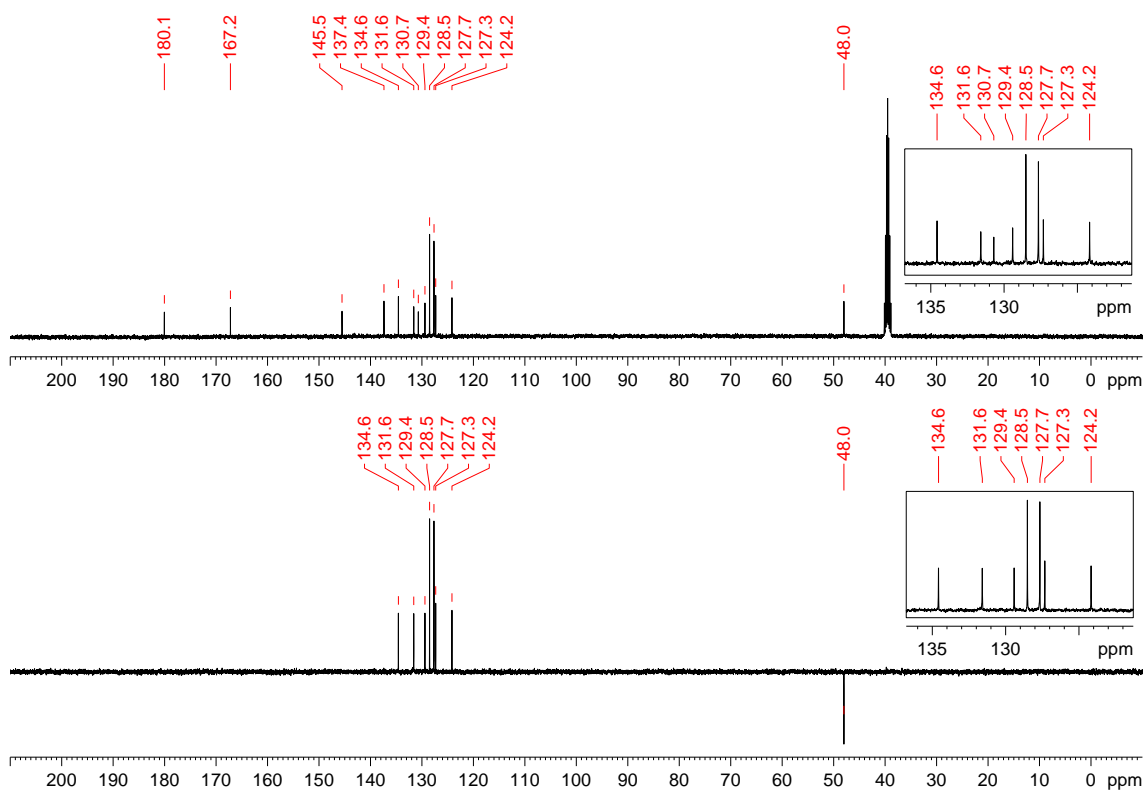
**(39) *N*-(2-nitrobenzoyl)-*N'*-benzil-tioureia:****(39)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 60%. PF: 156 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3248, 3164, 3032, 1699, 1566, 1530, 1429, 1346, 1254, 1173, 1115, 1065, 970, 886, 857, 795, 728, 699, 641, 427. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 4,90 (2H, d,  $^3J$  5,5 Hz), 7,30 (1H, t,  $^3J$  6,7 Hz), 7,36-7,42 (4H, m), 7,74-7,79 (2H, m), 7,87 (1H, t,  $^3J$  7,3 Hz), 8,20 (1H, d,  $^3J$  8,0 Hz), 10,90 (1H, t,  $^3J$  5,5 Hz, CSNH), 11,97 (1H, s, CONH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 48,0(-) ( $\text{CH}_2$ ), 124,2(+) (CH), 127,3(+) (CH), 127,7(+) (CH), 128,5(+) (CH), 129,4(+) (CH), 130,7 (C), 131,6(+) (CH), 134,6(+) (CH), 137,4 (C), 145,5 (C), 167,2 (C=O), 180,1 (C=S).

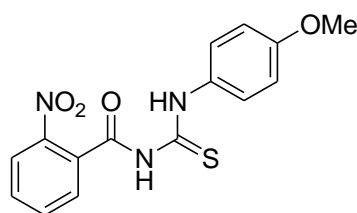
**Figura 160.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **39**.



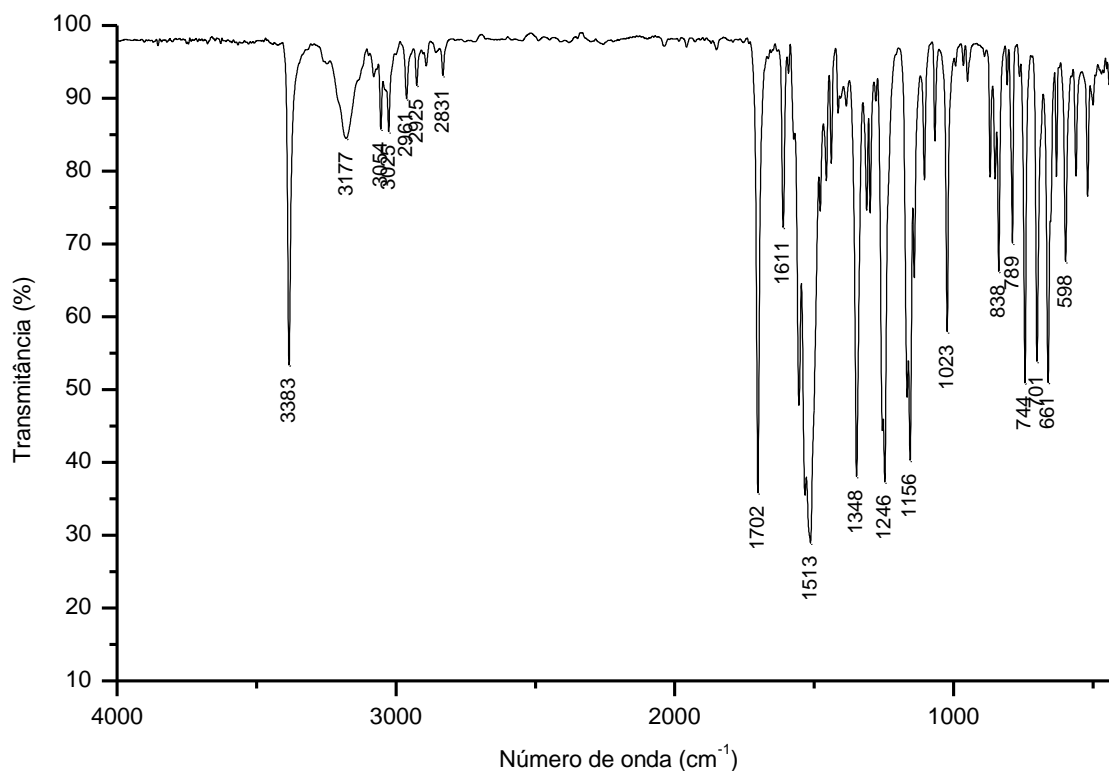
**Figura 161.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **39** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

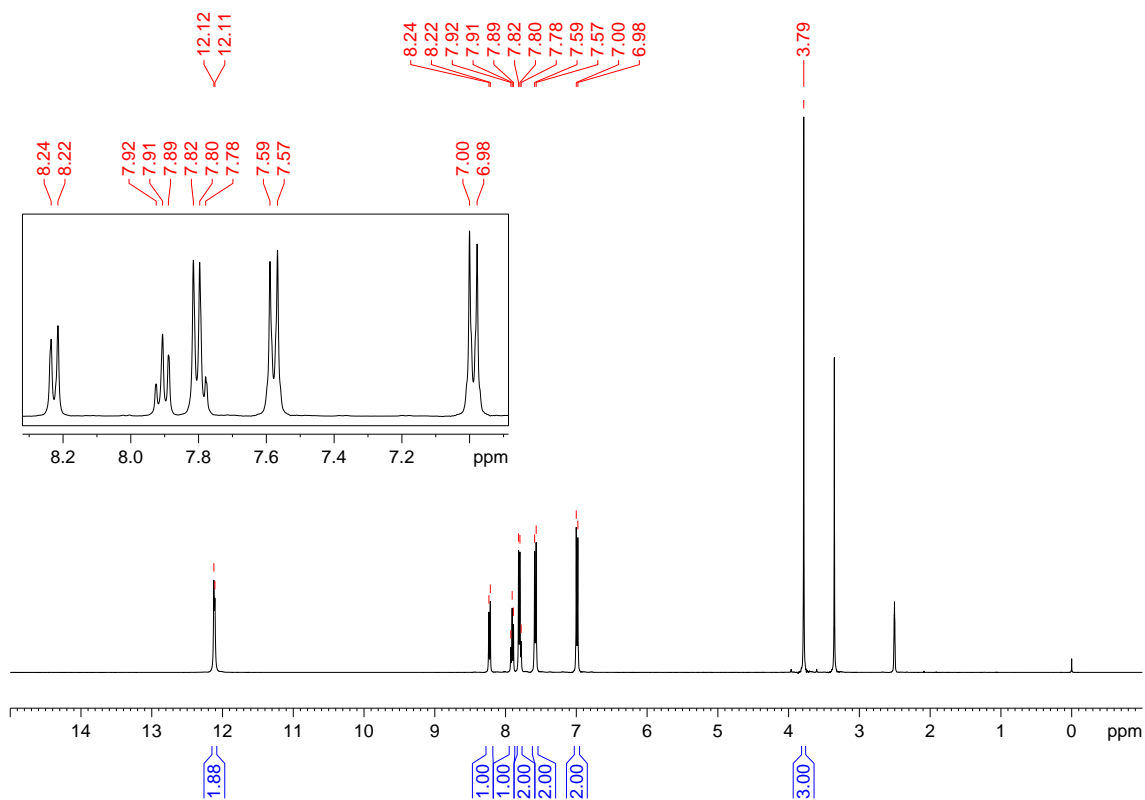


**Figura 162.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **39** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

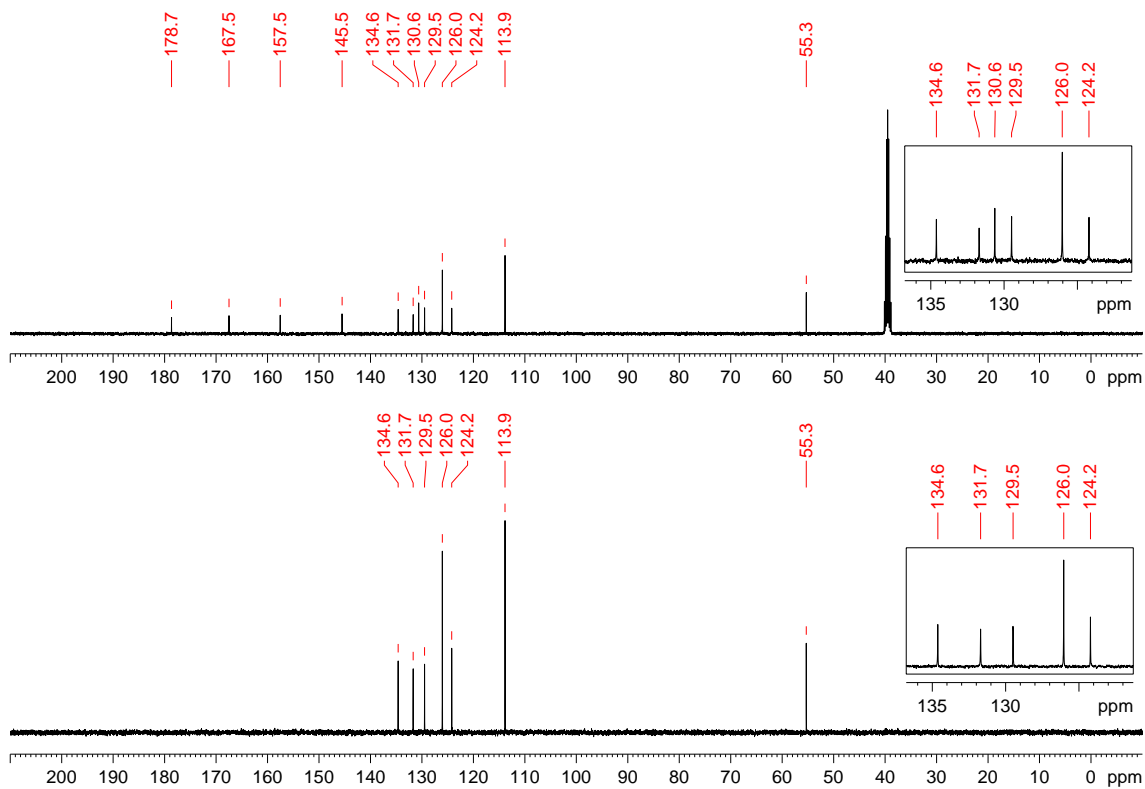
**(40) *N*-(2-nitrobenzoyl)-*N'*-(4-metoxifenil)-tiourea:****(40)**

Recristalizado em etanol/acetona com rendimento de 76%. PF: 179 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3383, 3177, 3054, 3025, 2961, 2925, 2831, 1702, 1611, 1513, 1348, 1246, 1156, 1023, 838, 789, 744, 701, 661, 598. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 3,79 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 6,99 (2H, d,  $^3J$  9,0 Hz), 7,58 (2H, d,  $^3J$  9,0 Hz), 7,78-7,82 (2H, m), 7,91 (1H, t,  $^3J$  7,4 Hz), 8,23 (1H, d,  $^3J$  7,4 Hz), 12,11 (1H, s, CONH), 12,12 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 55,3(+) ( $\text{OCH}_3$ ), 113,9(+) (CH), 124,2(+) (CH), 126,0(+) (CH), 129,5(+) (CH), 130,6 (C), 131,7(+) (CH), 134,6(+) (CH), 145,5 (C), 157,5 (C), 167,5 (C=O), 178,7 (C=S).

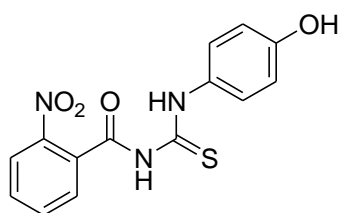
**Figura 163.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **40**.



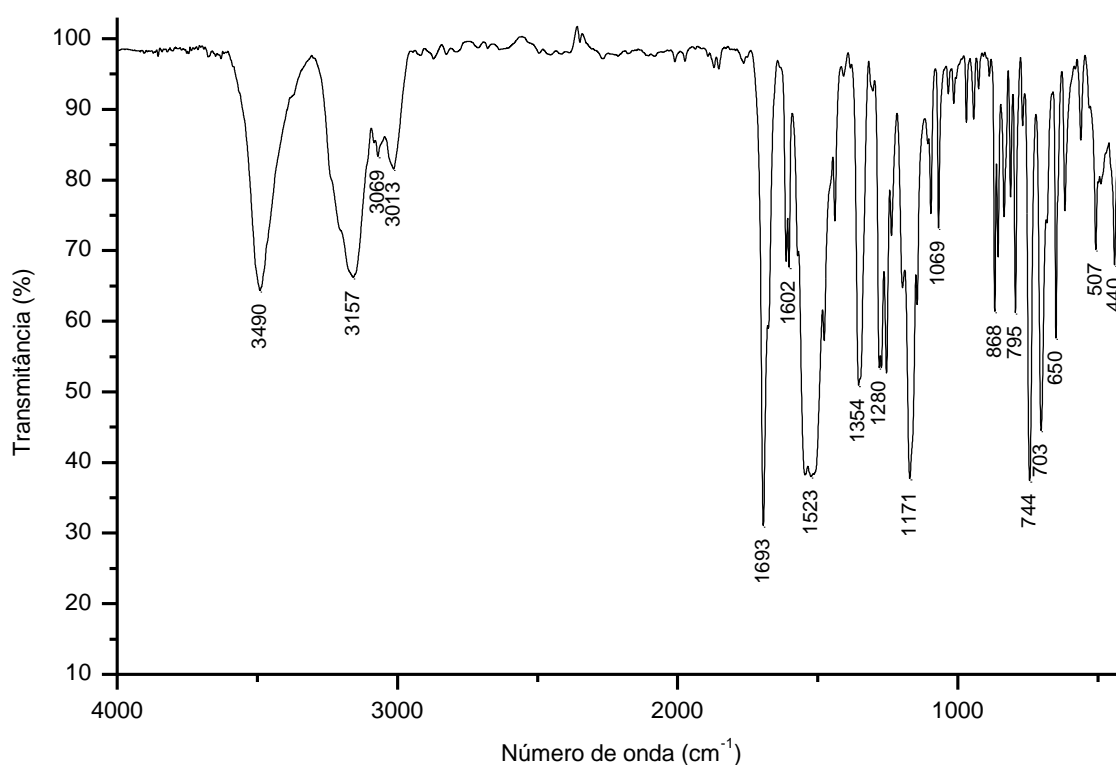
**Figura 164.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **40** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

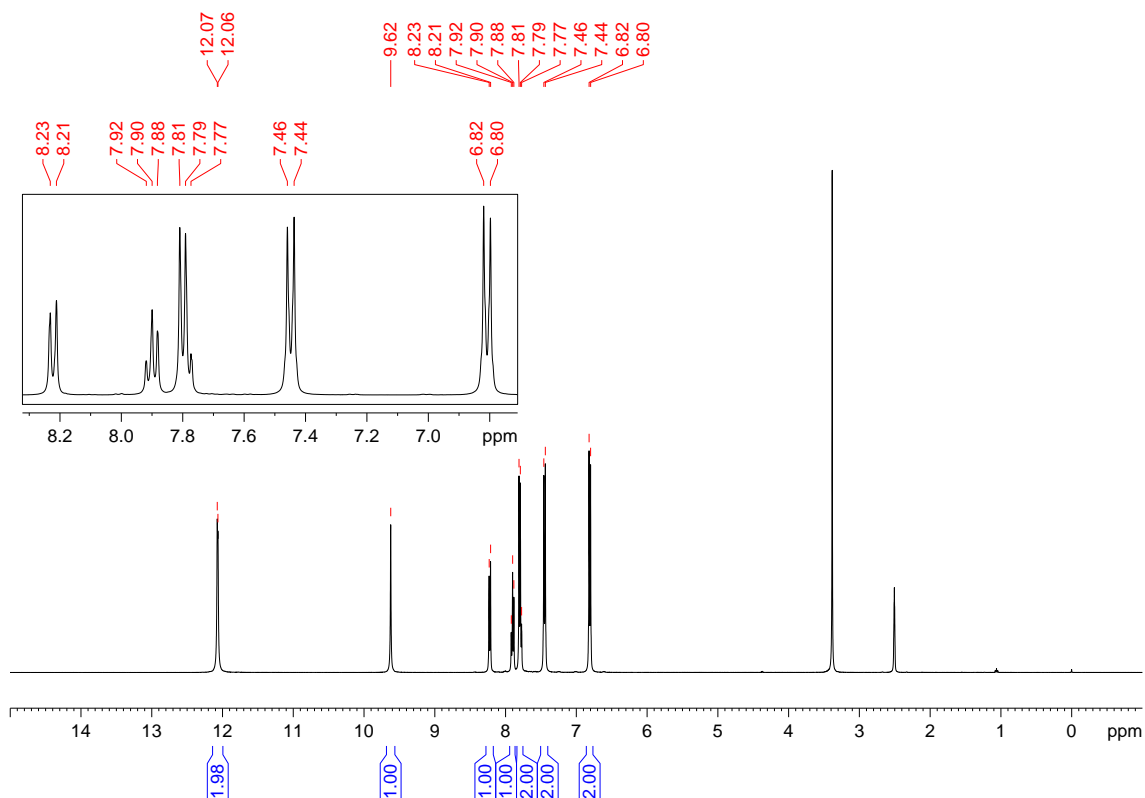


**Figura 165.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **40** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

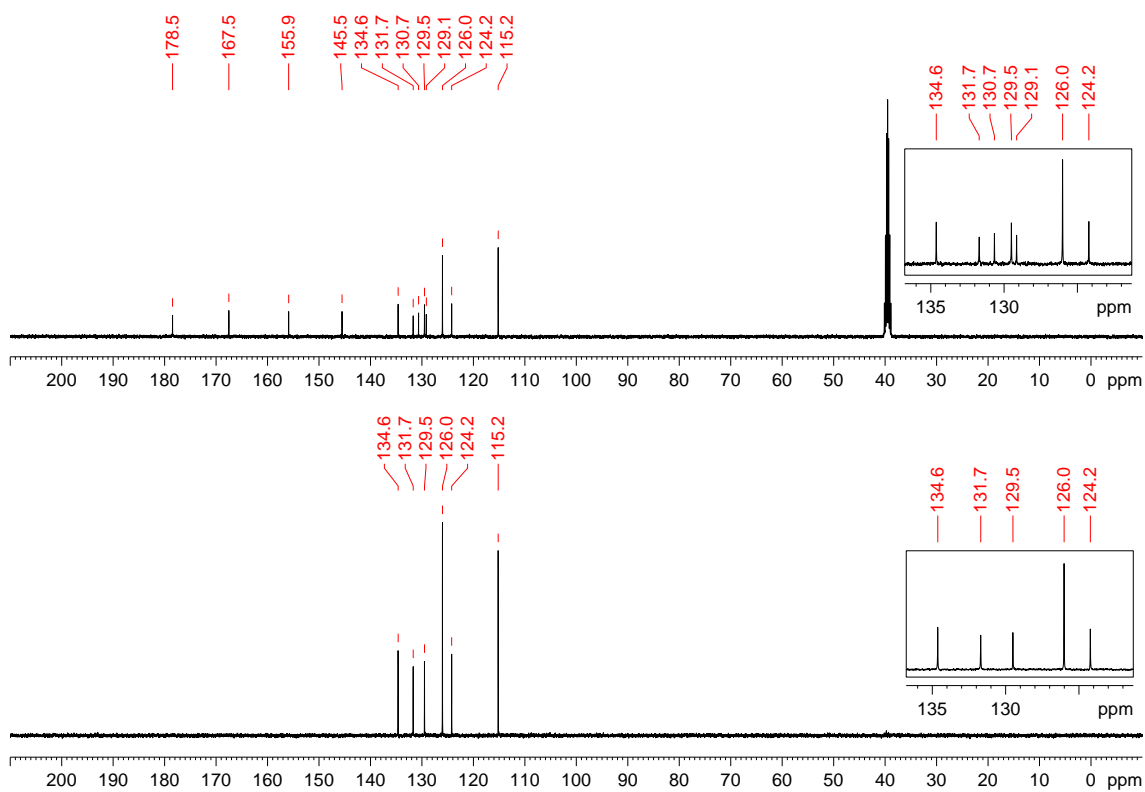
**(41) *N*-(2-nitrobenzoyl)-*N'*-(4-hidroxifenil)-tioureia:****(41)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 73%. PF: 215 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3490, 3157, 3069, 3013, 1693, 1602, 1523, 1354, 1280, 1171, 1069, 868, 795, 744, 703, 650, 507, 440. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 6,81 (2H, d,  $^3J$  8,8 Hz), 7,45 (2H, d,  $^3J$  8,8 Hz), 7,77-7,81 (2H, m), 7,90 (1H, t,  $^3J$  7,3 Hz), 8,22 (1H, d,  $^3J$  7,8 Hz), 12,06 (1H, s, CONH), 12,07 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 115,2(+) (CH), 124,2(+) (CH), 126,0(+) (CH), 129,1 (C), 129,5(+) (CH), 130,7 (C), 131,7(+) (CH), 134,6(+) (CH), 145,5 (C), 155,9 (C), 167,5 (C=O), 178,5 (C=S).

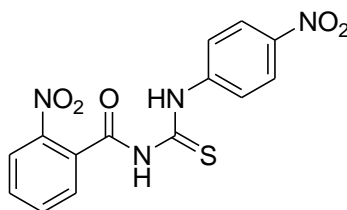
**Figura 166.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **41**.



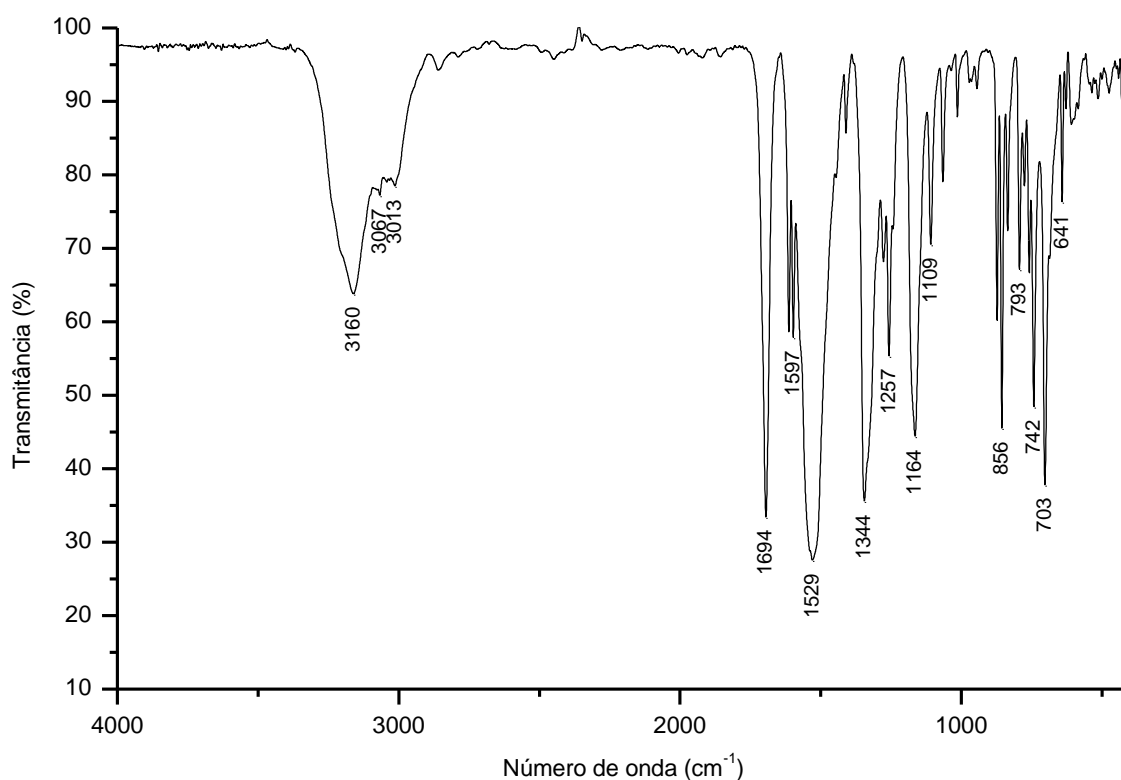
**Figura 167.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **41** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-d}_6$ ).

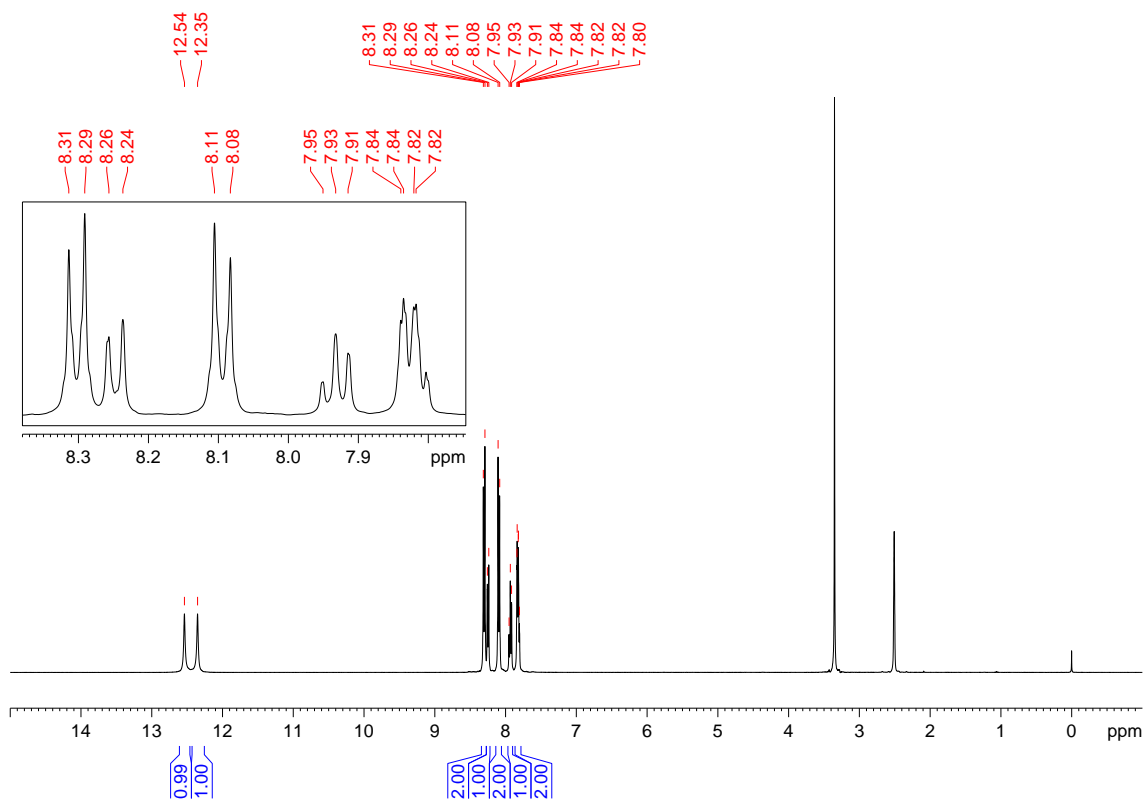


**Figura 168.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **41** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-d}_6$ ).

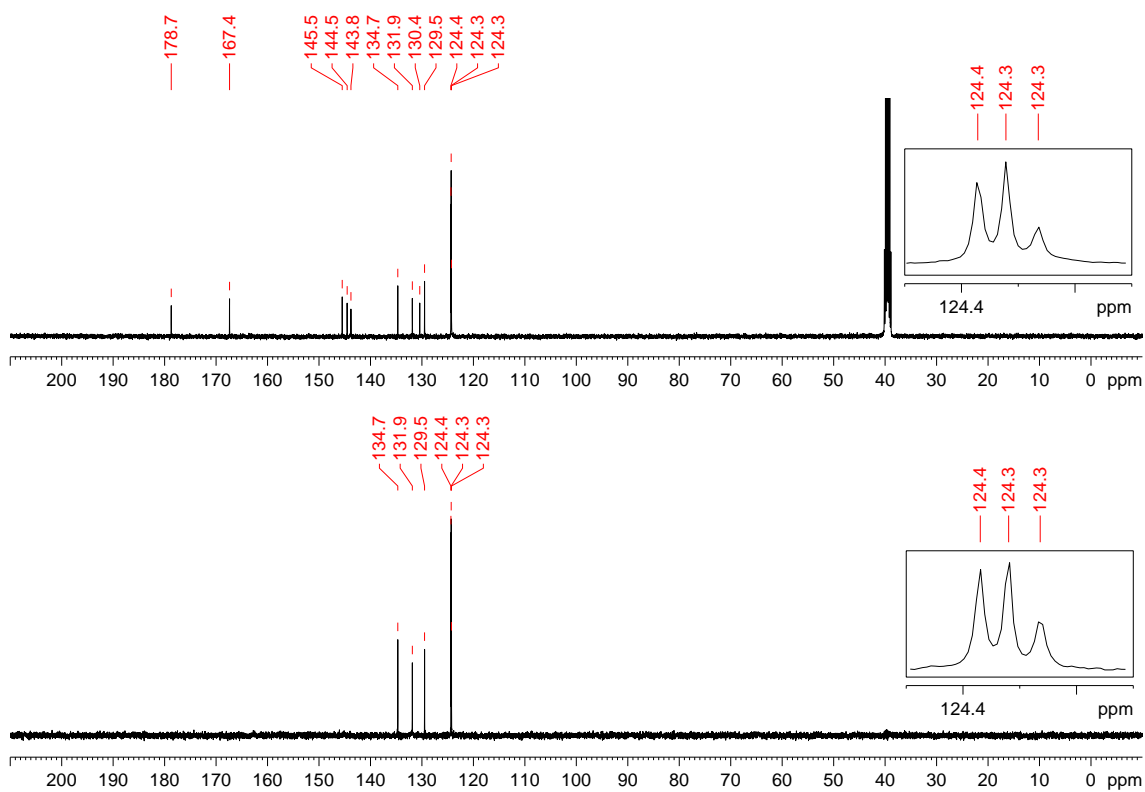
**(42) *N*-(2-nitrobenzoyl)-*N'*-(4-nitrofenil)-tiourea:****(42)**

Recristalizado em etanol/acetona com rendimento de 43%. PF: 216 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3160, 3067, 3013, 1694, 1597, 1529, 1344, 1257, 1164, 1109, 856, 793, 742, 703, 641. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7,82-7,84 (2H, m), 7,93 (1H, t,  $^3J$  7,6 Hz), 8,09 (2H, d,  $^3J$  8,9 Hz), 8,25 (1H, d,  $^3J$  7,6 Hz), 8,30 (2H, d,  $^3J$  8,9 Hz), 12,35 (1H, s, CONH), 12,54 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 124,3(+) (CH), 124,3(+) (CH), 124,4(+) (CH), 129,5(+) (CH), 130,4 (C), 131,9(+) (CH), 134,7(+) (CH), 143,8 (C), 144,5 (C), 145,5 (C), 167,4 (C=O), 178,7 (C=S).

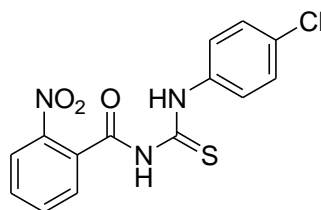
**Figura 169.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **42**.



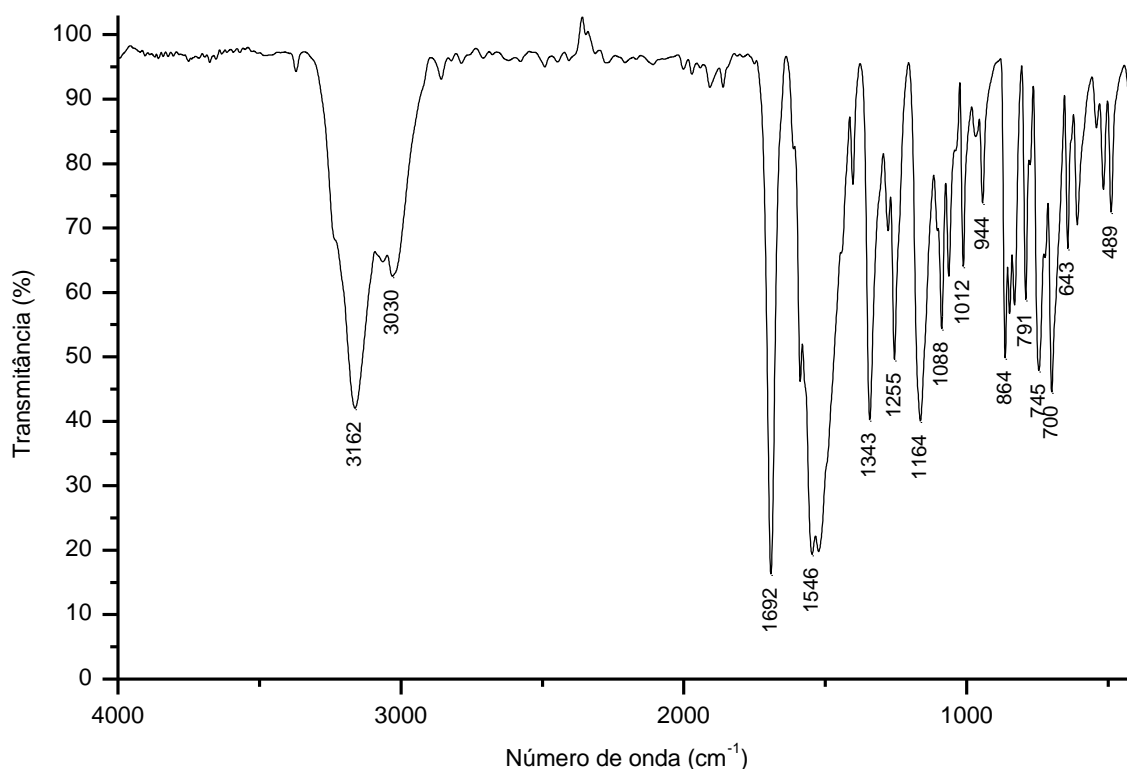
**Figura 170.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **42** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

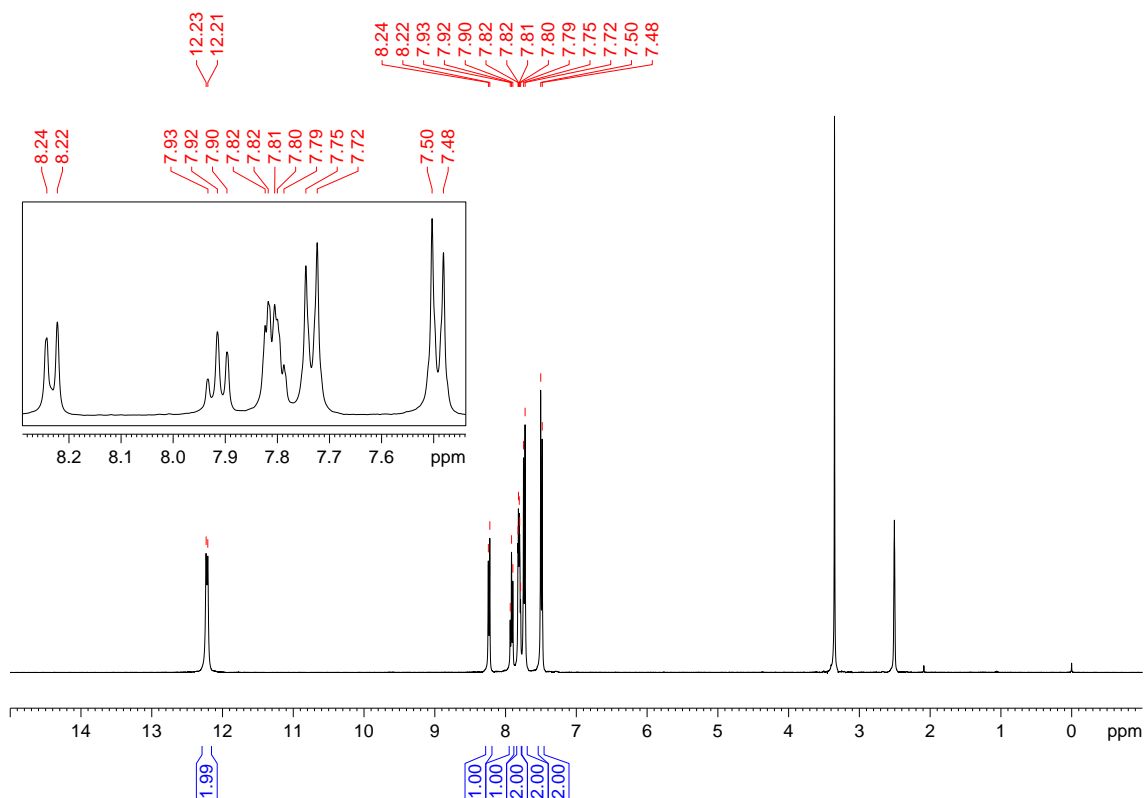


**Figura 171.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **42** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

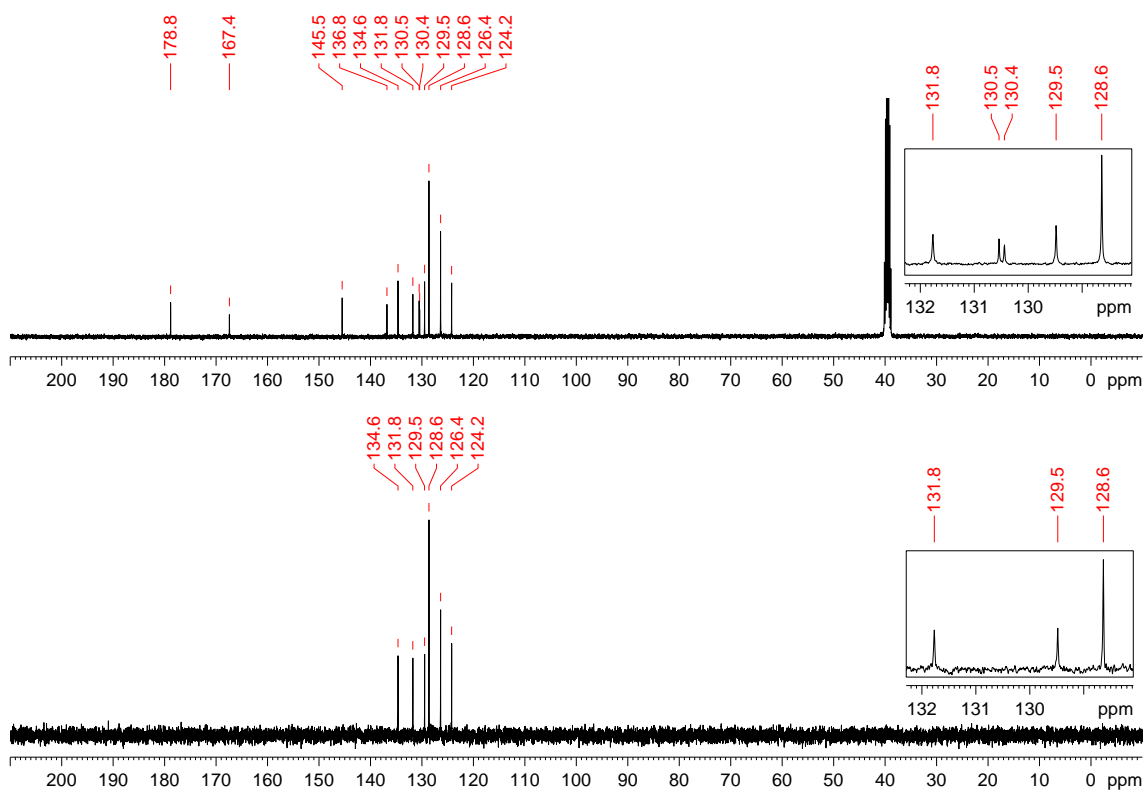
**(43) *N*-(2-nitrobenzoyl)-*N'*-(4-clorofenil)-tiourea:****(43)**

Recristalizado em etanol/acetona com rendimento de 77%. PF: 202 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3162, 3030, 1692, 1546, 1343, 1255, 1164, 1088, 1012, 944, 864, 791, 745, 700, 643, 489. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7,49 (2H, d,  $^3J$  8,9 Hz), 7,73 (2H, d,  $^3J$  8,9 Hz), 7,79-7,82 (2H, m), 7,92 (1H, t,  $^3J$  7,9 Hz), 8,23 (1H, d,  $^3J$  7,9 Hz), 12,21 (1H, s, CONH), 12,23 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 124,2(+) (CH), 126,4(+) (CH), 128,6(+) (CH), 129,5(+) (CH), 130,4 (C), 130,5 (C), 131,8(+) (CH), 134,6(+) (CH), 136,8 (C), 145,5 (C), 167,4 (C=O), 178,8 (C=S).

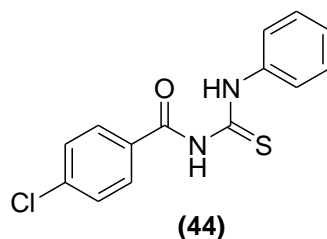
**Figura 172.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **43**.



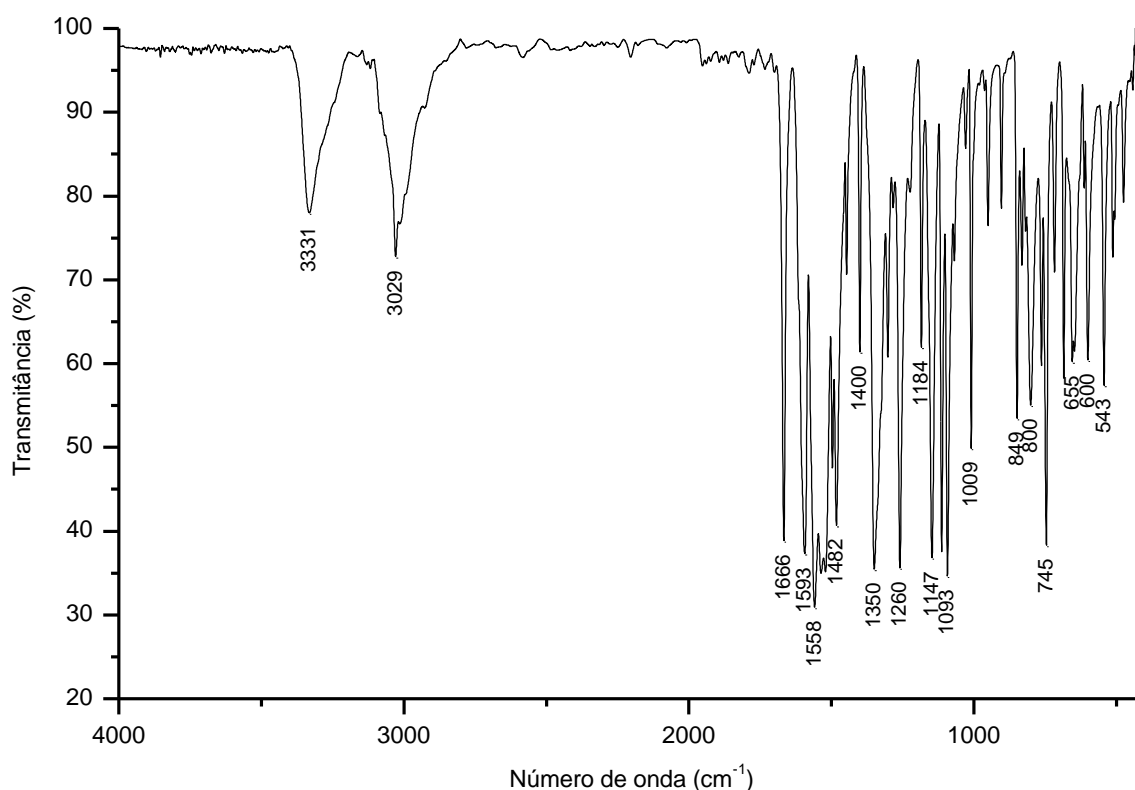
**Figura 173.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **43** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



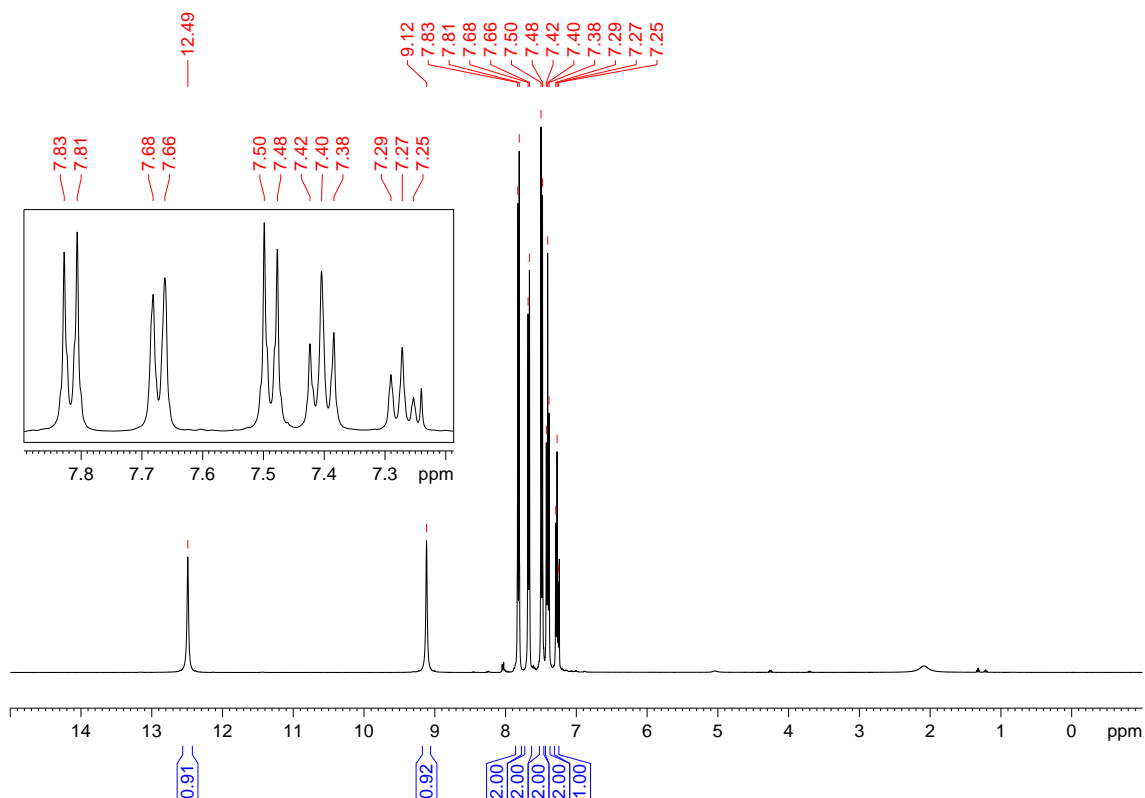
**Figura 174.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **43** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

**(44) N-(4-clorobenzoil)-N'-fenil-tioureia:**

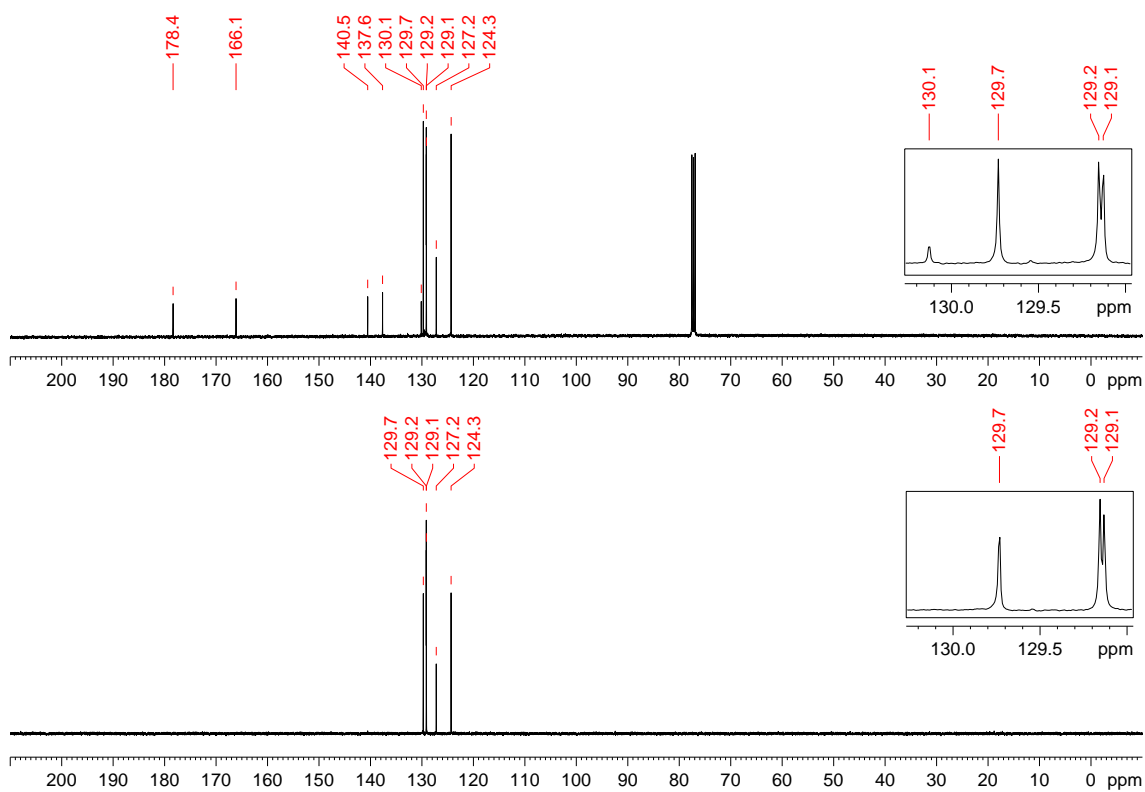
Recristalizado em etanol com rendimento de 99%. PF: 144 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3331, 3029, 1666, 1593, 1558, 1482, 1400, 1350, 1260, 1184, 1147, 1093, 1009, 849, 800, 745, 655, 600, 543. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,27 (1H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,40 (2H, t,  $^3J$  7,7 Hz), 7,49 (2H, d,  $^3J$  8,6 Hz), 7,67 (2H, d,  $^3J$  7,7 Hz), 7,82 (2H, d,  $^3J$  8,6 Hz), 9,12 (1H, s, CONH), 12,49 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 124,3(+) (CH), 127,2(+) (CH), 129,1(+) (CH), 129,2(+) (CH), 129,7(+) (CH), 130,1(C), 137,6 (C), 140,5 (C), 166,1 (C=O), 178,4 (C=S).



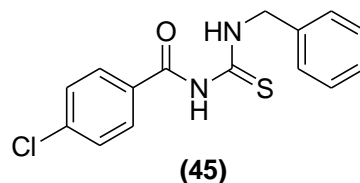
**Figura 175.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **44**.



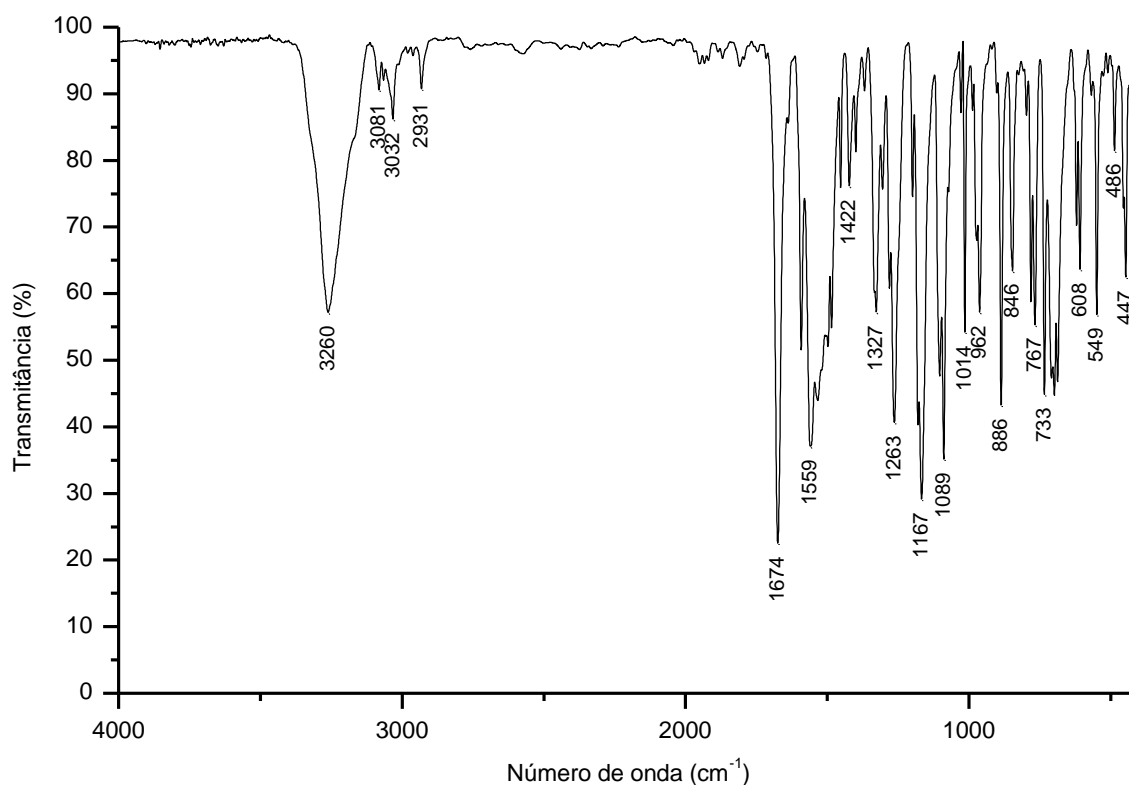
**Figura 176.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **44** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).



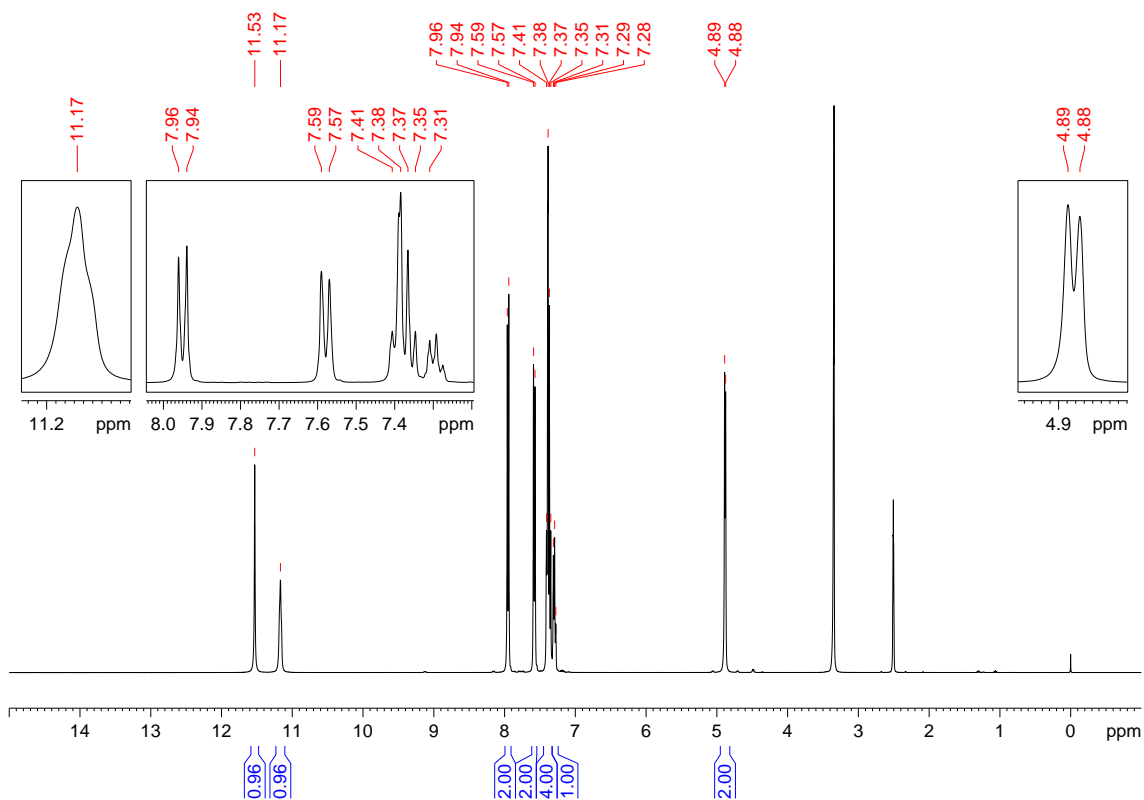
**Figura 177.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **44** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

**(45) *N*-(4-clorobenzoil)-*N'*-benzil-tioureia:**

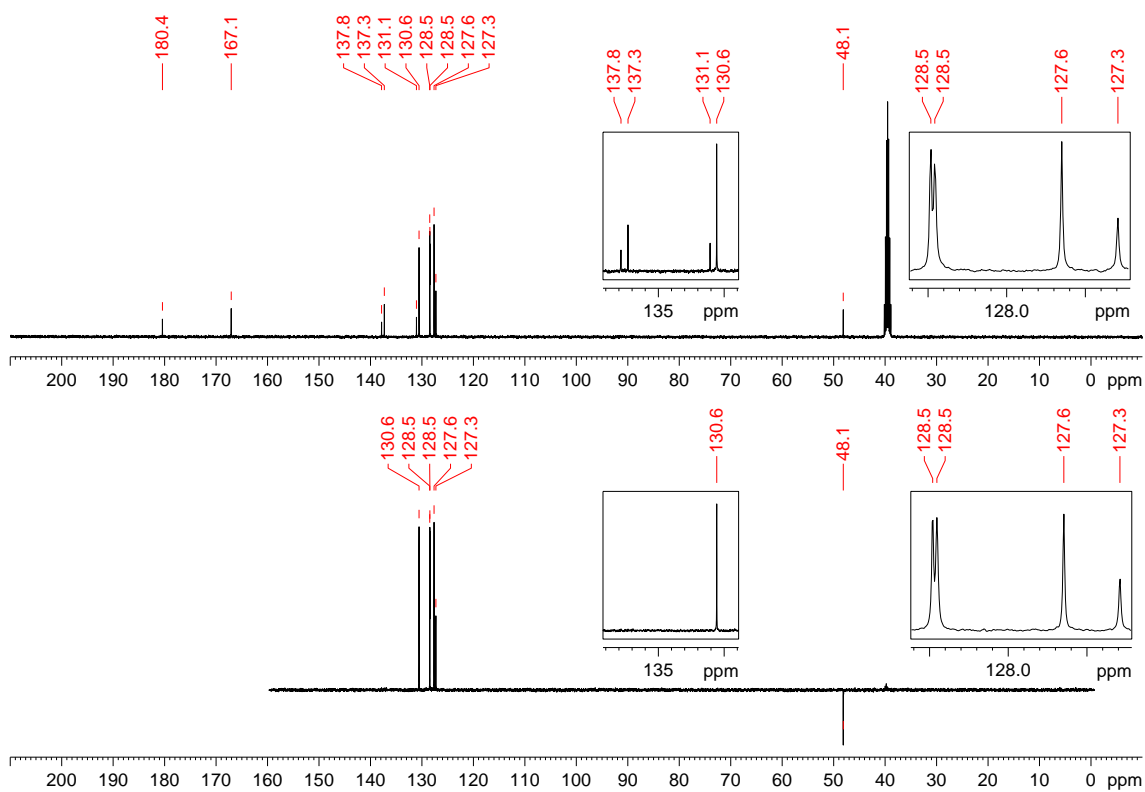
Recristalizado em etanol com rendimento de 77%. PF: 120 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3260, 3081, 3032, 2931, 1674, 1559, 1422, 1327, 1263, 1167, 1089, 1014, 962, 886, 846, 767, 733, 608, 549, 486, 447. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 4,88 (2H, d,  $^3J$  5,6 Hz), 7,29 (1H, t,  $^3J$  6,9 Hz), 7,34-7,41 (4H, m), 7,58 (2H, d,  $^3J$  8,2 Hz), 7,95 (2H, t,  $^3J$  8,4 Hz), 11,17 (1H, s, CONH), 12,53 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 48,1(-) ( $\text{CH}_2$ ), 127,3(+) (CH), 127,6(+) (CH), 128,5(+) (CH), 128,5(+) (CH), 130,6(+) (CH), 131,1 (C), 137,3 (C), 137,8 (C), 167,1 (C=O), 180,4 (C=S).



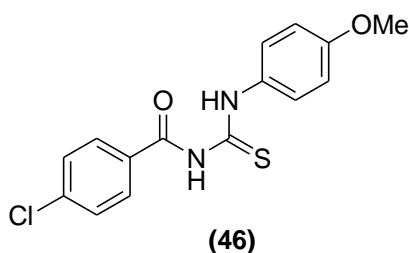
**Figura 178.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **45**.



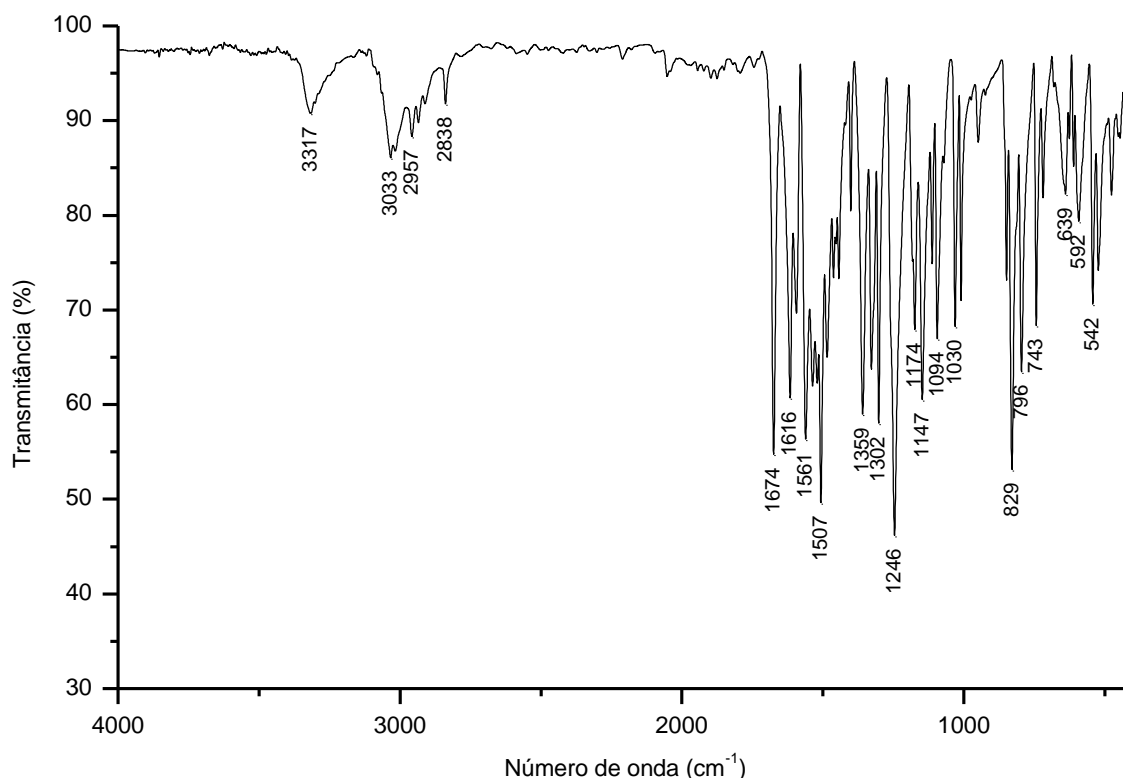
**Figura 179.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **45** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



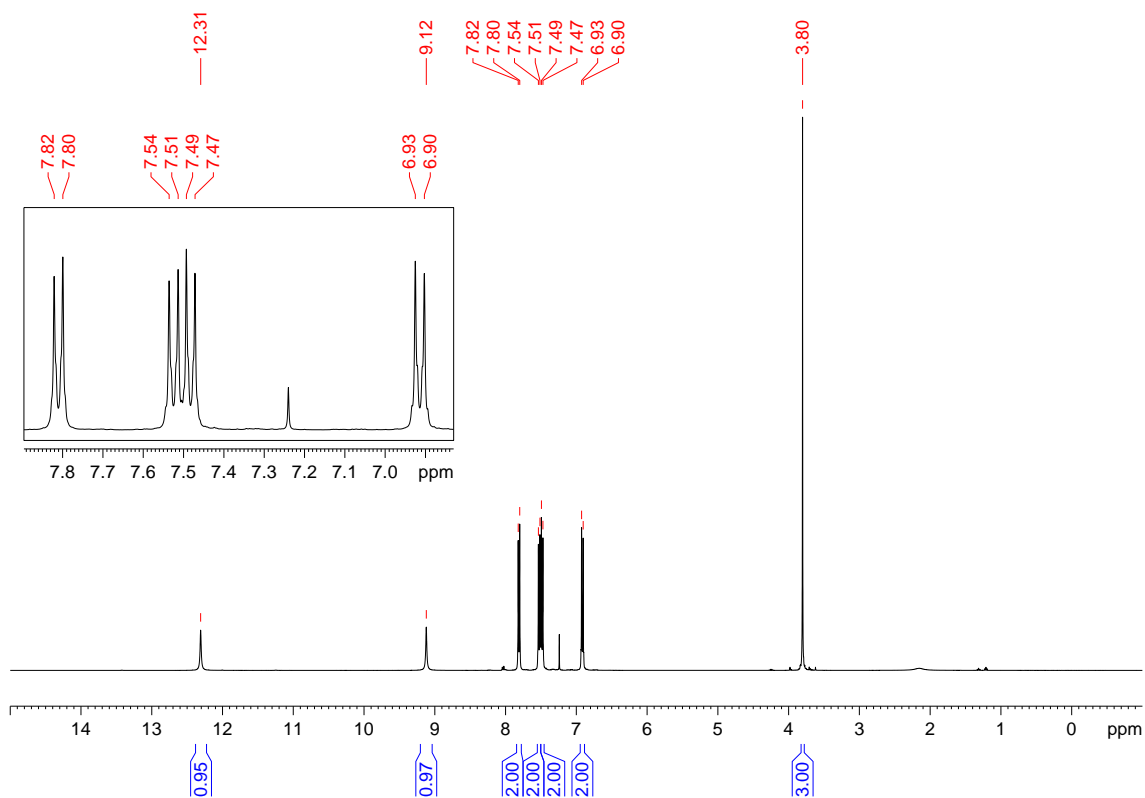
**Figura 180.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **45** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

**(46) *N*-(4-clorobenzoil)-*N'*-(4-metoxifenil)-tioureia:**

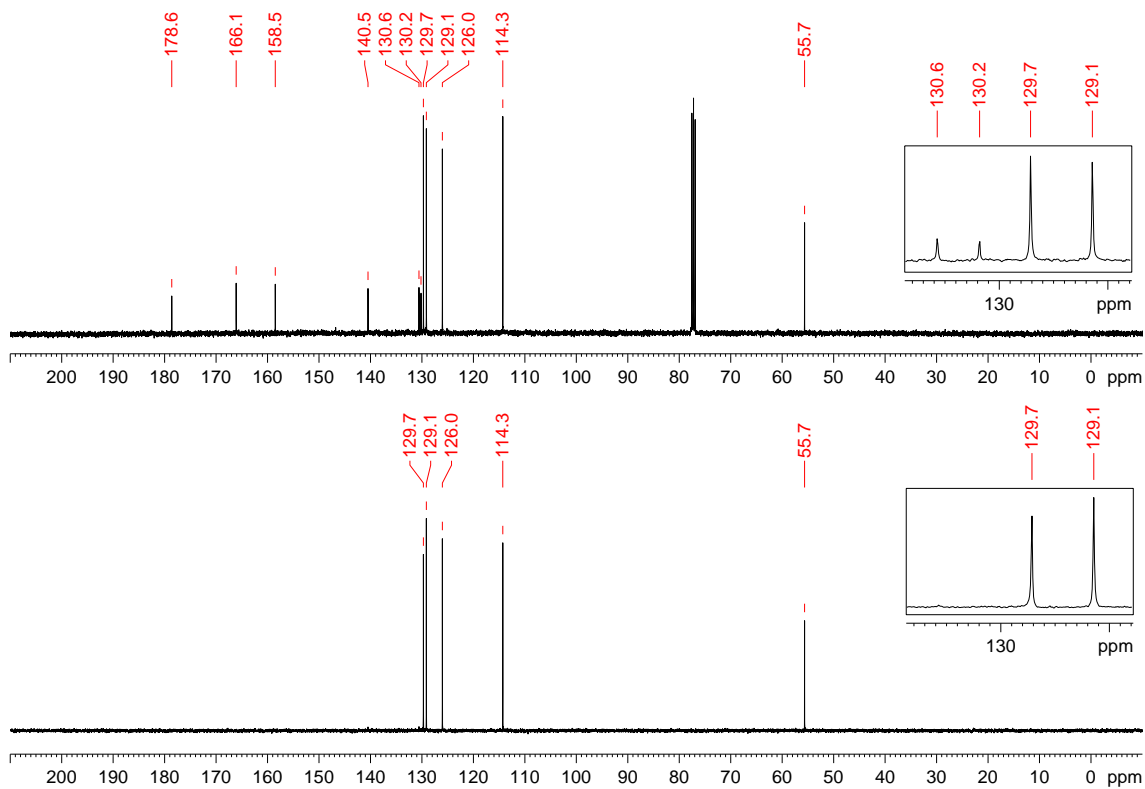
Recristalizado em etanol com rendimento de 99%. PF: 146 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3317, 3033, 2957, 2838, 1674, 1616, 1561, 1507, 1359, 1302, 1246, 1174, 1147, 1094, 1030, 829, 796, 743, 639, 592, 542. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3,80 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 6,92 (2H, d,  $^3J$  8,9 Hz), 7,48 (2H, d,  $^3J$  8,6 Hz), 7,52 (2H, d,  $^3J$  8,9 Hz), 7,81 (2H, d,  $^3J$  8,6 Hz), 9,12 (1H, s, CONH), 12,31 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 55,7(+) ( $\text{OCH}_3$ ), 114,3(+) (CH), 126,0(+) (CH), 129,1(+) (CH), 129,7 (+) (CH), 130,2 (C), 130,6 (C), 140,5 (C), 158,5 (C), 166,1 (C=O), 178,6 (C=S).



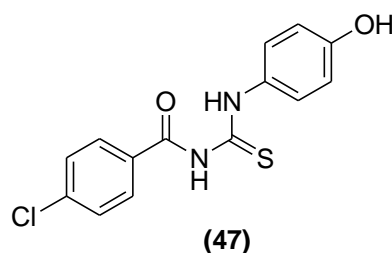
**Figura 181.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **46**.



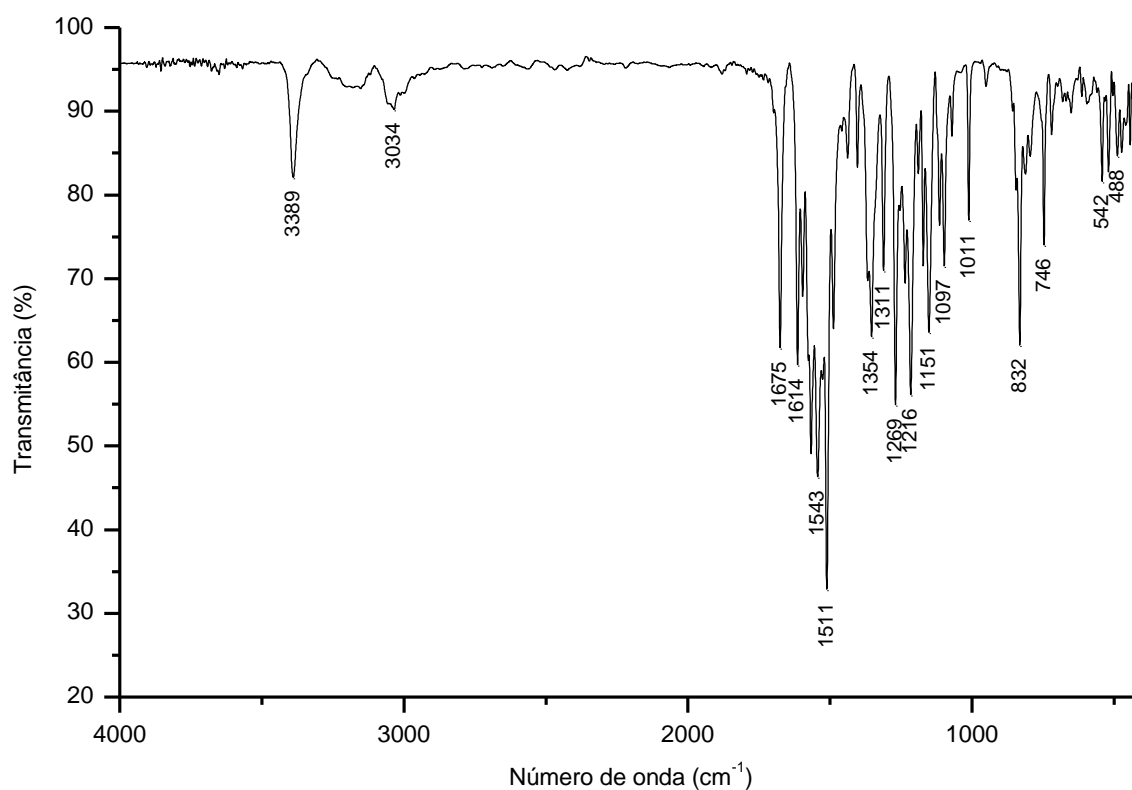
**Figura 182.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **46** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).



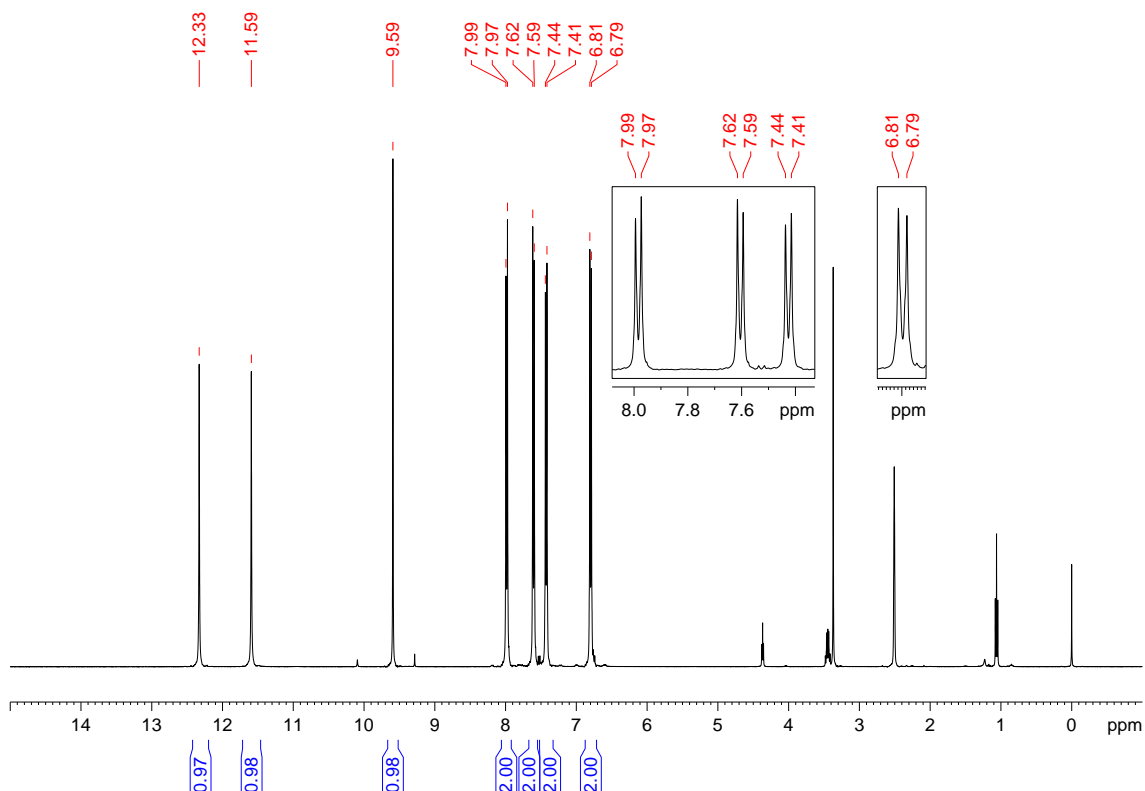
**Figura 183.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **46** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

**(47) *N*-(4-clorobenzoil)-*N'*-(4-hidroxifenil)-tiourea:**

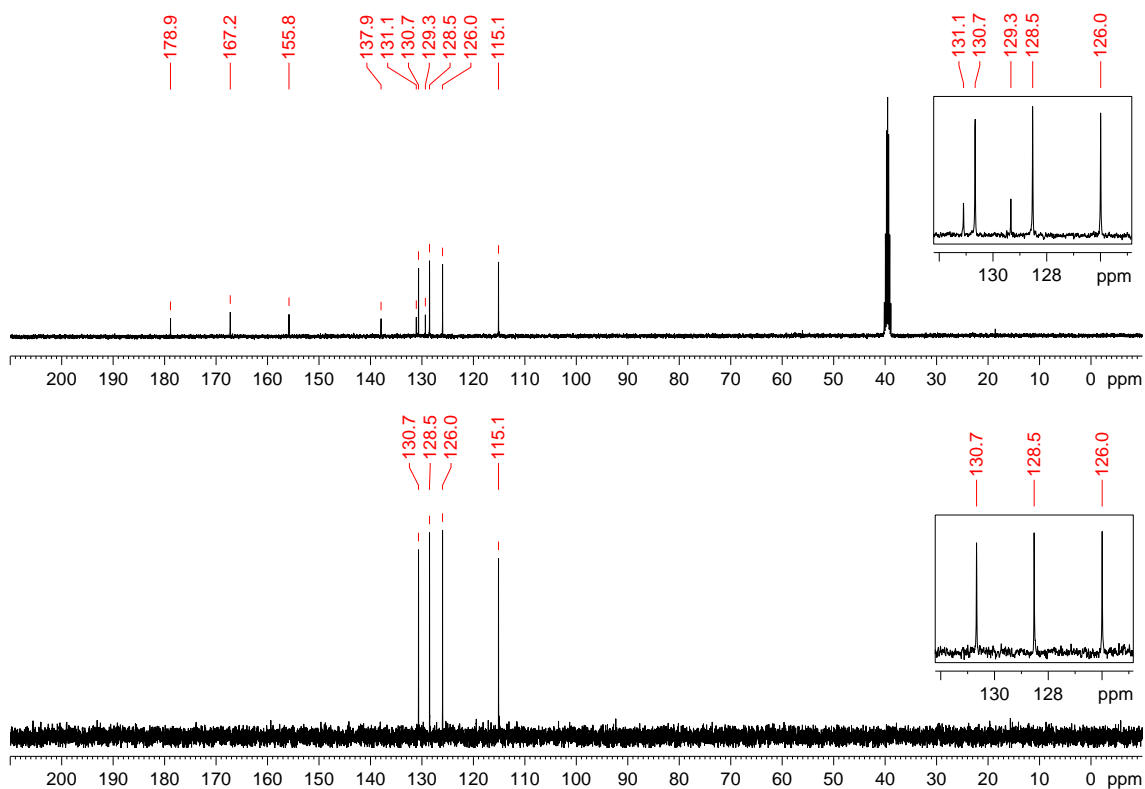
Recristalizado em etanol com rendimento de 99%. PF: 186 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3389, 3034, 1675, 1614, 1543, 1511, 1354, 1311, 1269, 1216, 1151, 1097, 1011, 832, 746, 542, 488. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 6,79 (2H, d,  $^3J$  8,8 Hz), 7,43 (2H, d,  $^3J$  8,8 Hz), 7,60 (2H, d,  $^3J$  8,6 Hz), 7,98 (2H, d,  $^3J$  8,6 Hz), 9,59 (1H, s, OH), 11,59 (1H, s, CONH), 12,33 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 115,1(+) (CH), 126,0(+) (CH), 128,5(+) (CH), 129,3 (C), 130,7(+) (CH), 131,1 (C), 137,9 (C), 155,8 (C), 167,2 (C=O), 178,9 (C=S).



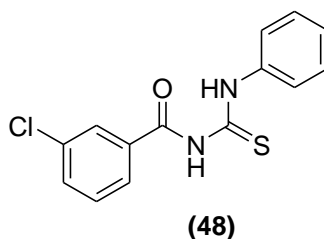
**Figura 184.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **47**.



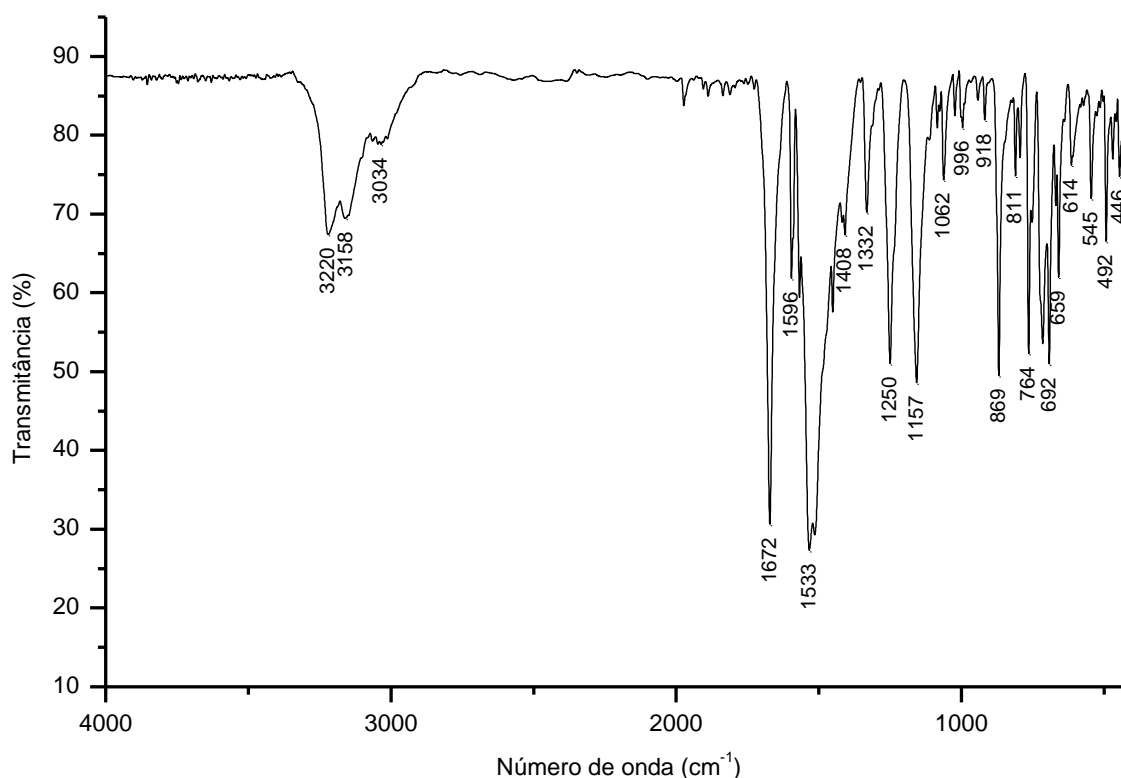
**Figura 185.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **47** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



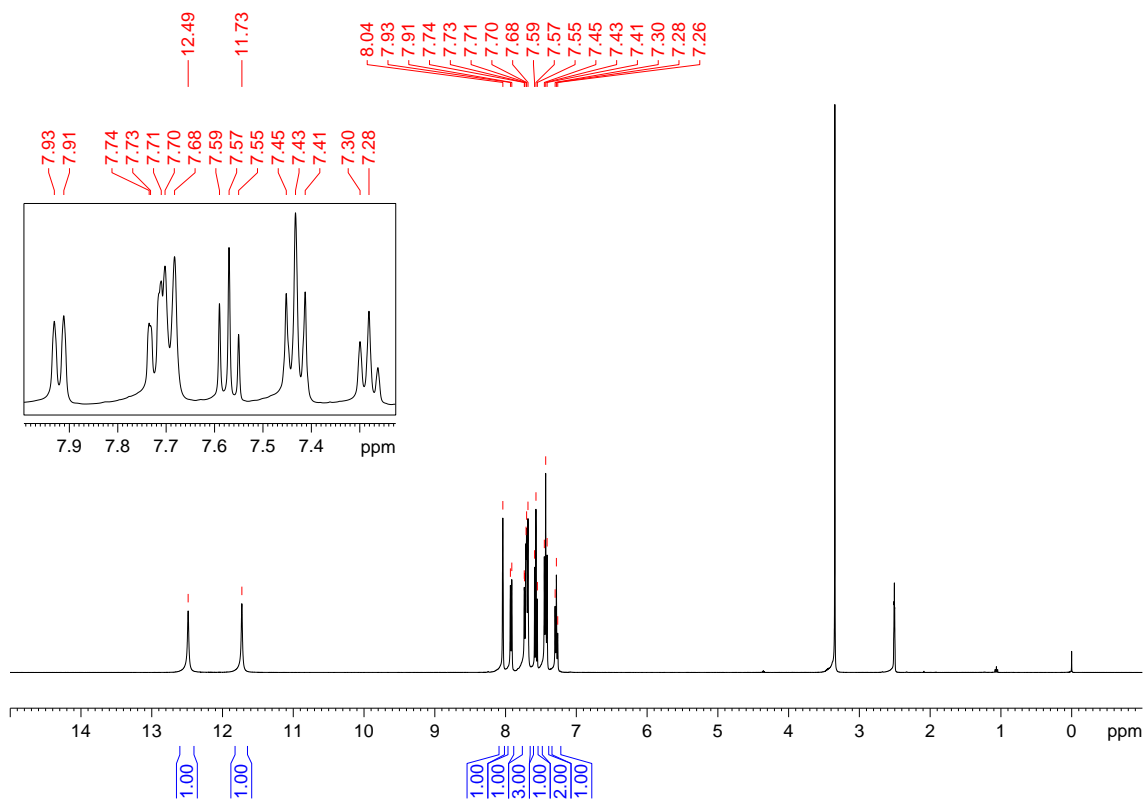
**Figura 186.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **47** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

**(48) N-(3-clorobenzoil)-N'-fenil-tioureia:**

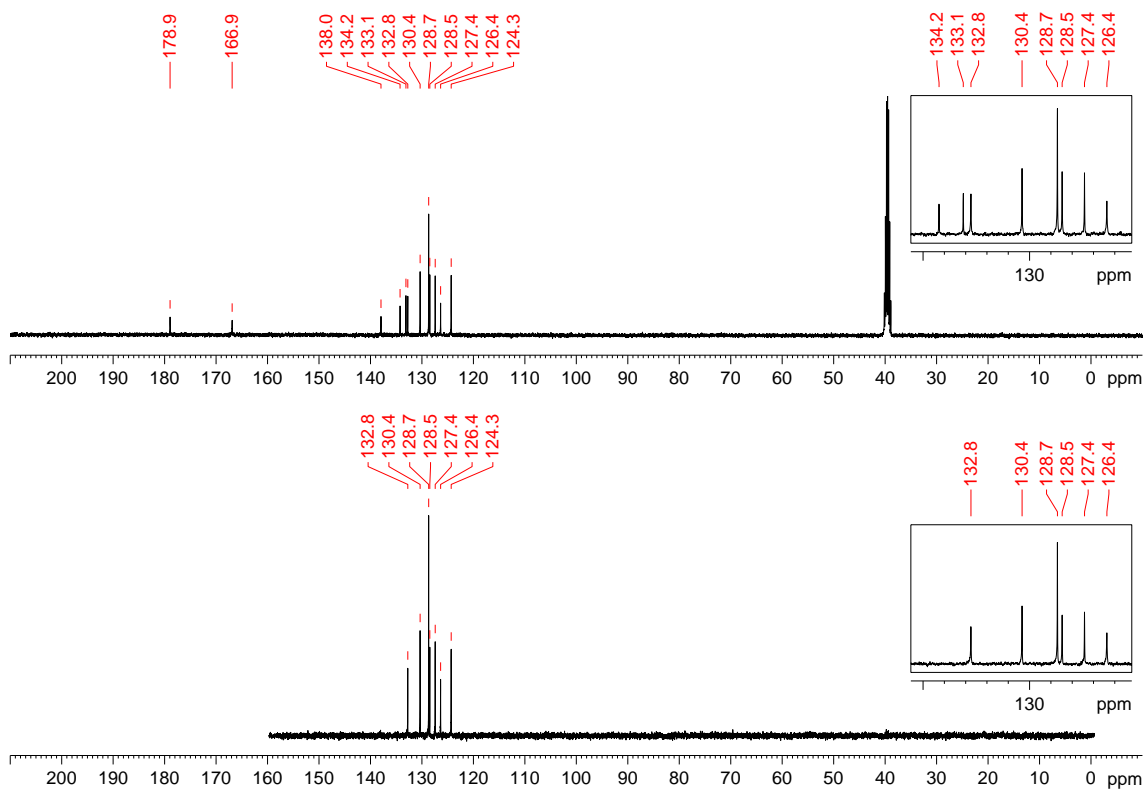
Recristalizado em etanol com rendimento de 68%. PF: 135 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3220, 3158, 3034, 1672, 1596, 1533, 1408, 1332, 1250, 1157, 1062, 996, 918, 869, 811, 764, 692, 659, 614, 545, 492, 446. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7,28 (1H, t,  $^3J$  7,4 Hz), 7,43 (2H, t,  $^3J$  7,8 Hz), 7,57 (1H, t,  $^3J$  7,8 Hz), 7,71 (3H, m), 7,92 (1H, d,  $^3J$  7,8 Hz), 8,04 (s, 1H), 11,73 (s, 1H, CONH), 12,49 (s, 1H, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 124,3(+) (CH), 126,4(+) (CH), 127,4(+) (CH), 128,5(+) (CH), 128,7(+) (CH), 130,4(+) (CH), 132,8(+) (CH), 133,1 (CH), 134,2 (CH), 138,0 (CH), 166,9 (C=O), 178,9 (C=S).



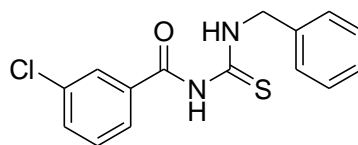
**Figura 187.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **48**.



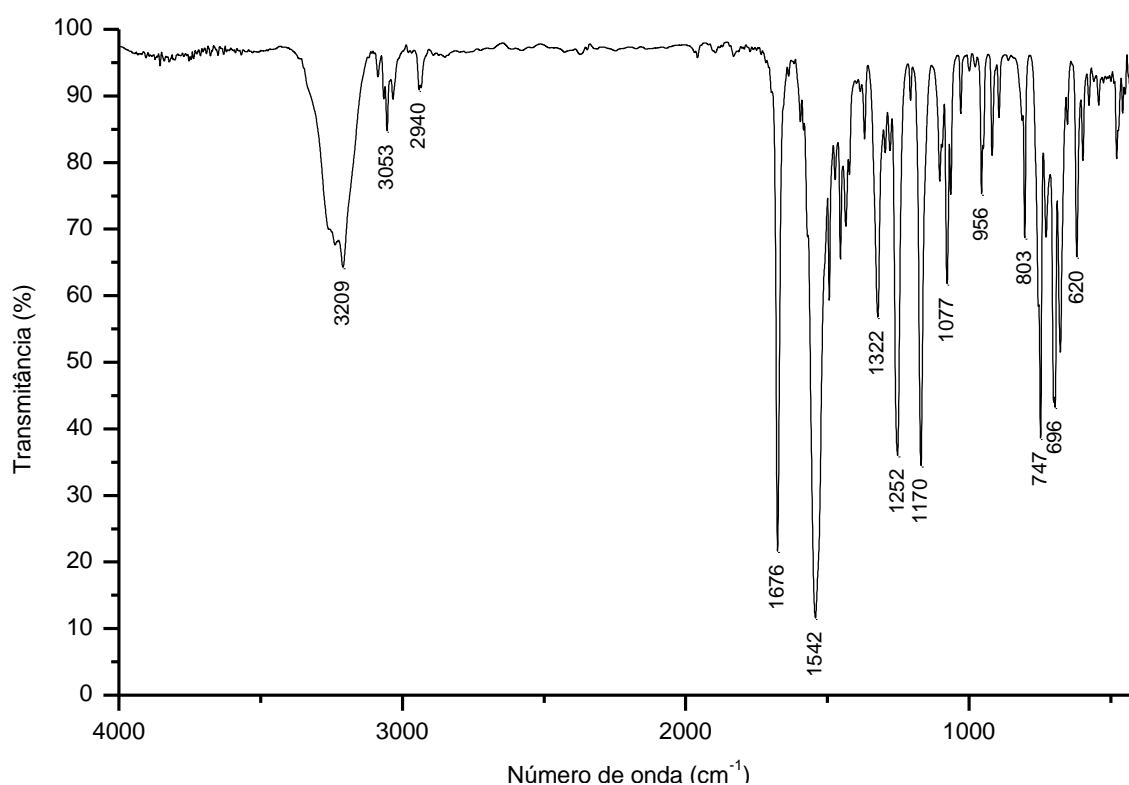
**Figura 188.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **48** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

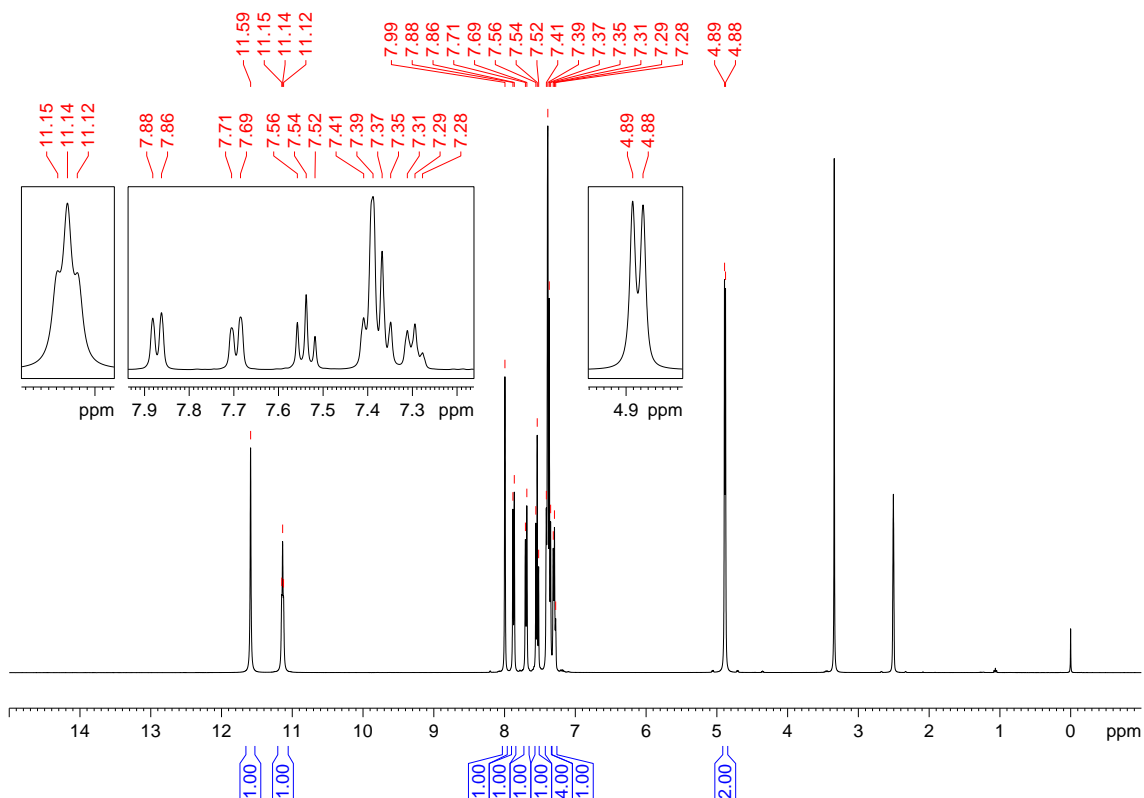


**Figura 189.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **48** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

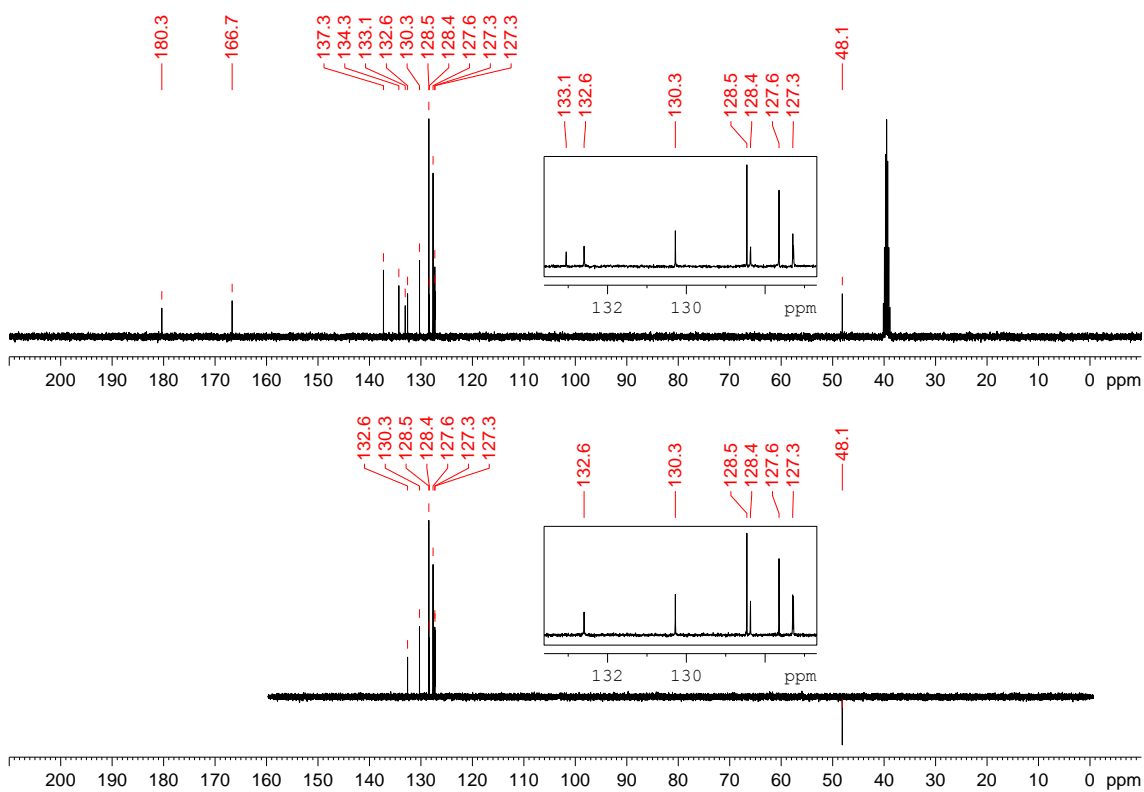
**(49) N-(3-clorobenzoil)-N'-benzil-tiourea:****(49)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 72%. PF: 126 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3209, 3053, 2940, 1676, 1542, 1322, 1252, 1170, 1077, 956, 803, 747, 696, 620. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 4,88 (2H, d,  $^3J$  5,5 Hz), 7,29 (1H, t,  $^3J$  6,9 Hz), 7,35-7,41 (4H, m), 7,54 (1H, t,  $^3J$  7,9 Hz), 7,70 (1H, d,  $^3J$  7,9 Hz), 7,87 (1H, d,  $^3J$  7,9 Hz), 7,99 (1H, s), 11,14 (1H, t,  $^3J$  5,5 Hz, CSNH), 11,59 (1H, s, CONH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 48,1(-) ( $\text{CH}_2$ ), 127,3(+) ( $\text{CH}$ ), 127,3(+) ( $\text{CH}$ ), 127,6(+) ( $\text{CH}$ ), 128,4(+) ( $\text{CH}$ ), 128,5(+) ( $\text{CH}$ ), 130,3(+) ( $\text{CH}$ ), 132,6(+) ( $\text{CH}$ ), 133,1 (C), 134,3 (C), 137,3 (C), 166,7 (C=O), 180,3 (C=S).

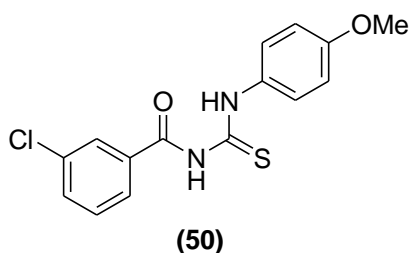
**Figura 190.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **49**.



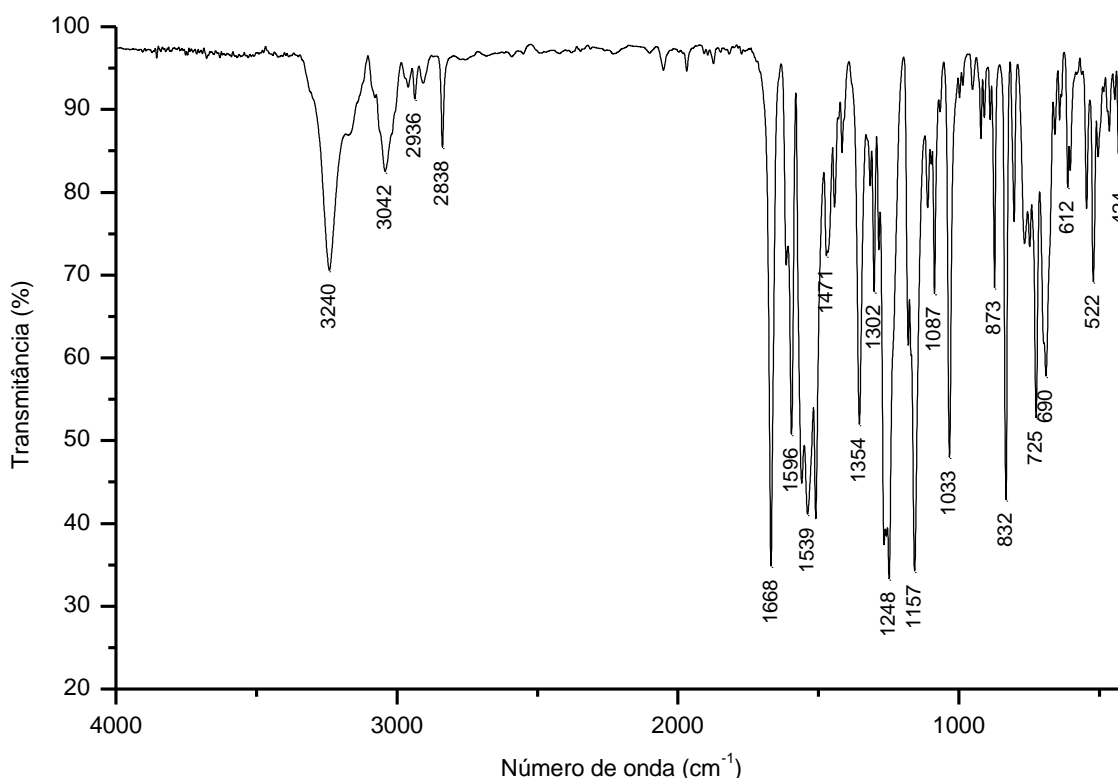
**Figura 191.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **49** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



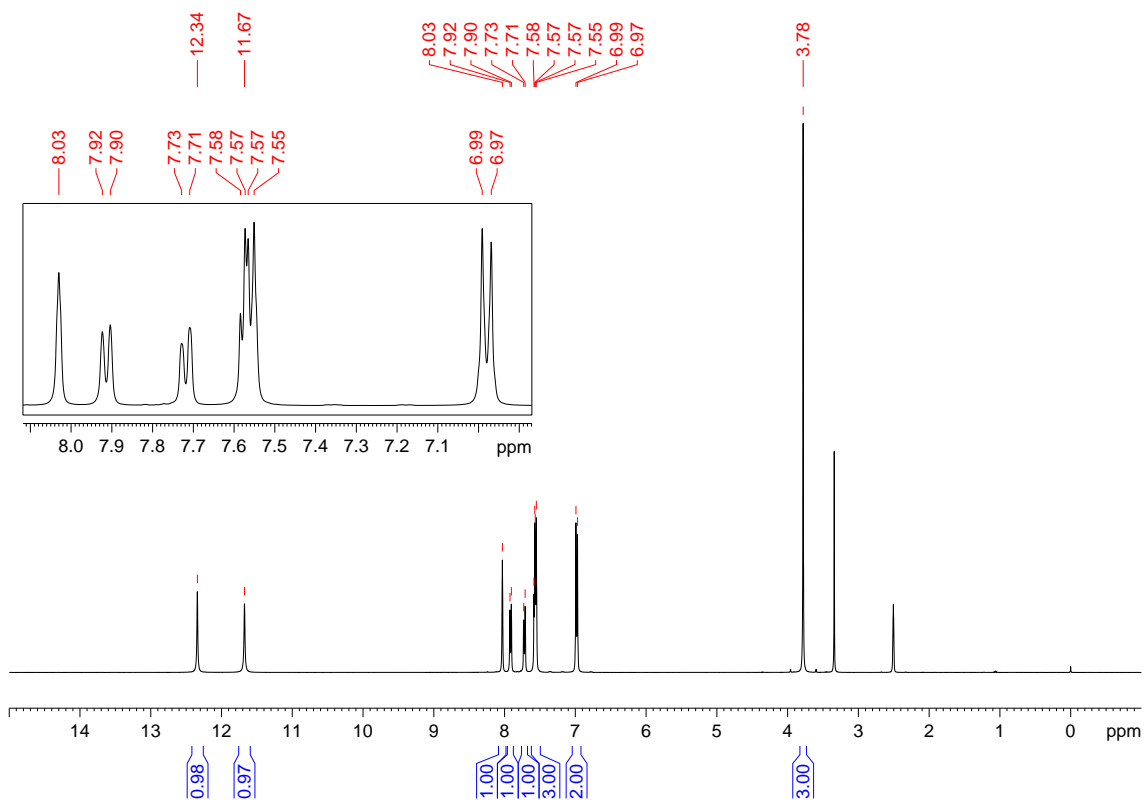
**Figura 192.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **49** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

**(50) *N*-(3-clorobenzoil)-*N'*-(4-metoxifenil)-tioureia:**

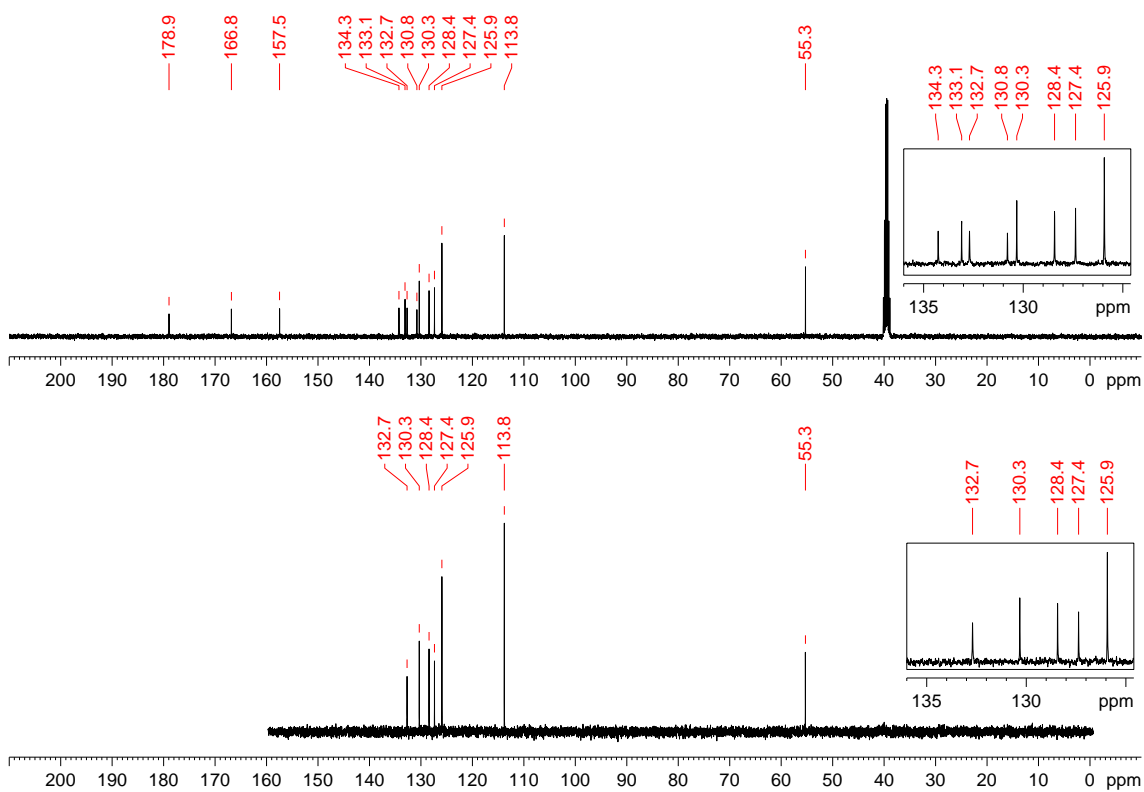
Recristalizado em etanol/acetona com rendimento de 79%. PF: 128 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3240, 3042, 2936, 2838, 1668, 1596, 1539, 1471, 1354, 1302, 1248, 1157, 1087, 1033, 873, 832, 725, 690, 612, 522, 424. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 3,78 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 6,98 (2H, d,  $^3J$  9,0 Hz), 7,55-7,59 (3H, m), 7,72 (1H, d,  $^3J$  8,0 Hz), 7,91 (1H, d,  $^3J$  8,0 Hz), 8,03 (1H, s), 11,67 (1H, s, CONH), 12,34 (s, 1H, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 55,3(+) ( $\text{OCH}_3$ ), 113,8(+) (CH), 125,9(+) (CH), 127,4(+) (CH), 128,4(+) (CH), 130,3(+) (CH), 130,8 (C), 132,7(+) (CH), 133,1 (C), 134,3 (C), 157,5 (C), 166,8 (C=O), 178,9 (C=S).



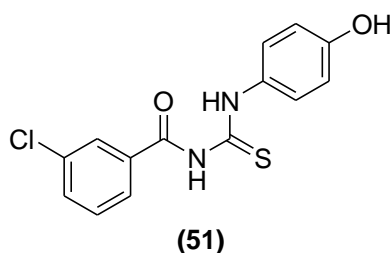
**Figura 193.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **50**.



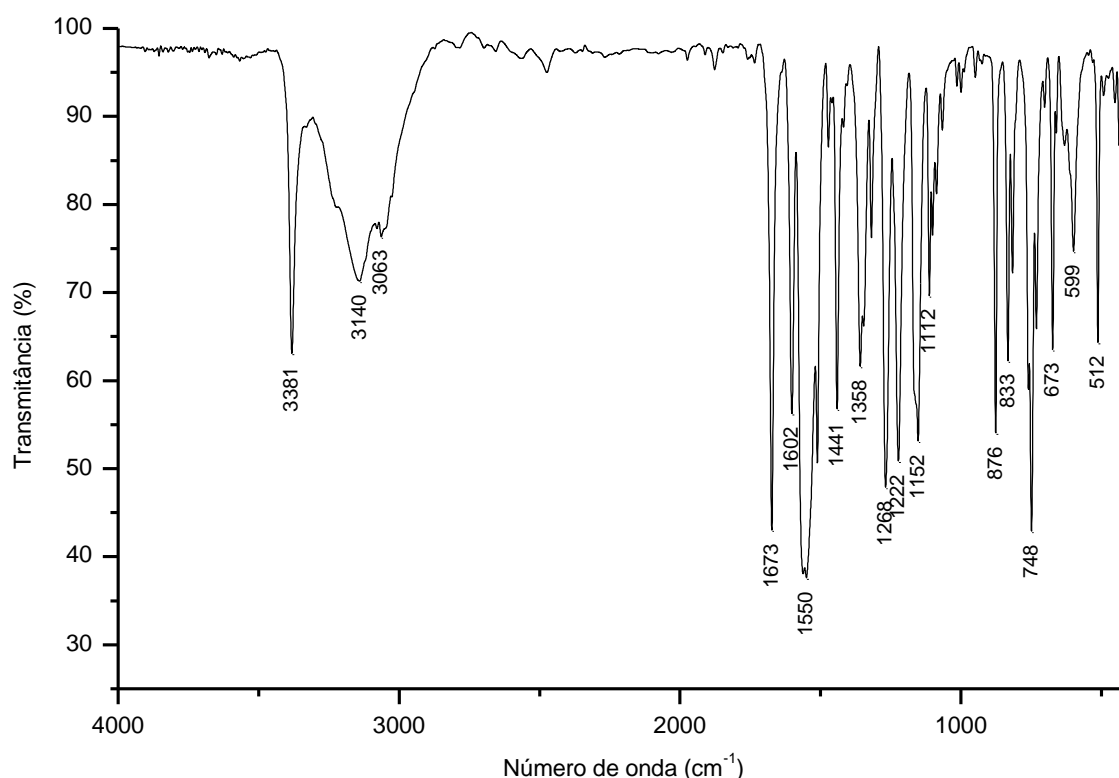
**Figura 194.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **50** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



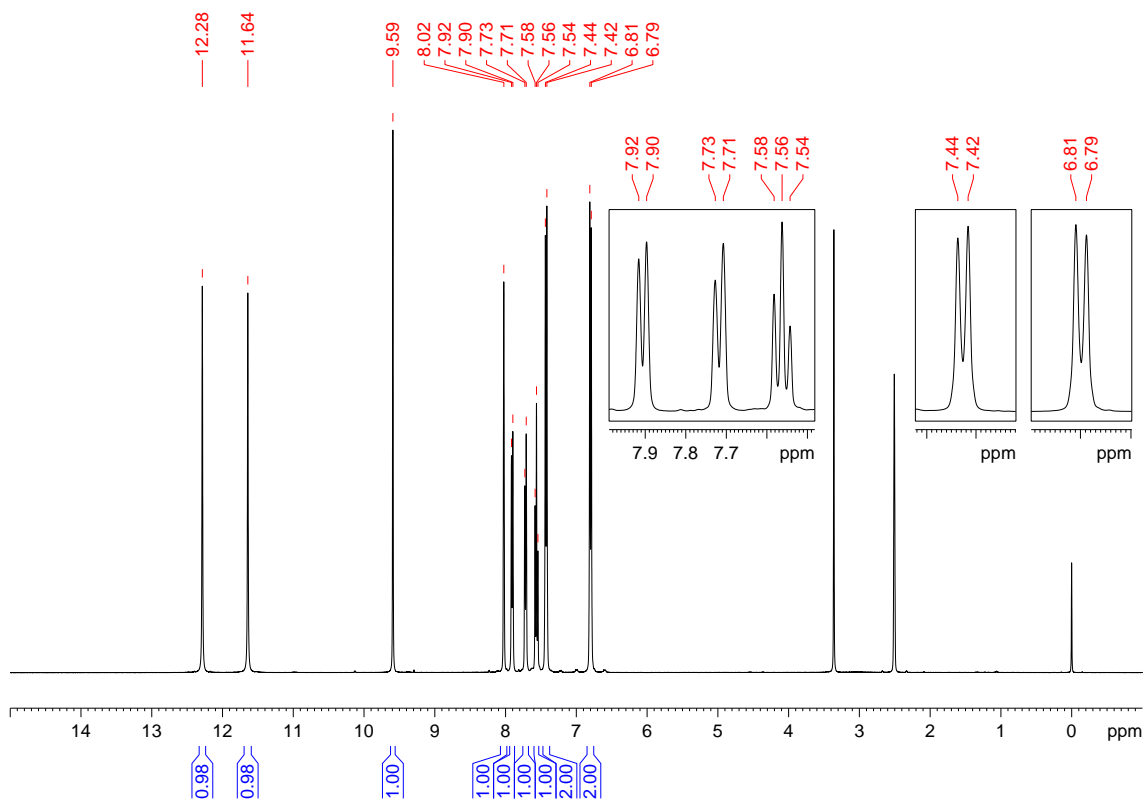
**Figura 195.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **50** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

**(51) *N*-(3-clorobenzoil)-*N'*-(4-hidroxifenil)-tiureia:**

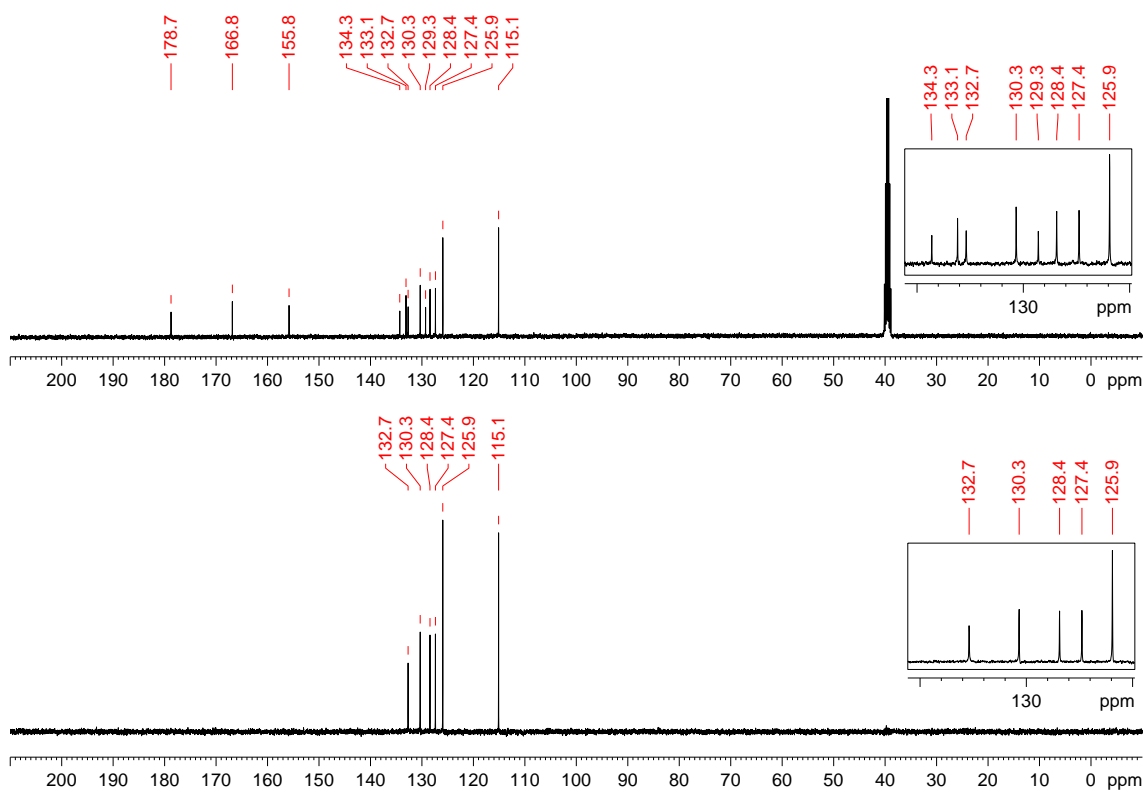
Recristalizado em etanol com rendimento de 75%. PF: 182 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3381, 3140, 3063, 1673, 1602, 1550, 1441, 1358, 1268, 1222, 1152, 1112, 876, 833, 748, 673, 599, 512. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 6,80 (2H, d,  $^3J$  8,4 Hz), 7,43 (2H, d,  $^3J$  8,4), 7,56 (1H, t,  $^3J$  7,9 Hz), 7,72 (1H, d,  $^3J$  7,9 Hz), 7,91 (1H, d,  $^3J$  7,9 Hz), 8,02 (1H, s), 9,59 (1H, s, OH), 11,64 (1H, s, CONH), 12,28 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 115,1(+) (CH), 125,9(+) (CH), 127,4(+) (CH), 128,4(+) (CH), 129,3 (C), 130,3(+) (CH), 132,7(+) (CH), 133,1 (C), 134,3 (C), 155,8 (C), 166,8 (C=O), 178,8 (C=S).



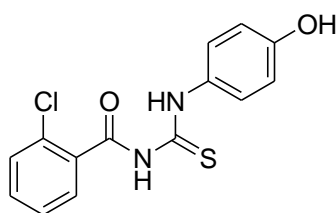
**Figura 196.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **51**.



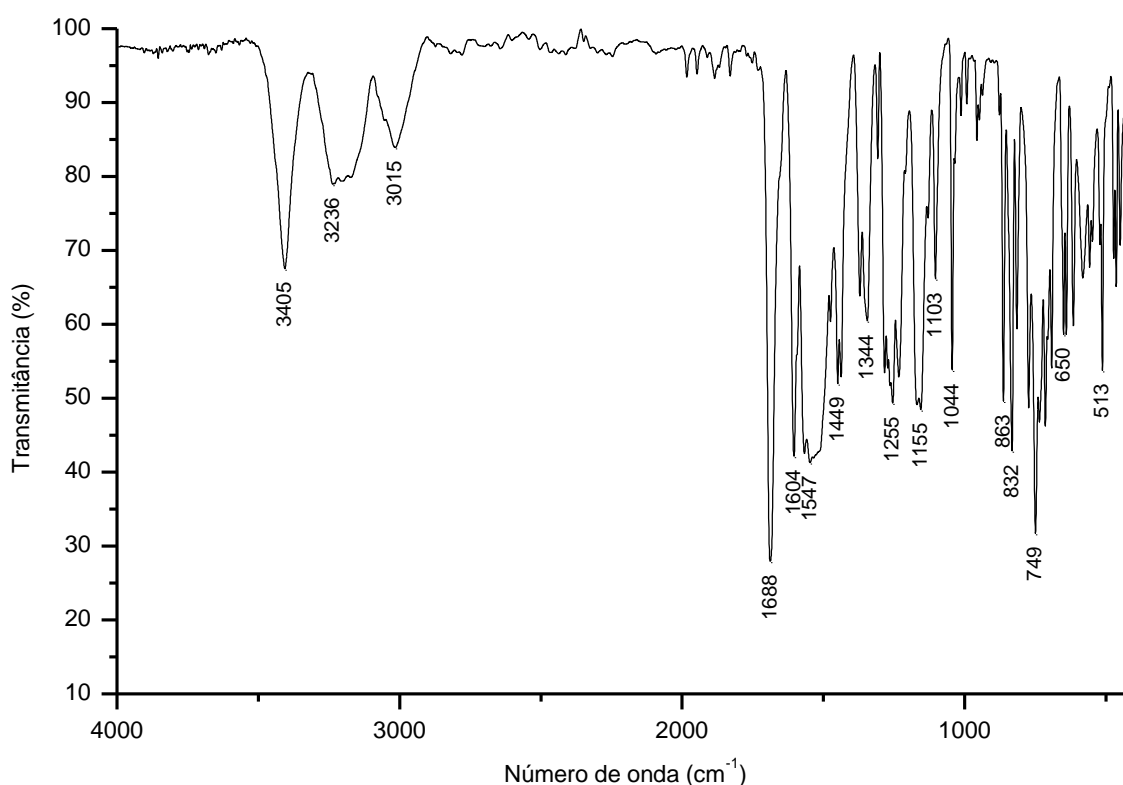
**Figura 197.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **51** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

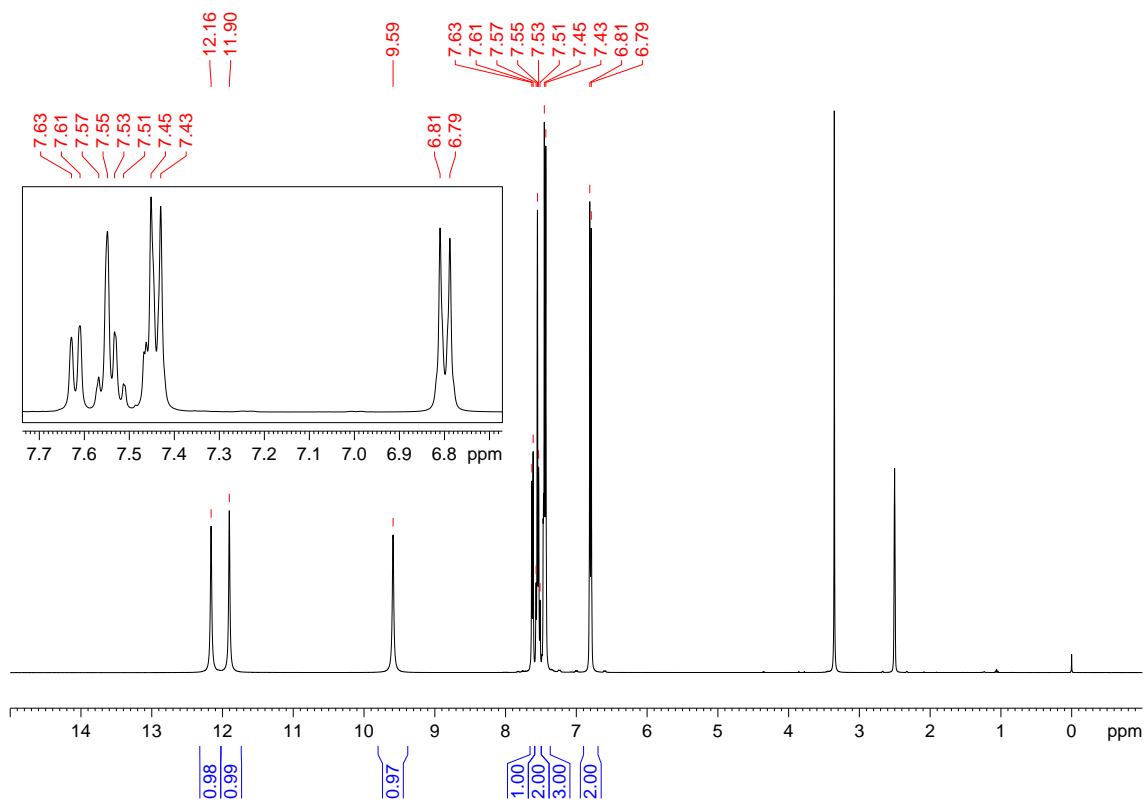


**Figura 198.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **51** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

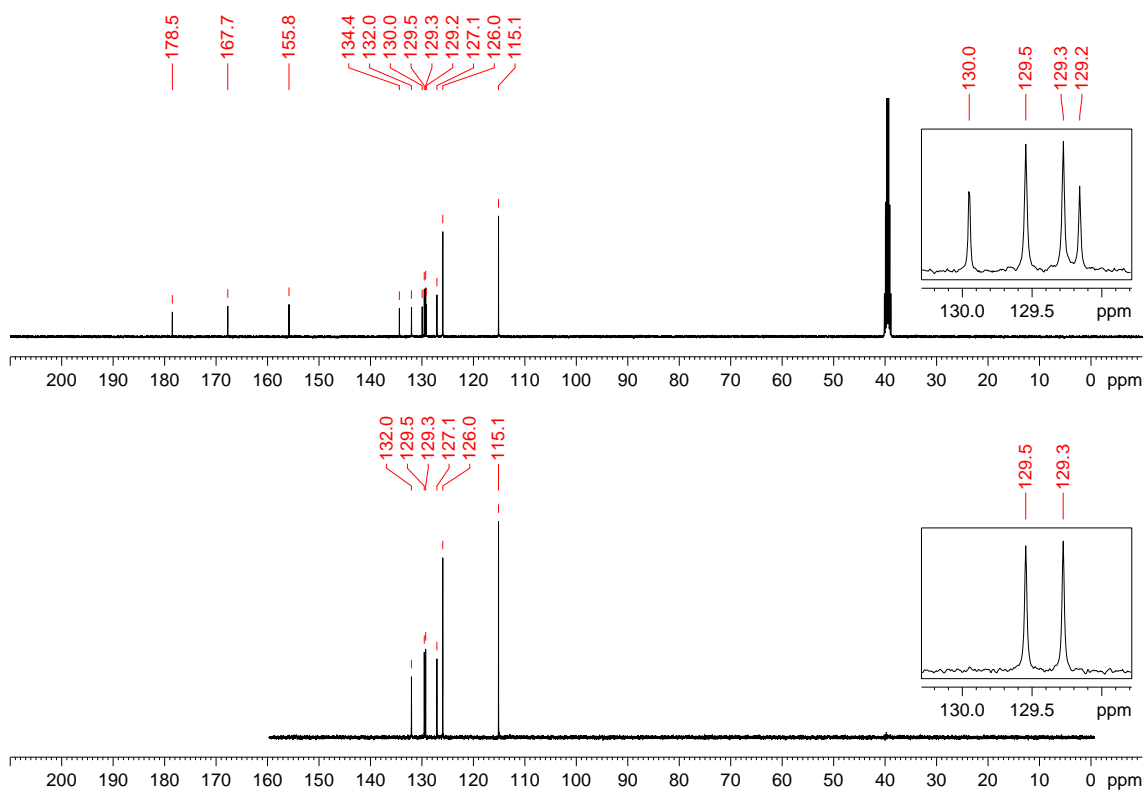
**(52) N-(2-clorobenzoil)-N'-(4-hidroxifenil)-tioureia:****(52)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 78%. PF: 198 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3405, 3236, 3015, 1688, 1604, 1547, 1449, 1344, 1255, 1155, 1103, 1044, 863, 832, 749, 650, 513. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 6,80 (2H, d,  $^3J$  8,9 Hz), 7,42-7,46 (3H, m), 7,50-7,58 (2H, m), 7,62 (1H, d,  $^3J$  8,9 Hz), 9,59 (1H, s, OH), 11,90 (1H, s, CONH), 12,16 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 115,1(+) (CH), 126,0(+) (CH), 127,1(+) (CH), 129,2 (C), 129,3(+) (CH), 129,5(+) (CH), 130,0 (C), 132,0(+) (CH), 134,4 (C), 155,8 (C), 167,7 (C=O), 178,5 (C=S).

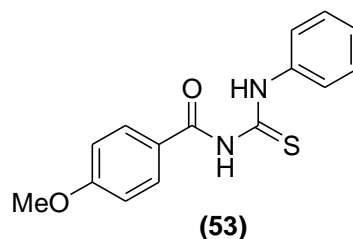
**Figura 199.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **52**.



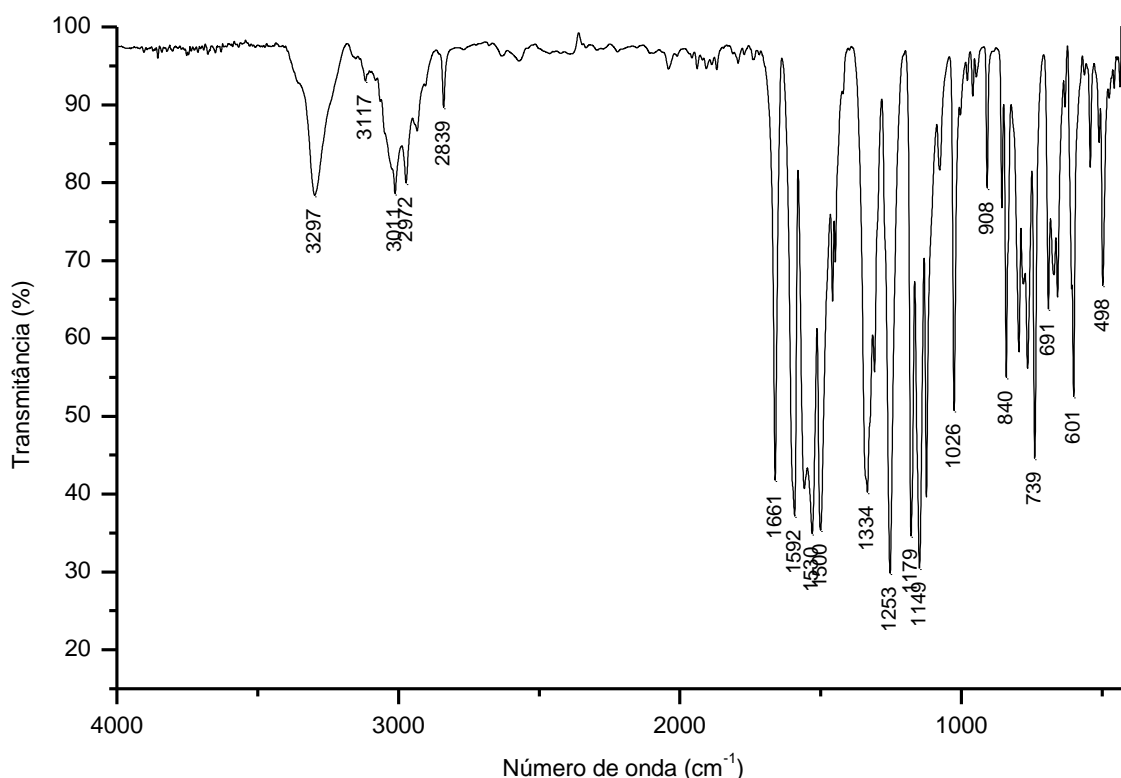
**Figura 200.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **52** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



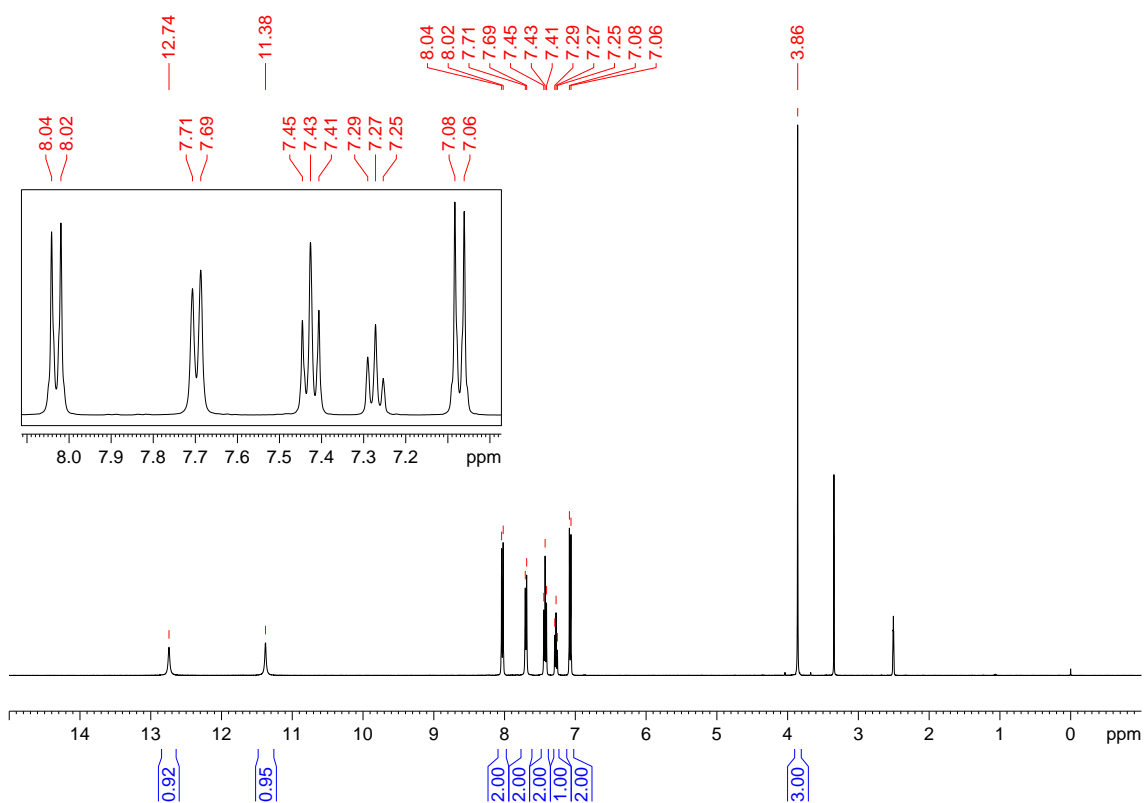
**Figura 201.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **52** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

**(53) *N*-(4-metoxibenzoil)-*N'*-fenil-tioureia:**

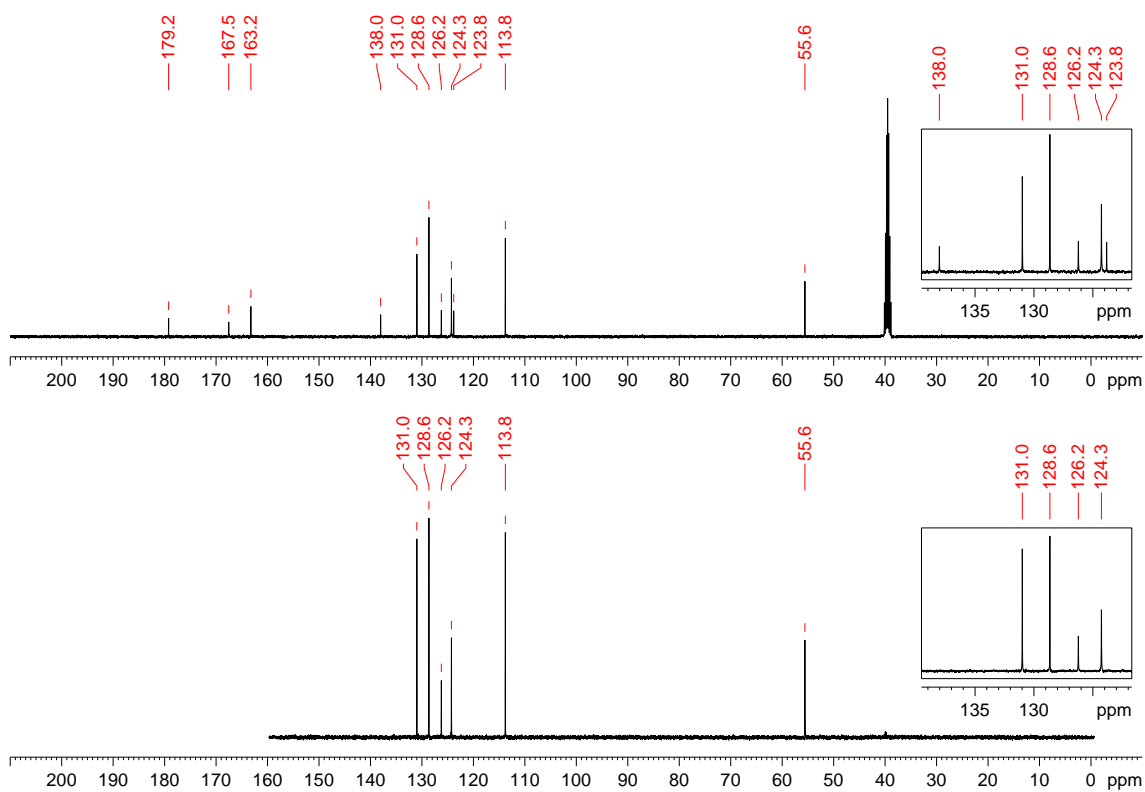
Recristalizado em etanol com rendimento de 98%. PF: 123 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3297, 3117, 3011, 2972, 2839, 1661, 1592, 1530, 1500, 1334, 1253, 1179, 1149, 1026, 908, 840, 739, 691, 601, 498. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 3,86 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 7,07 (2H, d,  $^3J$  8,9 Hz), 7,27 (1H, t,  $^3J$  7,4 Hz), 7,43 (2H, t,  $^3J$  7,8 Hz), 7,70 (2H, d,  $^3J$  7,8 Hz), 8,03 (2H, d,  $^3J$  8,9 Hz), 11,38 (1H, s, CONH), 12,74 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 55,6(+) ( $\text{OCH}_3$ ), 113,8(+) (CH), 123,8 (C), 124,3(+) (CH), 126,2(+) (CH), 128,6(+) (CH), 131,0(+) (CH), 138,0 (C), 163,2 (C), 167,5 (C=O), 179,2 (C=S).



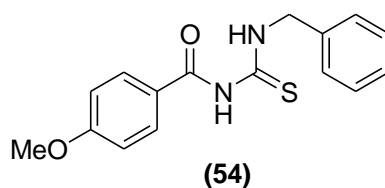
**Figura 202.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **53**.



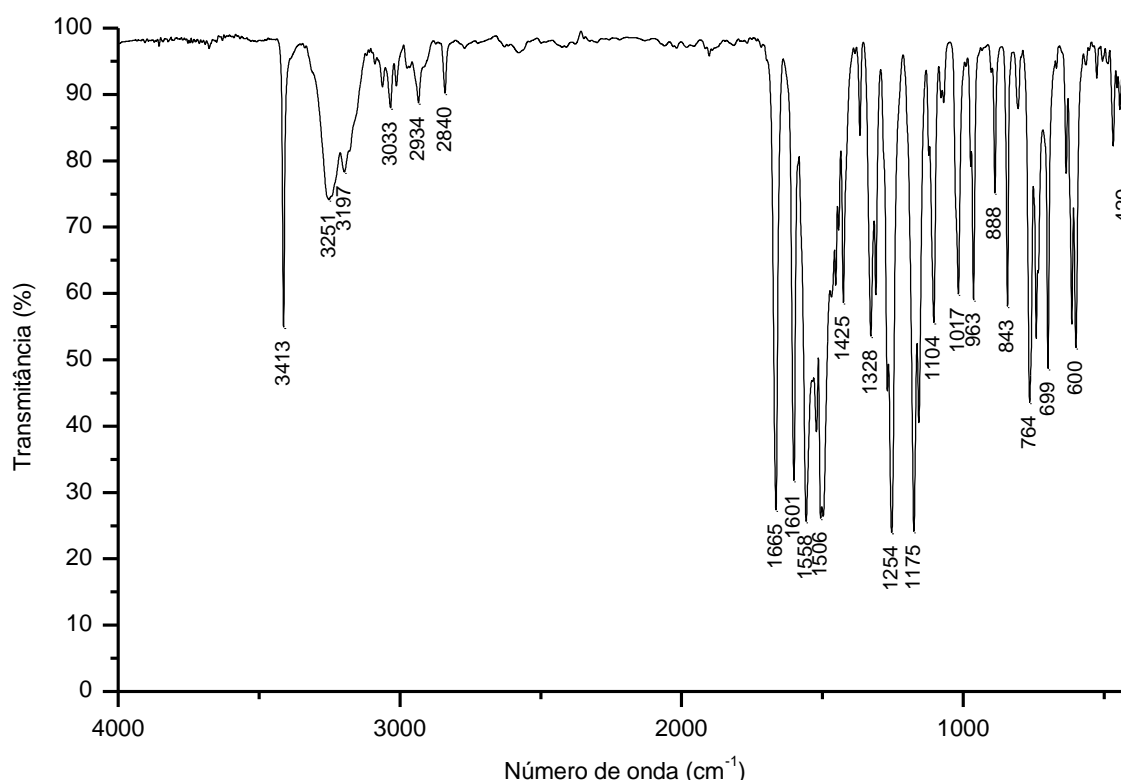
**Figura 203.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **53** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



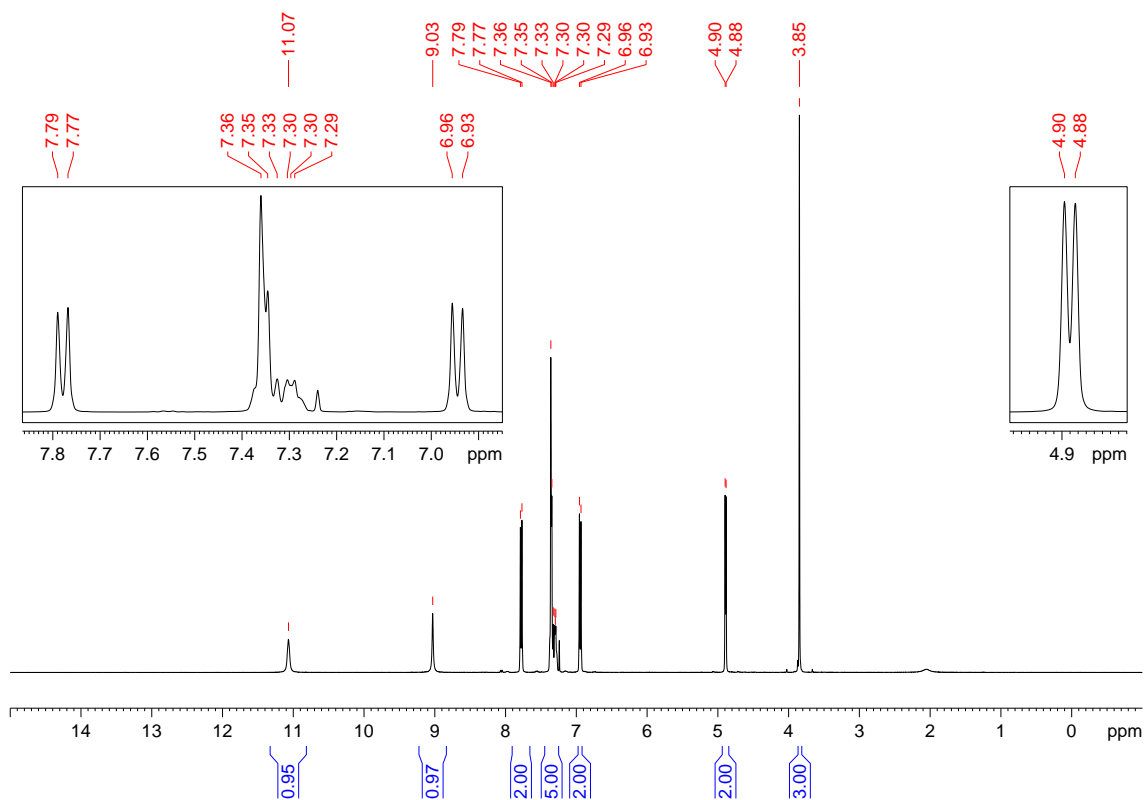
**Figura 204.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **53** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

**(54) *N*-(4-metoxibenzoil)-*N'*-benzil-tiourea:**

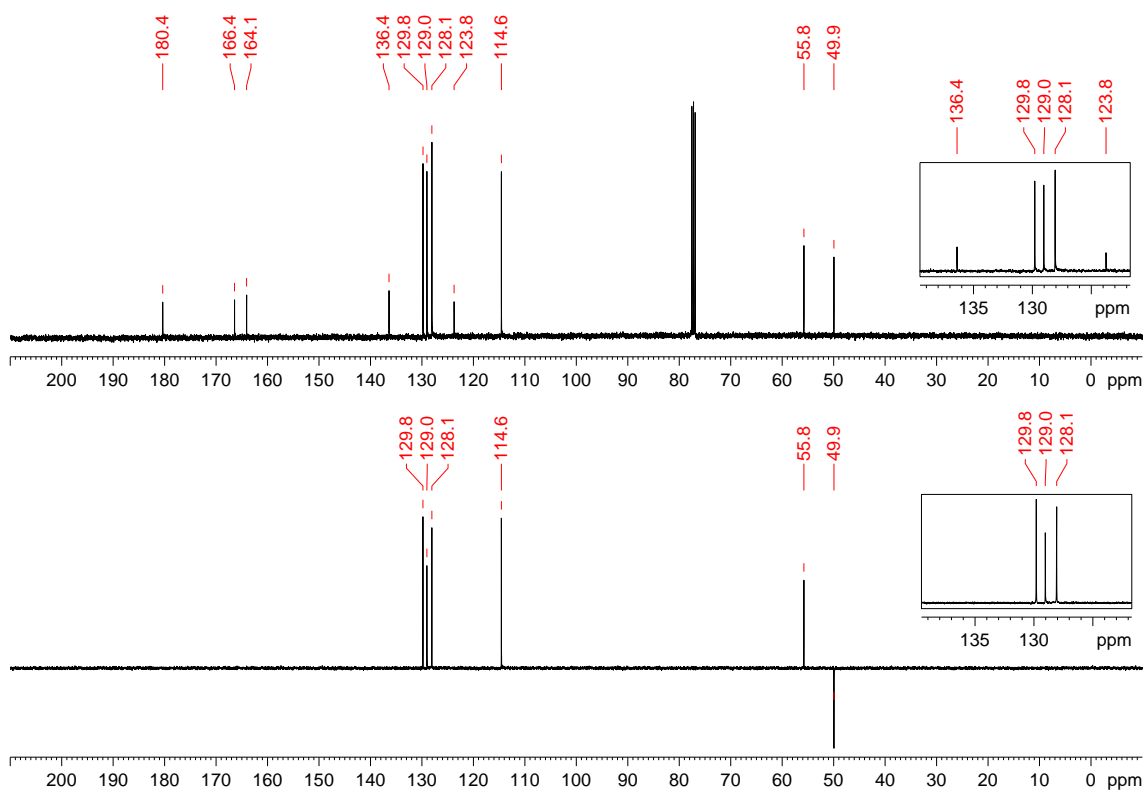
Recristalizado em etanol com rendimento de 94%. PF: 126 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3413, 3251, 3197, 3033, 2934, 2840, 1665, 1601, 1558, 1506, 1425, 1328, 1254, 1175, 1104, 1017, 963, 888, 843, 764, 699, 600, 429. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3,85 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 4,89 (2H, d,  $^3J$  5,3 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 6,95 (2H, d,  $^3J$  8,7 Hz), 7,25-7,37 (5H, m), 7,78 (2H, d,  $^3J$  8,7 Hz), 9,03 (1H, s, CONH), 11,07 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 49,9(-) ( $\text{CH}_2$ ), 55,8(+) ( $\text{OCH}_3$ ), 114,6(+) ( $\text{CH}$ ), 123,8 (C), 128,1(+) ( $\text{CH}$ ), 129,0(+) ( $\text{CH}$ ), 129,8(+) ( $\text{CH}$ ), 136,4 (C), 164,1 (C), 166,4 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 180,4 ( $\text{C}=\text{S}$ ).



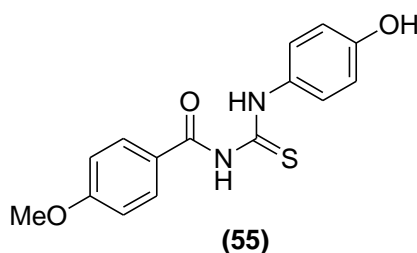
**Figura 205.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **54**.



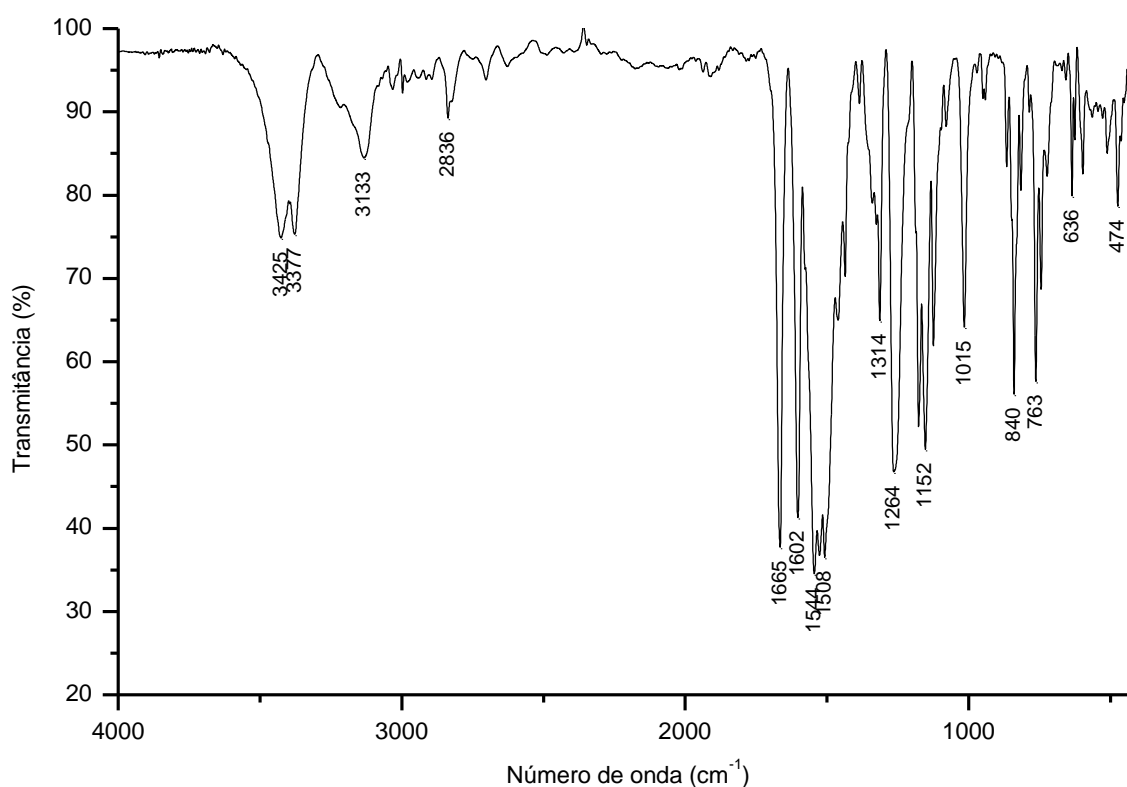
**Figura 206.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **54** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).



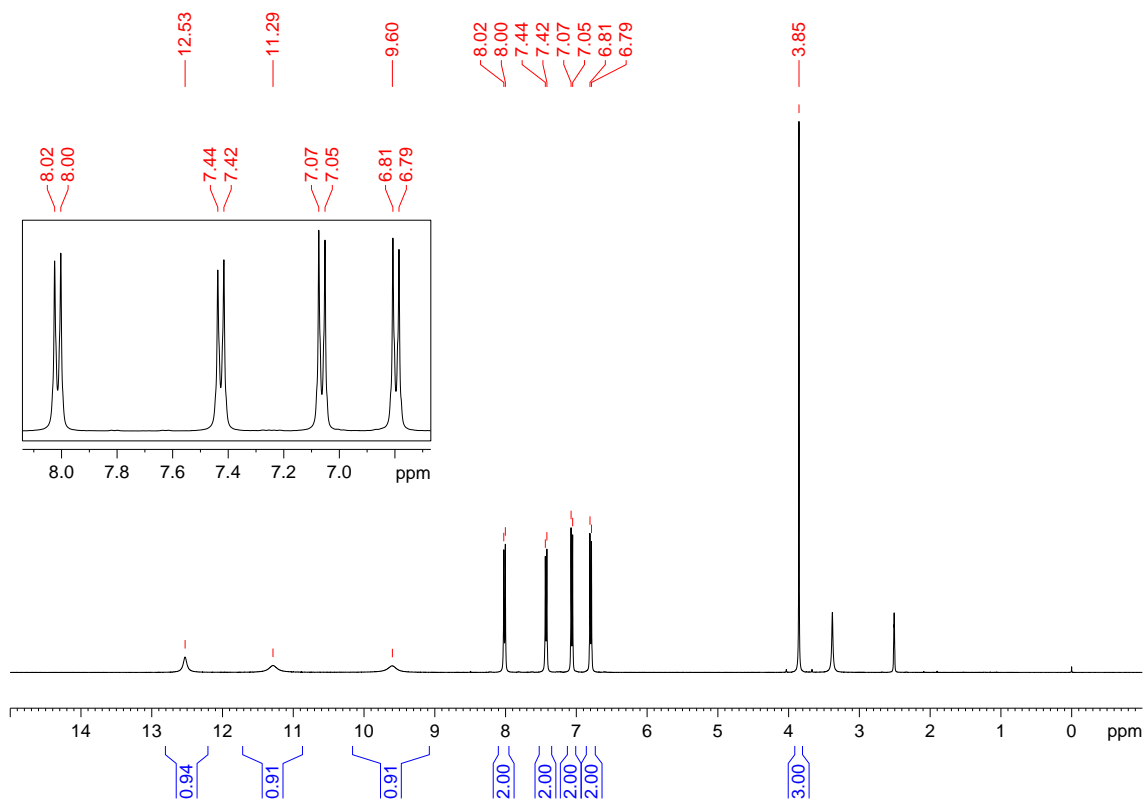
**Figura 207.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **54** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

**(55) *N*-(4-metoxibenzoil)-*N'*-(4-hidroxifenil)-tioureia:**

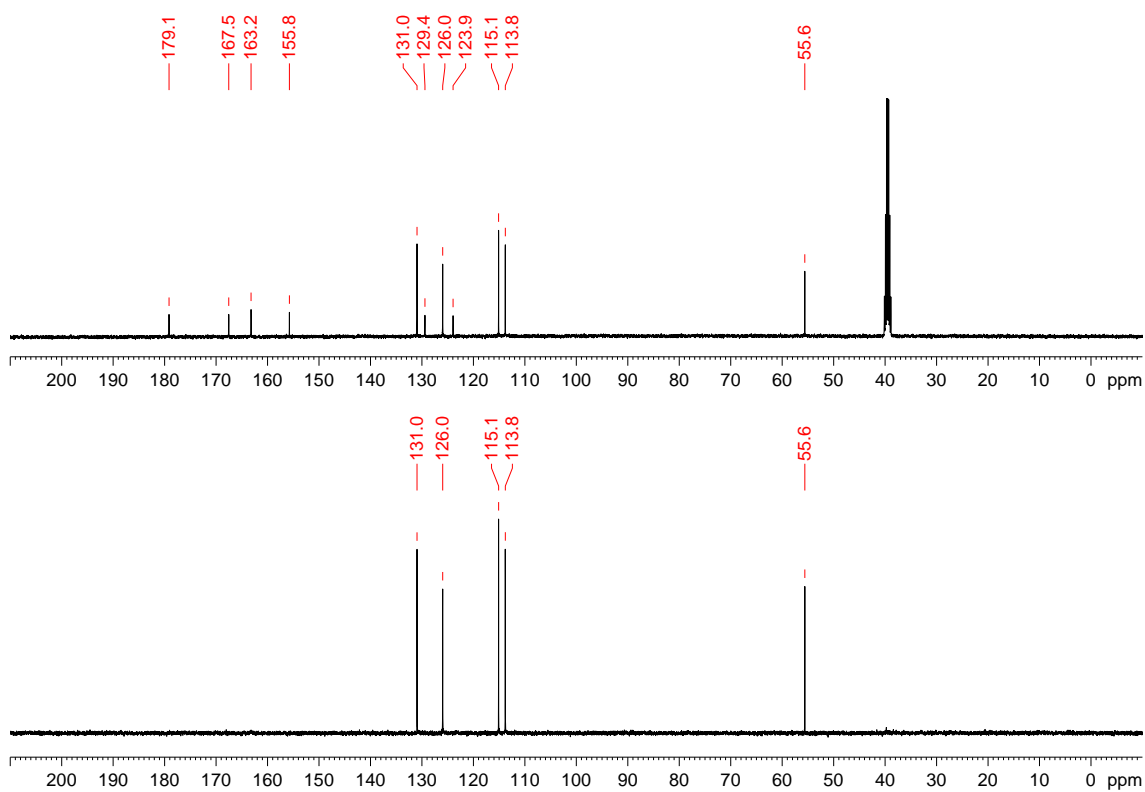
Recristalizado em etanol com rendimento de 81%. PF: 170 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3425, 3377, 3133, 2836, 1665, 1602, 1544, 1508, 1314, 1264, 1152, 1015, 840, 763, 636, 474. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 3,85 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 6,80 (2H, d,  $^3J$  8,9 Hz), 7,06 (2H, d,  $^3J$  8,9 Hz), 7,43 (2H, d,  $^3J$  8,9 Hz), 8,01 (2H, d,  $^3J$  8,9 Hz), 9,60 (1H, s, OH), 11,29 (1H, s, CONH), 12,53 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 55,6(+) ( $\text{OCH}_3$ ), 113,8(+) (CH), 115,1(+) (CH), 123,9 (C), 126,0(+) (CH), 129,4 (C), 131,0(+) (CH), 155,8 (C), 163,2 (C), 167,5 (C=O), 179,1 (C=S).



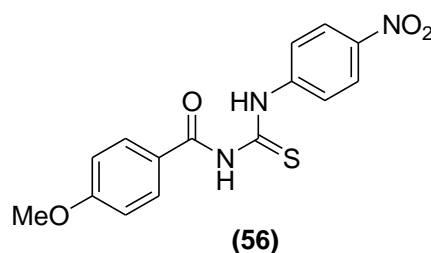
**Figura 208.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **55**.



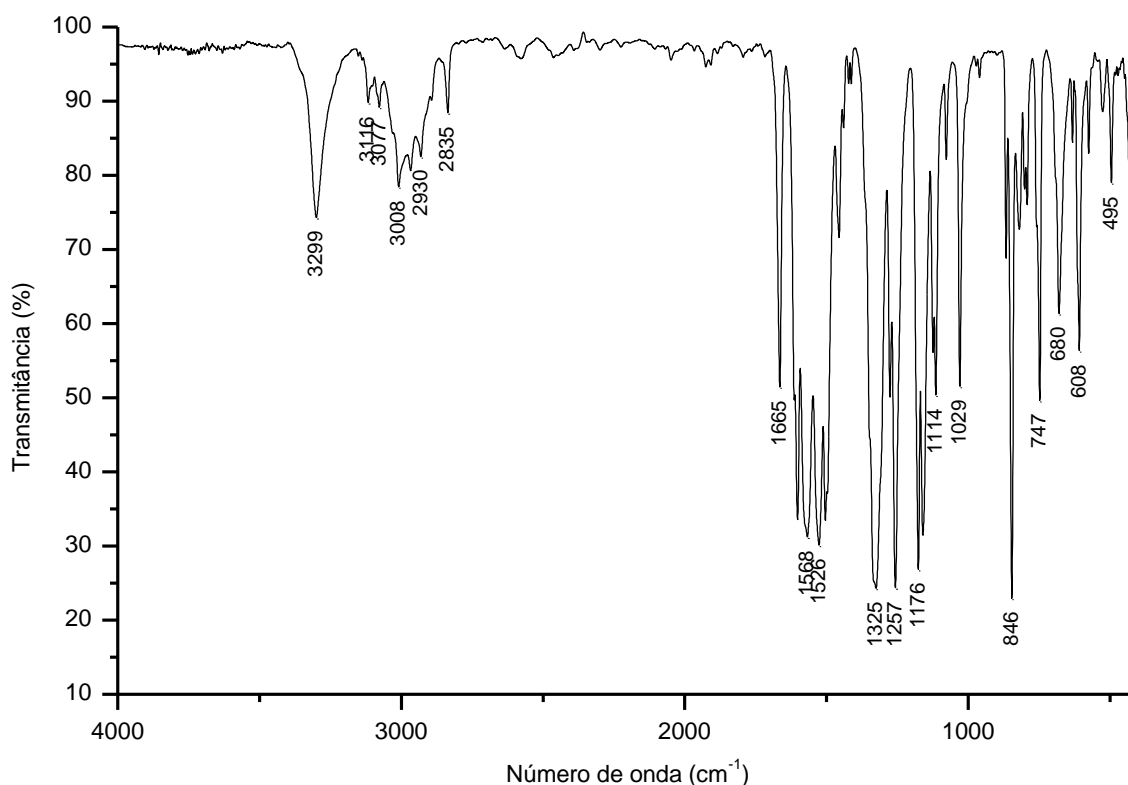
**Figura 209.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **55** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO}-d_6$ ).



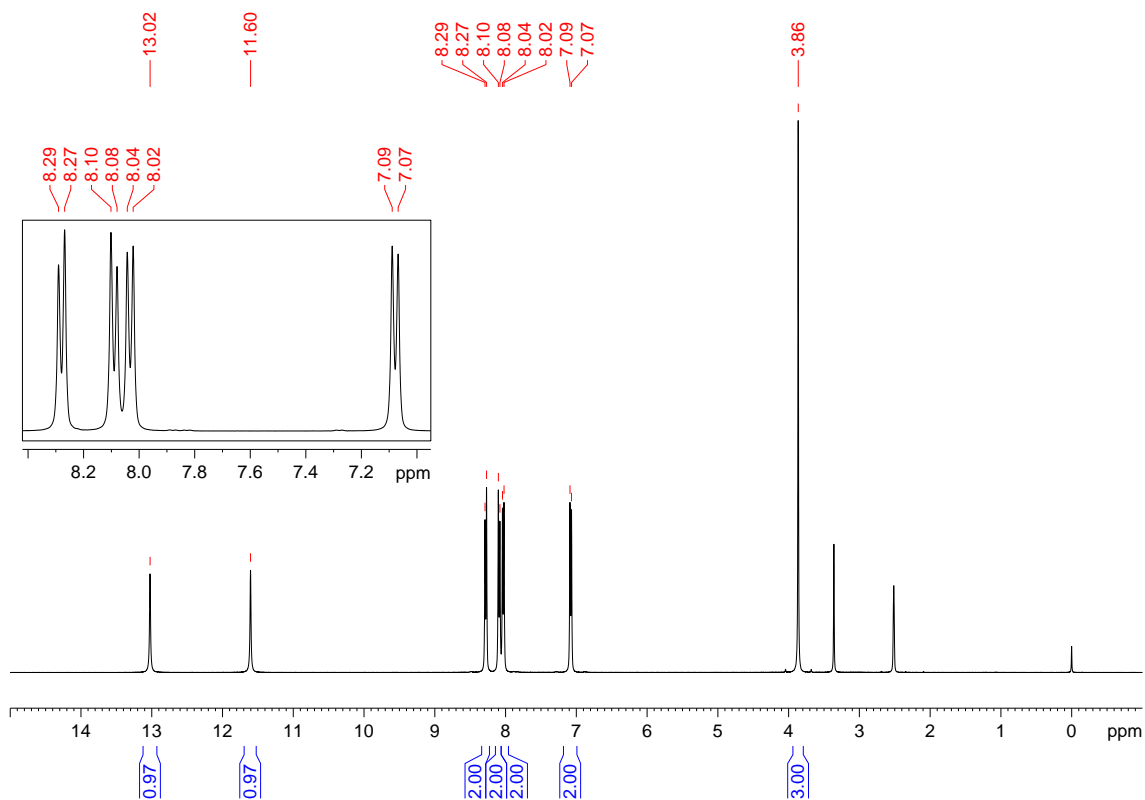
**Figura 210.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **55** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO}-d_6$ ).

**(56) *N*-(4-metoxibenzoil)-*N'*-(4-nitrofenil)-tiourea:**

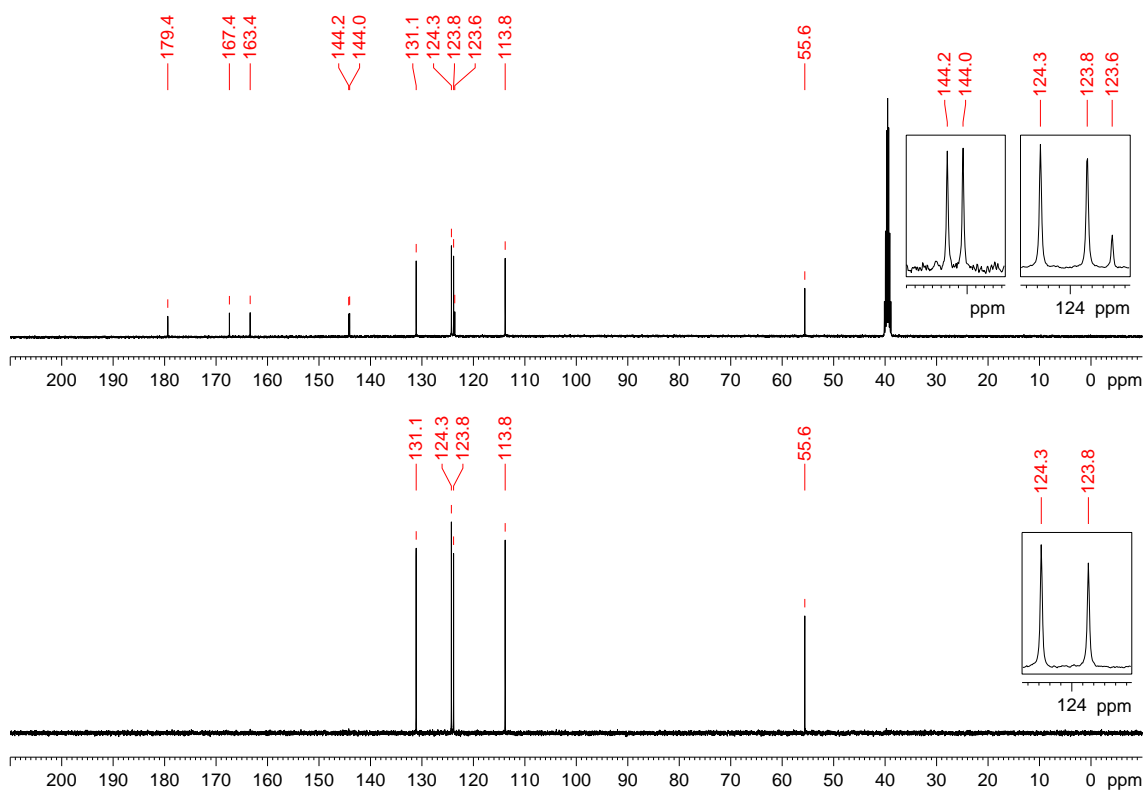
Recristalizado em etanol com rendimento de 95%. PF: 180 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3299, 3116, 3077, 3008, 2930, 2835, 1665, 1568, 1526, 1325, 1257, 1176, 1114, 1029, 846, 747, 680, 608, 495. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 3,86 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 7,08 (2H, d,  $^3J$  8,5 Hz), 8,03 (2H, d,  $^3J$  8,5 Hz), 8,09 (2H, d,  $^3J$  8,7 Hz), 8,28 (2H, d,  $^3J$  8,7 Hz), 11,60 (1H, s, CONH), 13,02 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 55,6(+) ( $\text{OCH}_3$ ), 113,8(+) (CH), 123,6 (C), 123,8 (C), 124,3(+) (CH), 131,1(+) (CH), 144,0 (C), 144,2 (C), 163,4 (C), 167,4 (C=O), 179,4 (C=S).



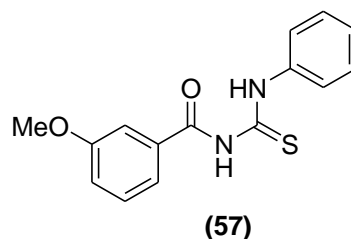
**Figura 211.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **56**.



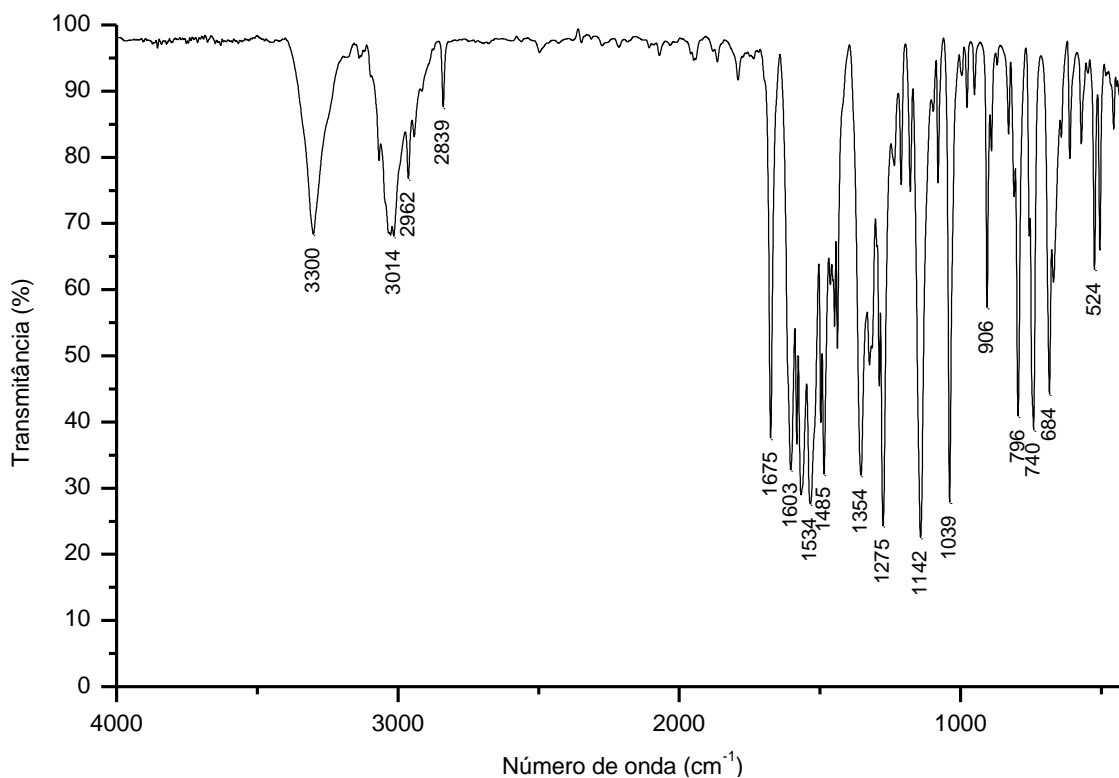
**Figura 212.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **56** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



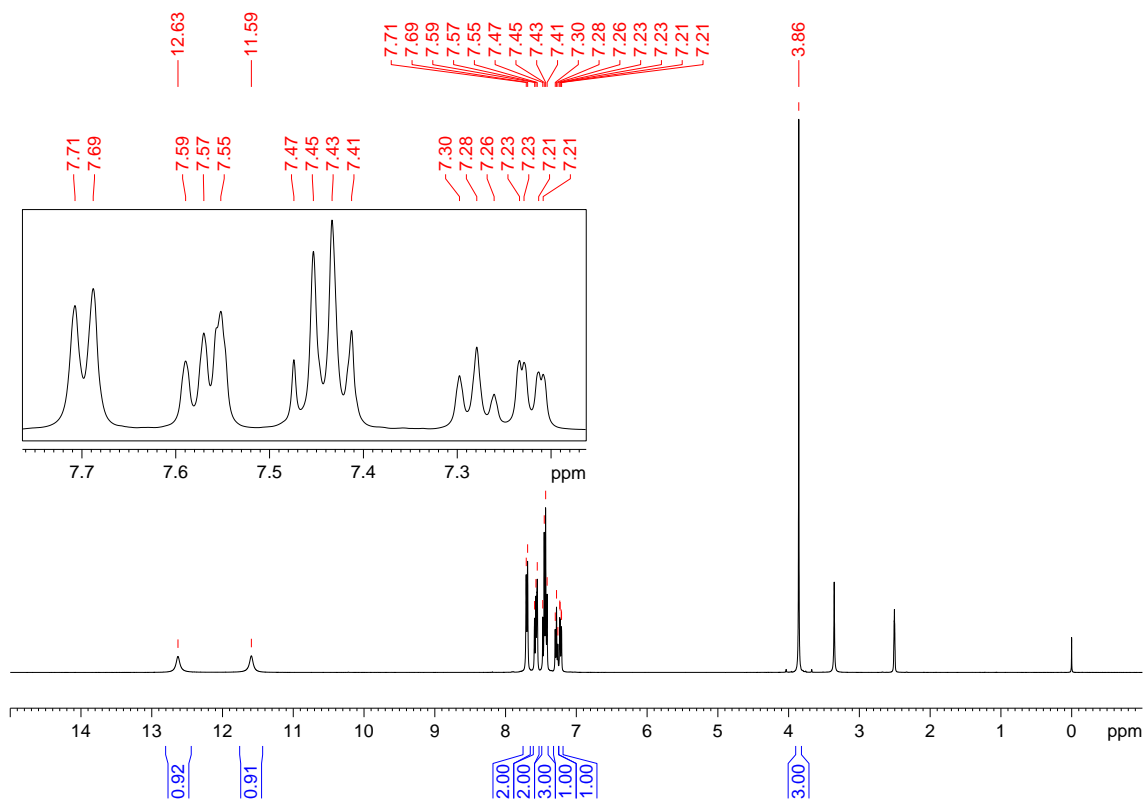
**Figura 213.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **56** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

**(57) *N*-(3-metoxibenzoil)-*N'*-fenil-tioureia:**

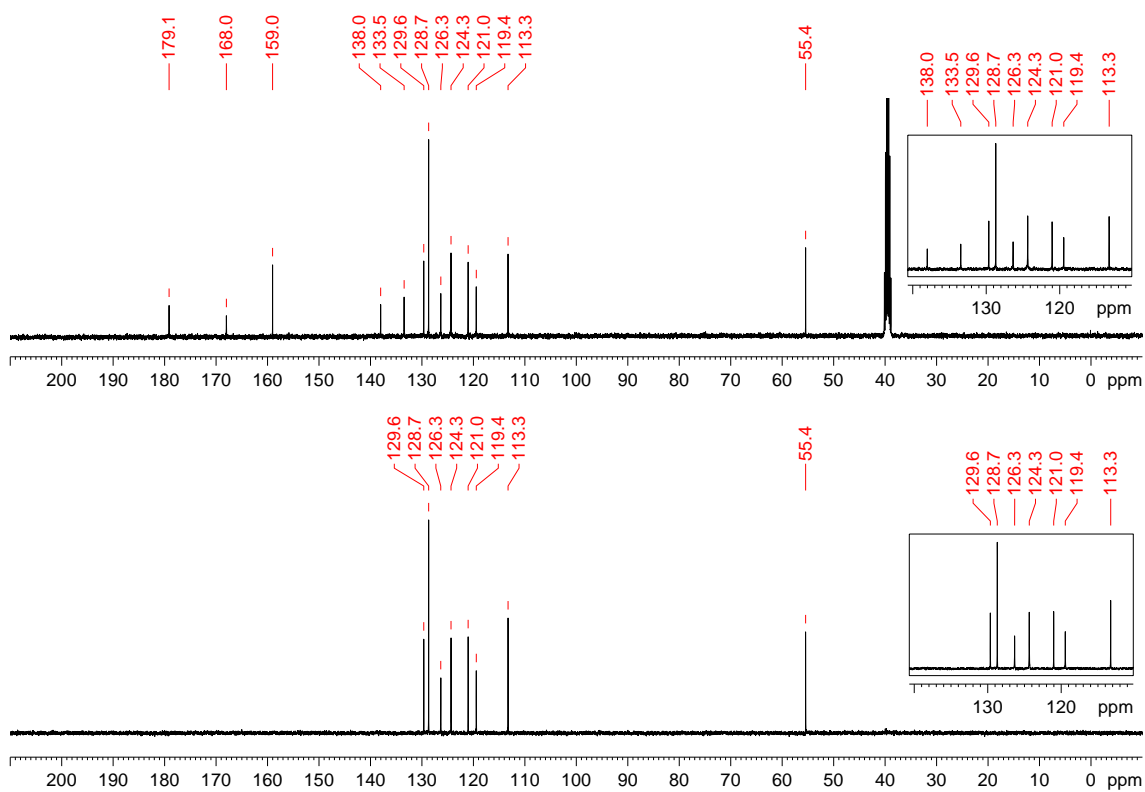
Recristalizado em etanol, com rendimento de 82%. PF: 103 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3300, 3014, 2962, 2839, 1675, 1603, 1534, 1485, 1354, 1275, 1142, 1039, 906, 796, 740, 684, 524. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 3,86 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 7,22 (1H, dd,  $^3J$  8,2 Hz), 7,28 (1H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,41-7,47 (3H, m), 7,55-7,59 (2H, m), 7,70 (2H, d,  $^3J$  7,5 Hz), 11,59 (1H, s, CONH), 12,63 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 55,5(+) ( $\text{OCH}_3$ ), 113,3(+) (CH), 119,4(+) (CH), 121,0(+) (CH), 124,3(+) (CH), 126,3(+) (CH), 128,7(+) (CH), 129,6(+) (CH), 133,5 (C), 138,0 (C), 159,0 (C), 168,0 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 179,1 ( $\text{C}=\text{S}$ ).



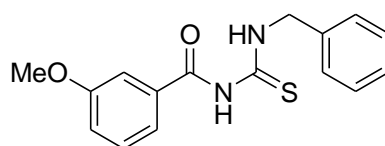
**Figura 214.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **57**.



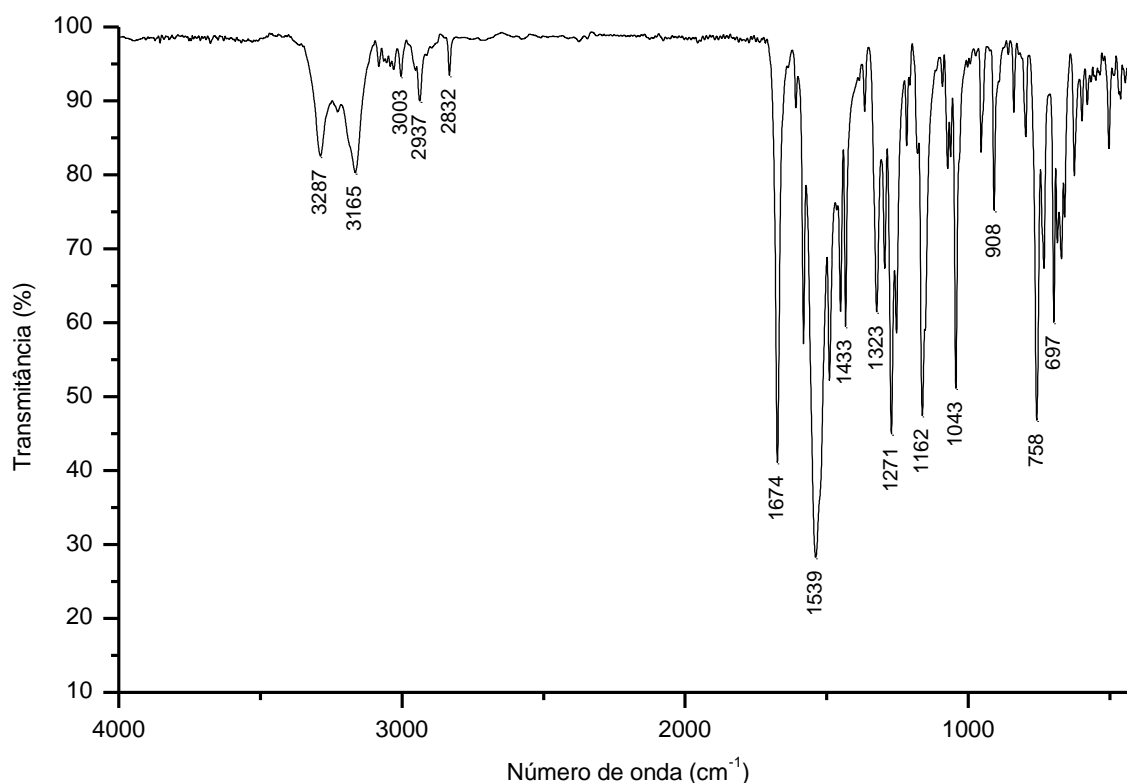
**Figura 215.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **57** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

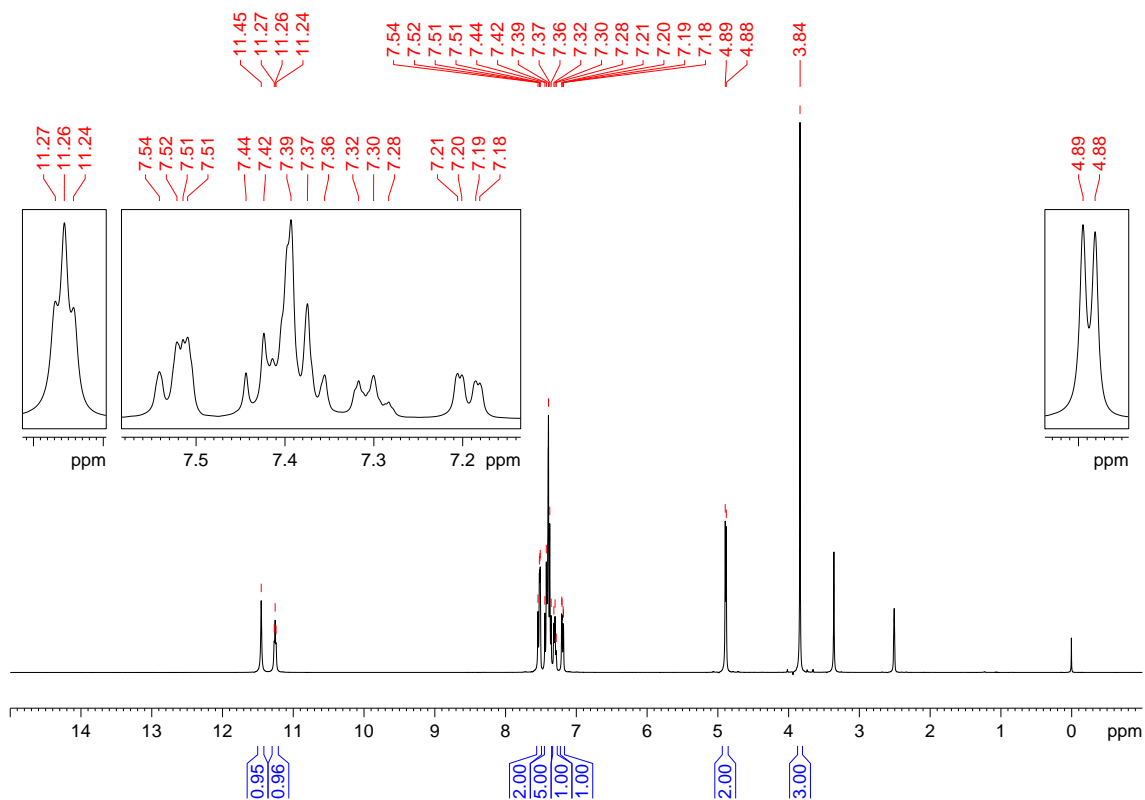


**Figura 216.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **57** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

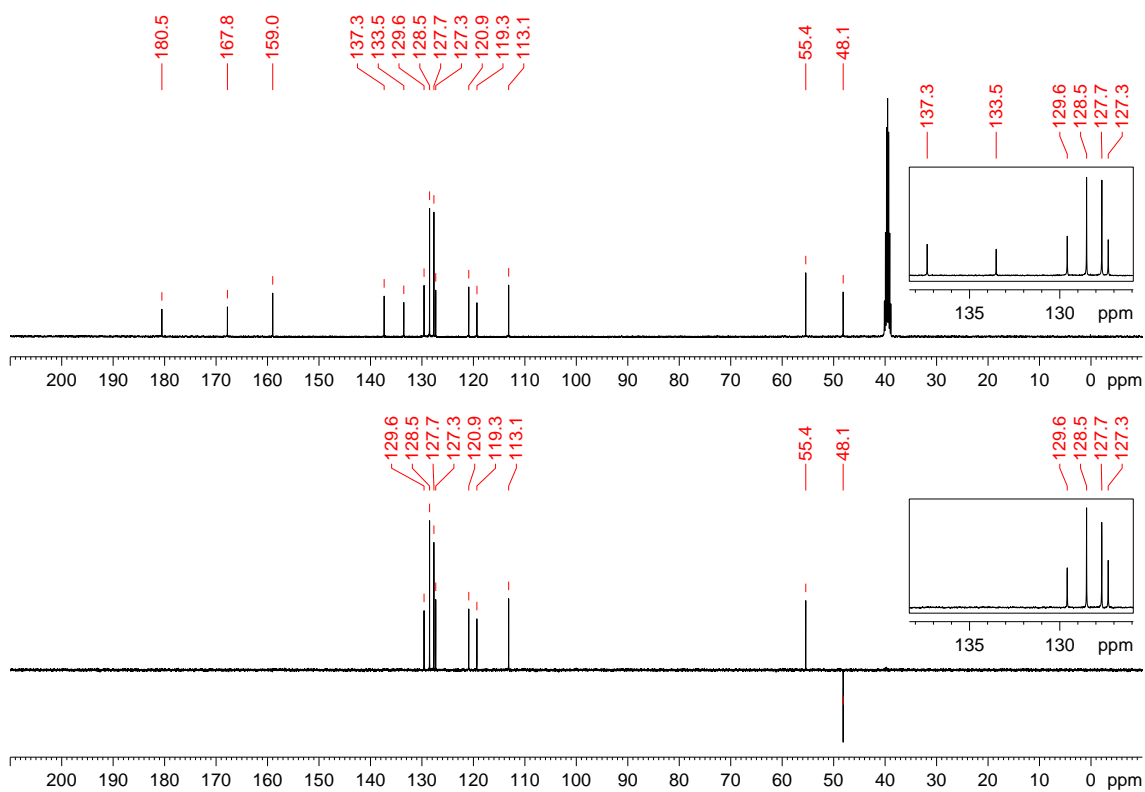
**(58) *N*-(3-metoxibenzoil)-*N'*-benzil-tioureia:****(58)**

Recristalizado em etanol, com rendimento de 76%. PF: 85 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3287, 3165, 3003, 2937, 2832, 1674, 1539, 1433, 1323, 1271, 1162, 1043, 908, 758, 697. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 3,84 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 4,89 (2H, d,  $^3J$  5,5 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 7,19 (1H, d,  $^3J$  8,2 Hz), 7,28-7,32 (1H, m), 7,36-7,44 (5H, m), 7,51-7,54 (2H, m), 11,26 (1H, t,  $^3J$  5,5 Hz,  $\text{CSNH}$ ), 11,45 (1H, s,  $\text{CONH}$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 48,1(-) ( $\text{CH}_2$ ), 55,4(+) ( $\text{OCH}_3$ ), 113,1(+) ( $\text{CH}$ ), 119,3(+) ( $\text{CH}$ ), 120,9(+) ( $\text{CH}$ ), 127,3(+) ( $\text{CH}$ ), 127,7(+) ( $\text{CH}$ ), 128,5(+) ( $\text{CH}$ ), 129,6(+) ( $\text{CH}$ ), 133,5 (C), 137,3 (C), 159,0 (C), 167,8 ( $\text{C=O}$ ), 180,5 ( $\text{C=S}$ ).

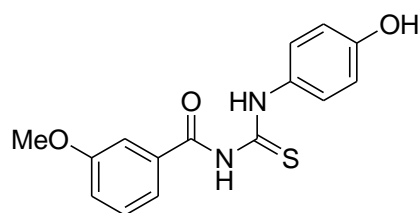
**Figura 217.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **58**.



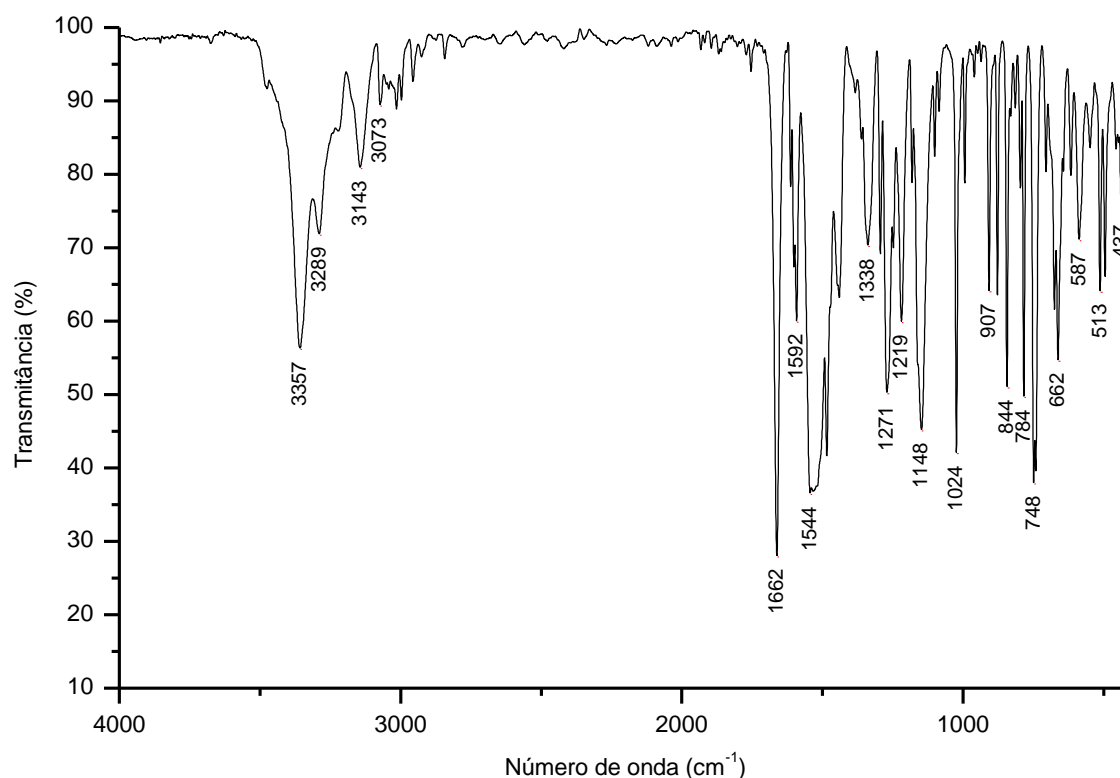
**Figura 218.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **58** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

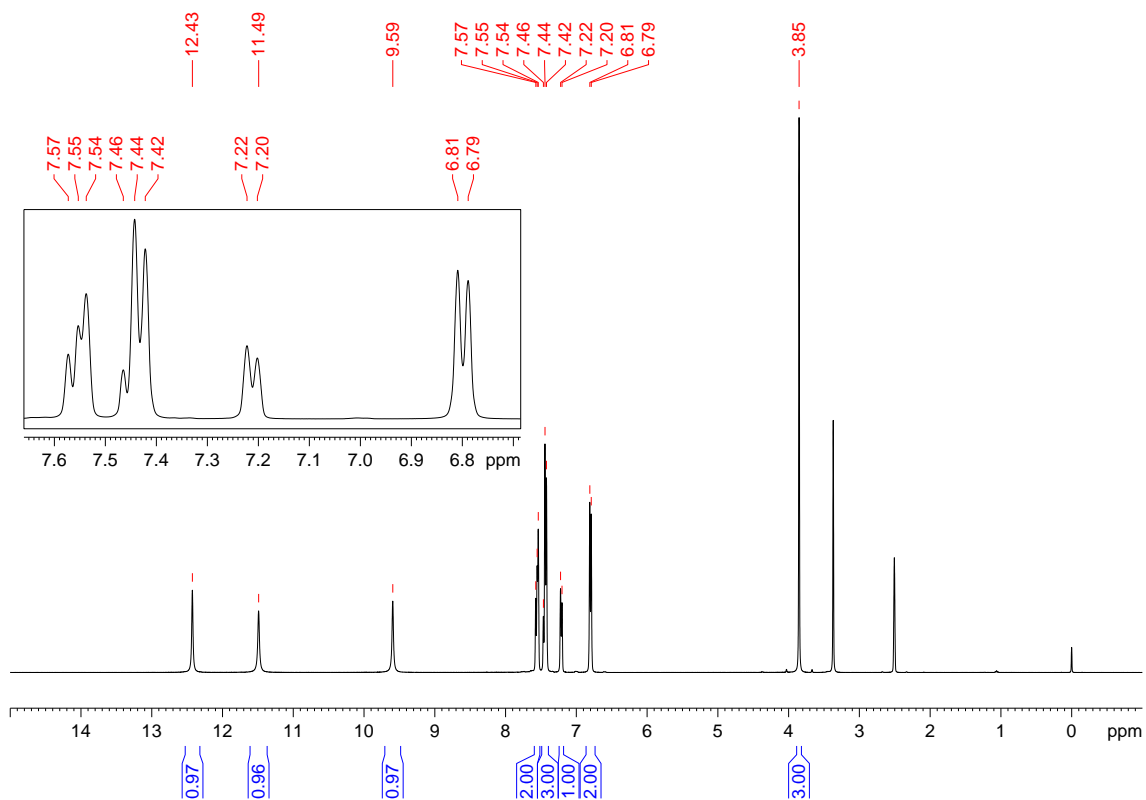


**Figura 219.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **58** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

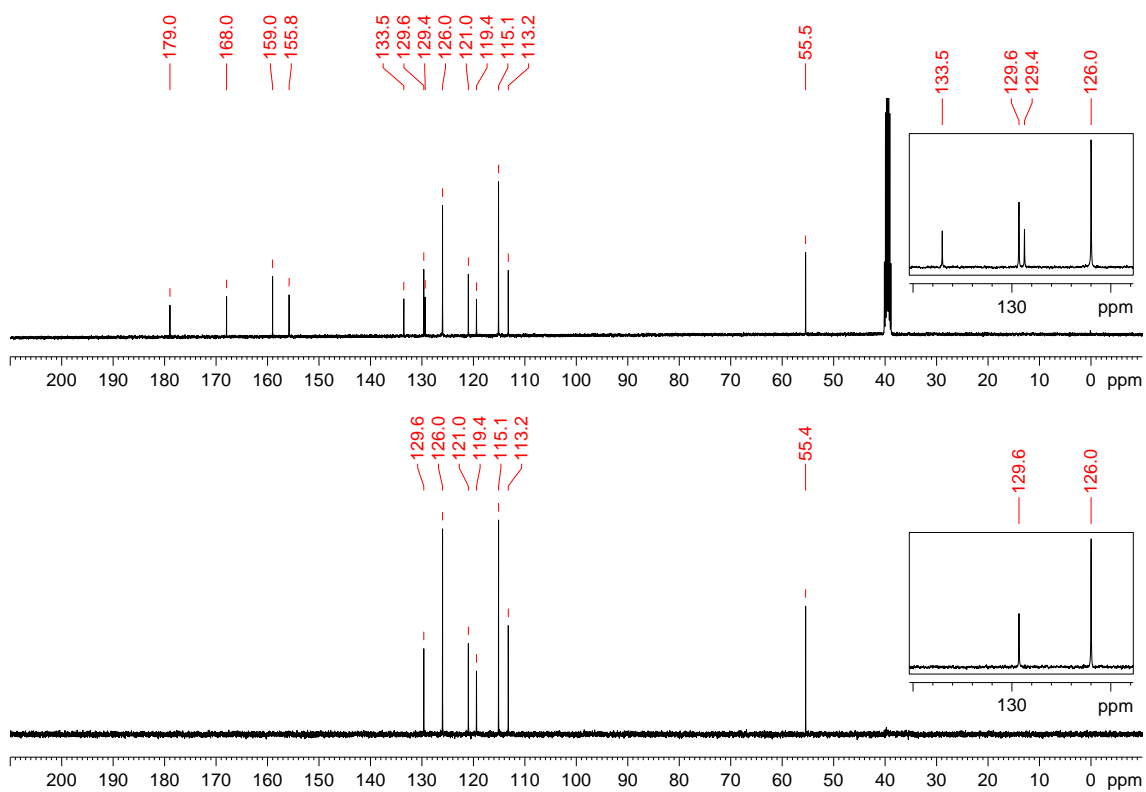
**(59) *N*-(3-metoxibenzoil)-*N'*-(4-hidroxifenil)-tiourea:****(59)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 74%. PF: 177 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3357, 3289, 3143, 3073, 1662, 1592, 1544, 1338, 1271, 1219, 1148, 1024, 907, 844, 784, 748, 662, 587, 513, 437. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 3,85 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 6,80 (2H, d,  $^3J$  8,2 Hz), 7,21 (1H, d,  $^3J$  8,2 Hz), 7,42-7,46 (m, 3H), 7,54-7,57 (2H, m), 9,59 (1H, s, OH), 11,49 (1H, s, CONH), 12,43 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 55,5(+) ( $\text{OCH}_3$ ), 113,2(+) (CH), 115,1(+) (CH), 119,4(+) (CH), 121,0(+) (CH), 126,0(+) (CH), 129,4 (C), 129,6(+) (CH), 133,5 (C), 155,8 (C), 159,0 (C), 168,0 (C=O), 179,0 (C=S).

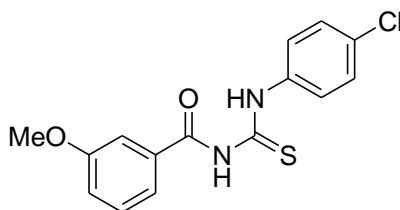
**Figura 220.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **59**.



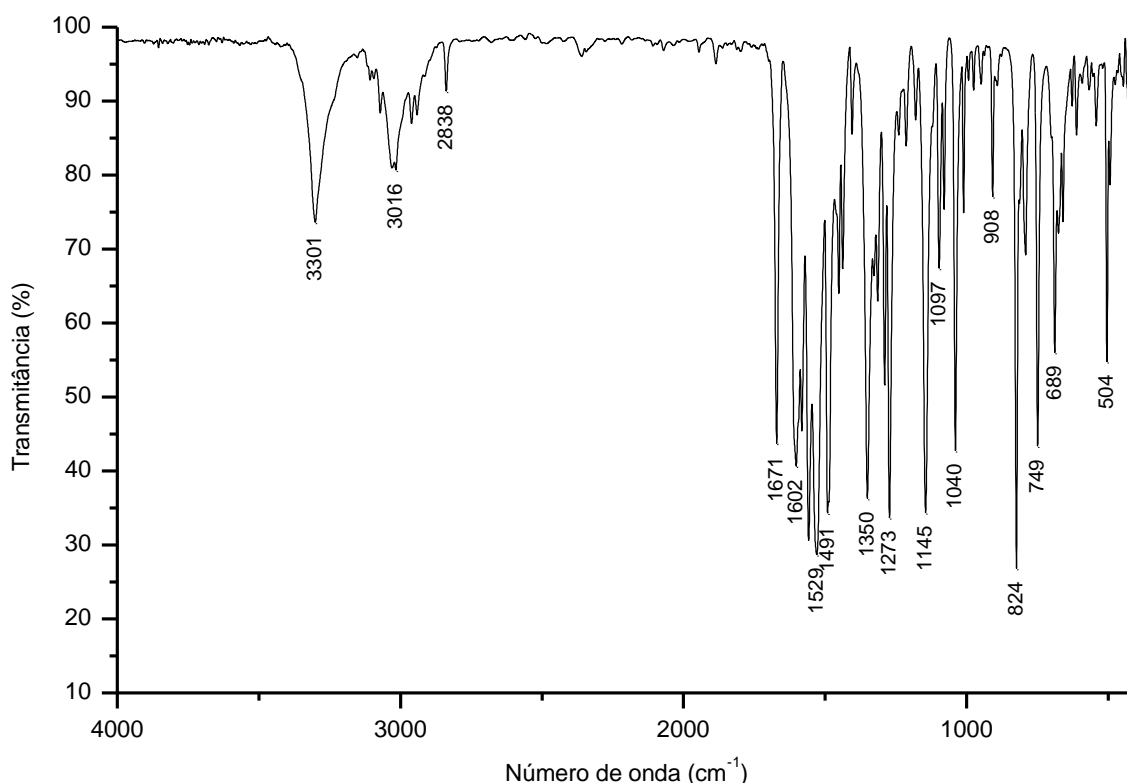
**Figura 221.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **59** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

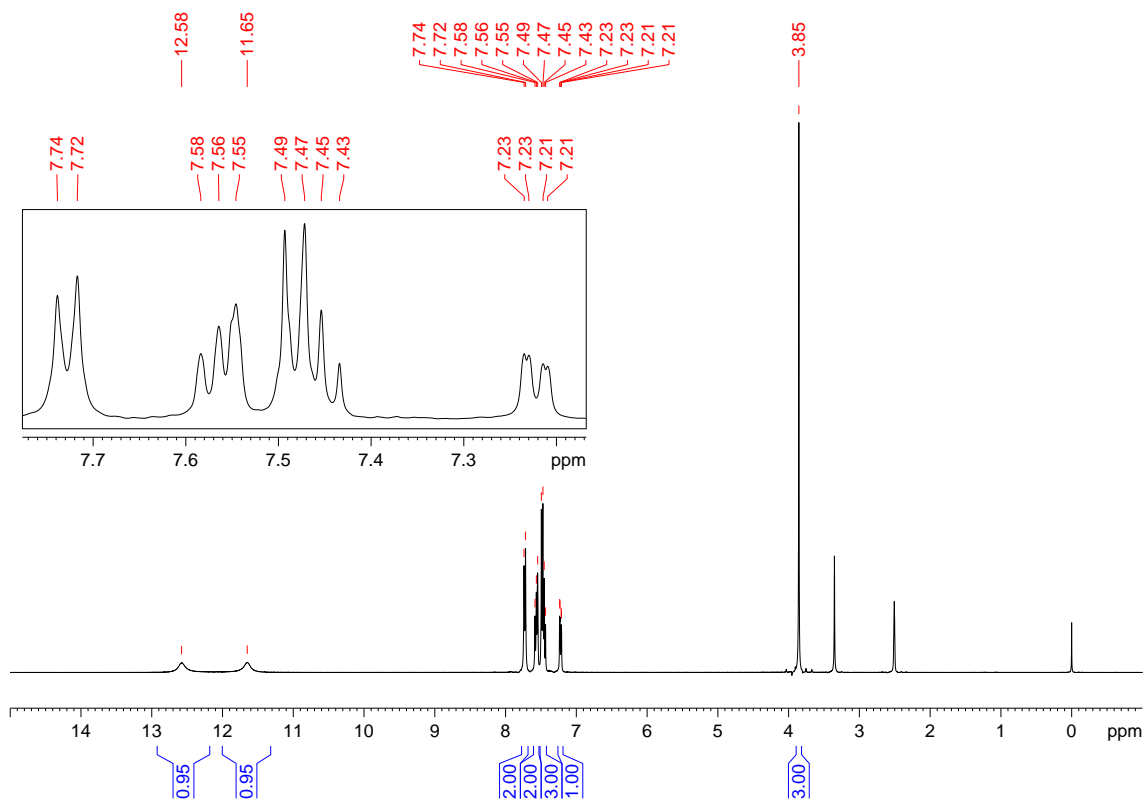


**Figura 222.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **59** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

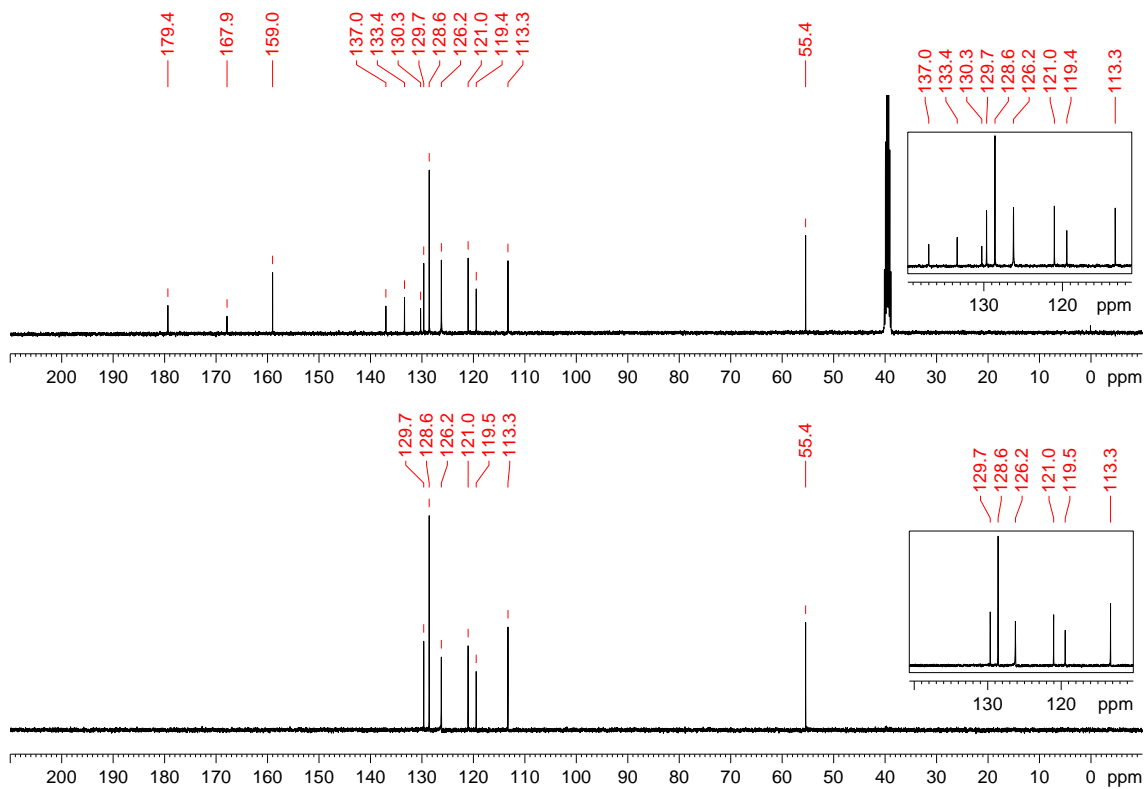
**(60) *N*-(3-metoxibenzoil)-*N'*-(4-clorofenil)-tiourea:****(60)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 96%. PF: 123 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3301, 3016, 2838, 1671, 1602, 1529, 1491, 1350, 1273, 1145, 1097, 1040, 908, 824, 749, 689, 504. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 3,85 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 7,22 (1H, d,  $^3J$  8,1 Hz), 7,43-7,49 (3H, m), 7,55-7,58 (2H, m), 7,73 (2H, d,  $^3J$  8,5 Hz), 11,65 (1H, s, CONH), 12,58 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 55,4(+) ( $\text{OCH}_3$ ), 113,3(+) (CH), 119,4(+) (CH), 121,0(+) (CH), 126,2(+) (CH), 128,6(+) (CH), 129,7(+) (CH), 130,3 (C), 133,4 (C), 137,0 (C), 159,0 (C), 167,9 (C=O), 179,4 (C=S).

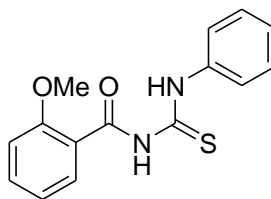
**Figura 223.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **60**.



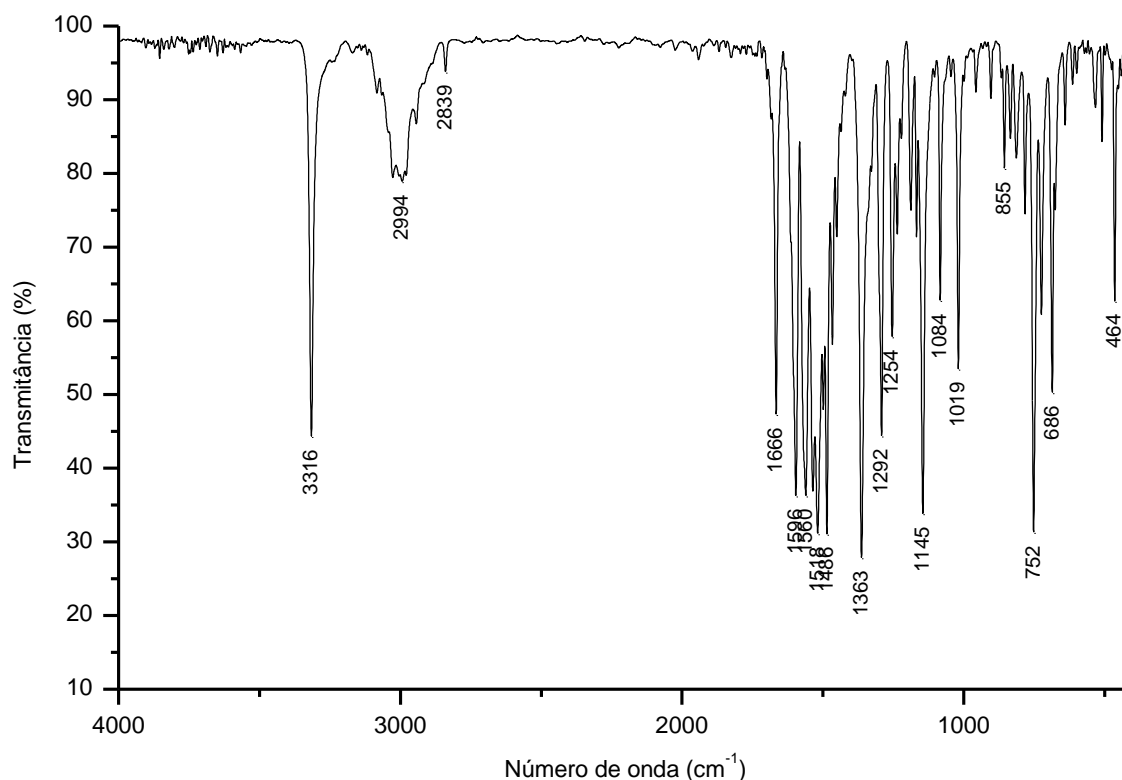
**Figura 224.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **60** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO}-d_6$ ).

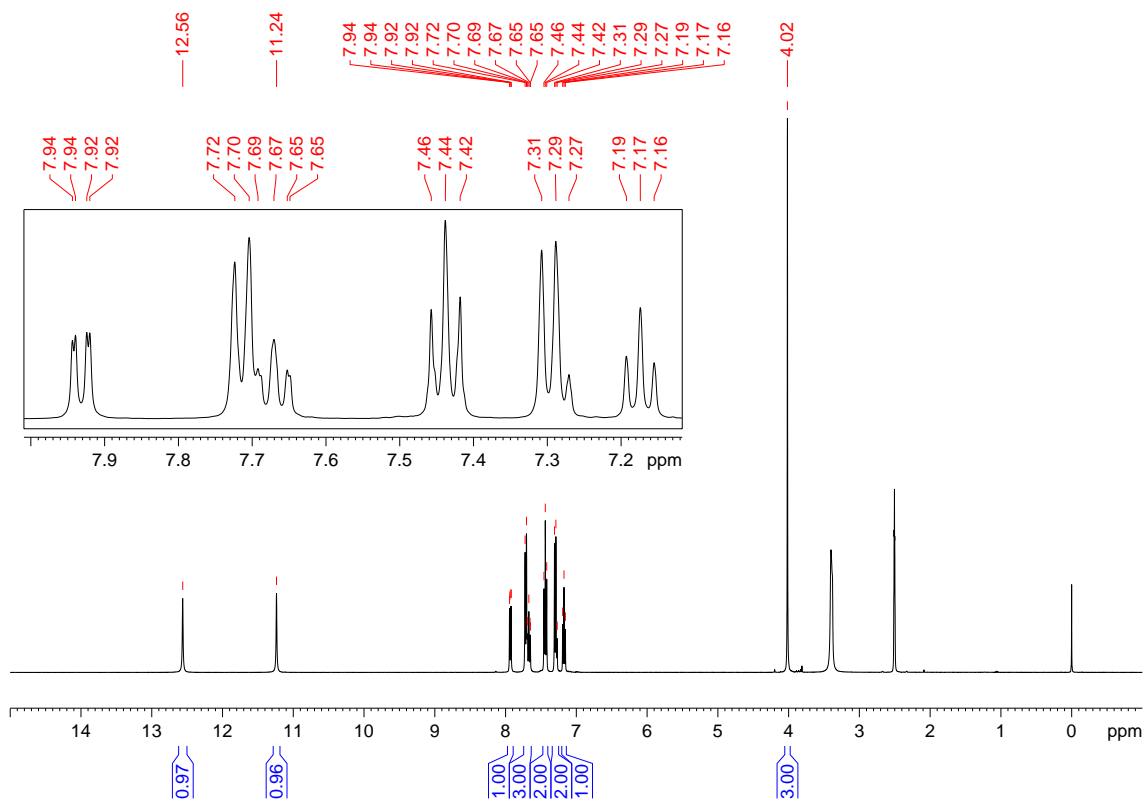


**Figura 225.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **60** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO}-d_6$ ).

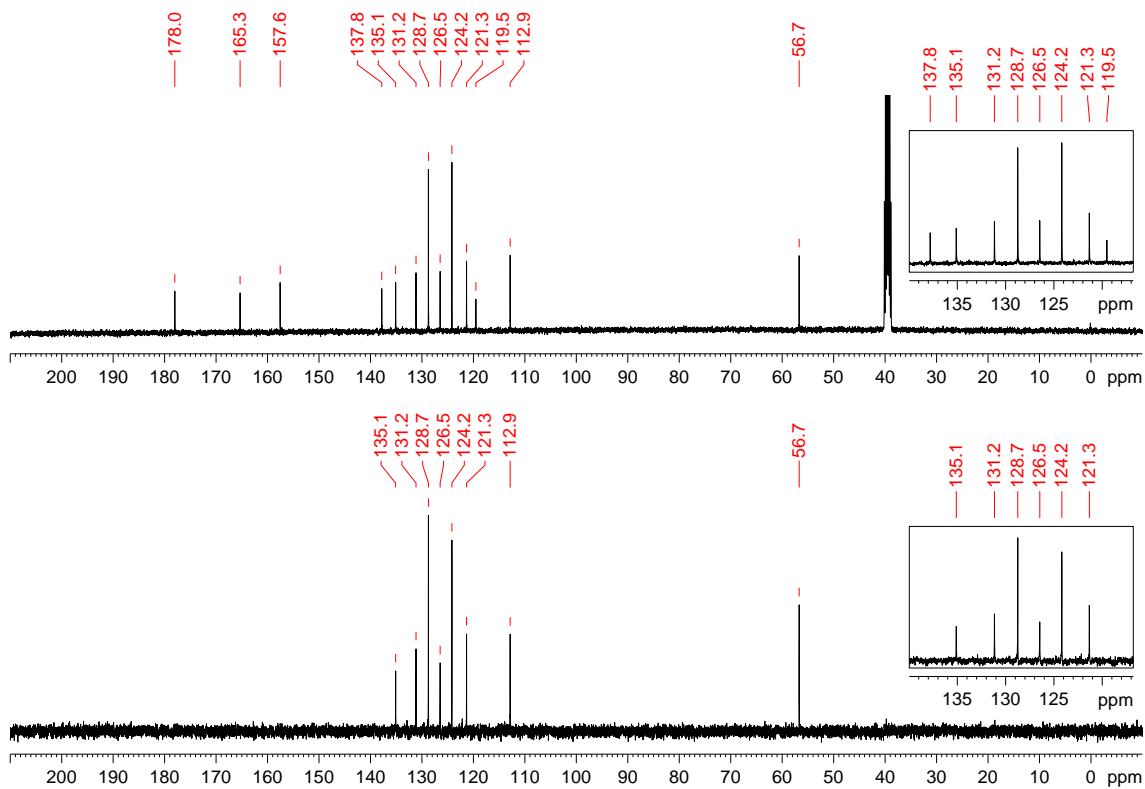
**(61) *N*-(2-metoxibenzoil)-*N'*-fenil-tioureia:****(61)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 78%. PF: 139 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3316, 2994, 2839, 1666, 1596, 1560, 1518, 1486, 1363, 1292, 1254, 1145, 1084, 1019, 855, 752, 686, 464. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 4,02 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 7,17 (1H, t,  $^3J$  7,4 Hz), 7,27-7,31 (2H, m), 7,44 (2H, t,  $^3J$  7,8 Hz), 7,65-7,72 (3H, m), 7,93 (1H, dd,  $^3J$  7,8 Hz,  $^4J$  1,7 Hz), 11,24 (1H, s, CONH), 12,56 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 56,7(+) ( $\text{OCH}_3$ ), 112,9(+) (CH), 119,5 (C), 121,3(+) (CH), 124,2(+) (CH), 126,5(+) (CH), 128,7(+) (CH), 131,2(+) (CH), 135,1(+) (CH), 137,8 (C), 157,6 (C), 165,3 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 178,0 ( $\text{C}=\text{S}$ ).

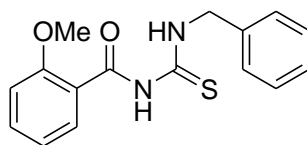
**Figura 226.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **61**.



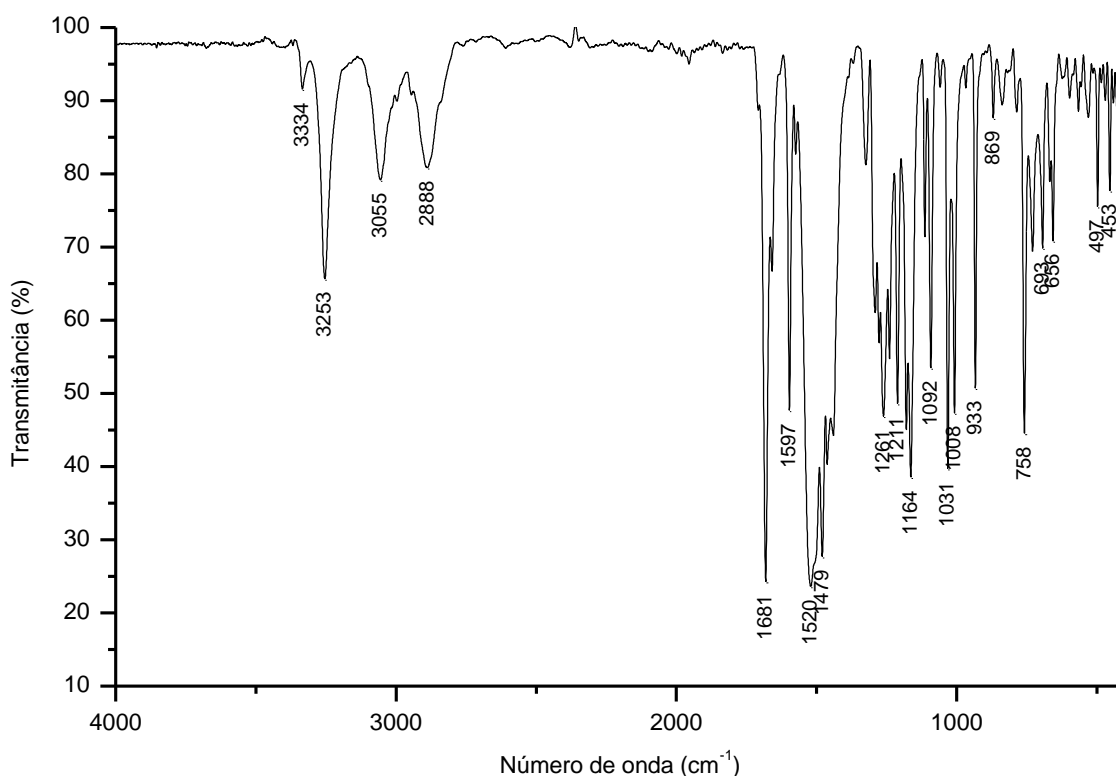
**Figura 227.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **61** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

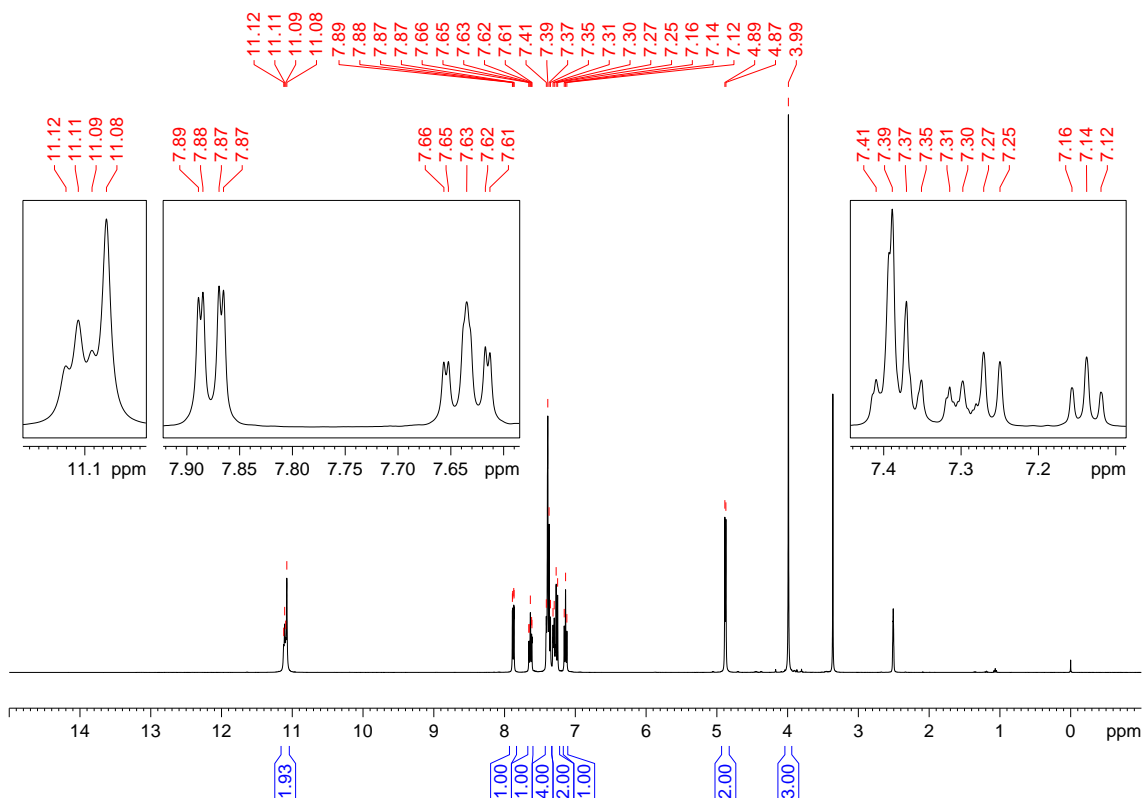


**Figura 228.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **61** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

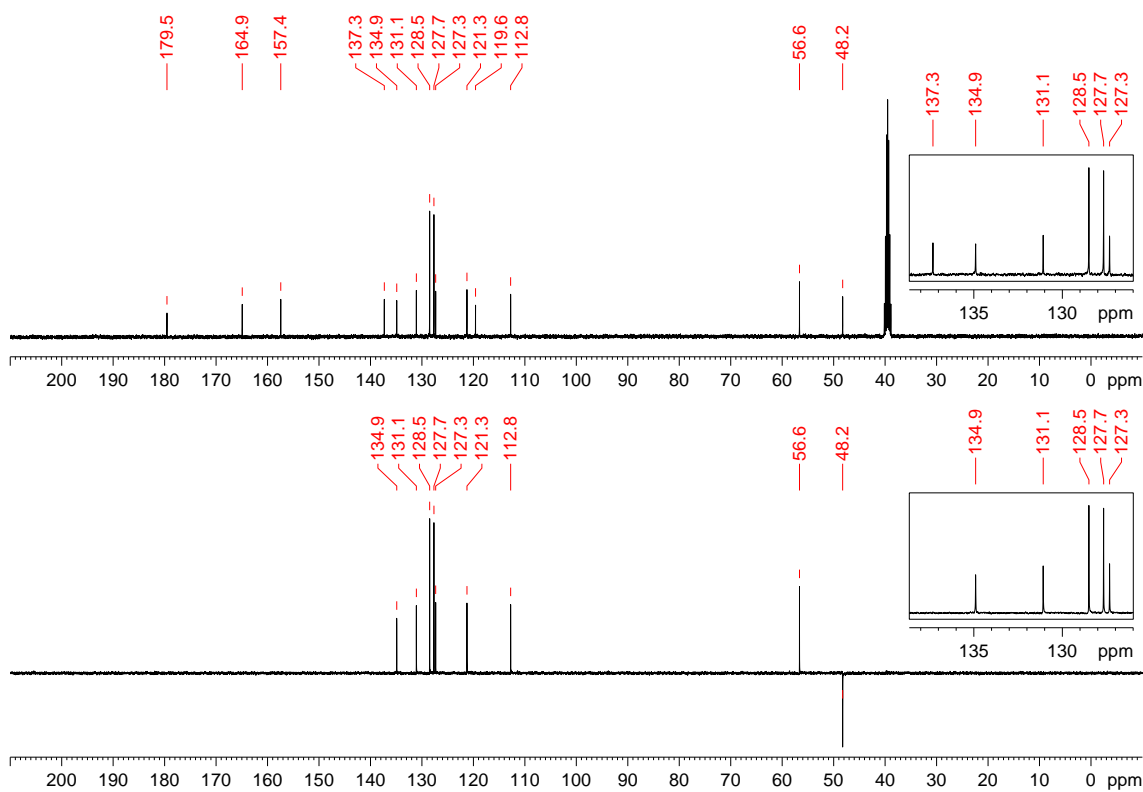
**(62) *N*-(2-metoxibenzoil)-*N'*-benzil-tioureia:****(62)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 69%. PF: 96 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3334, 3253, 3055, 2888, 1681, 1597, 1520, 1479, 1261, 1211, 1164, 1092, 1031, 1008, 933, 869, 758, 693, 656, 497, 453. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 3,99 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 4,88 (2H, d,  $^3J$  5,8 Hz), 7,14 (1H, t,  $^3J$  7,6 Hz), 7,25-7,31 (2H, m), 7,35-7,41 (4H, m), 7,63 (1H, t,  $^3J$  8,0 Hz), 7,88 (1H, d,  $^3J$  8,0 Hz), 11,08 (1H, s, CONH), 11,11 (1H, t,  $^3J$  5,8 Hz, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 48,2(-) ( $\text{CH}_2$ ), 56,6(+) ( $\text{OCH}_3$ ), 112,8(+) ( $\text{CH}$ ), 119,6 (C), 121,3(+) ( $\text{CH}$ ), 127,3(+) ( $\text{CH}$ ), 127,7(+) ( $\text{CH}$ ), 128,5(+) ( $\text{CH}$ ), 131,1(+) ( $\text{CH}$ ), 134,9(+) ( $\text{CH}$ ), 137,3 (C), 157,4 (C), 164,9 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 179,5 ( $\text{C}=\text{S}$ ).

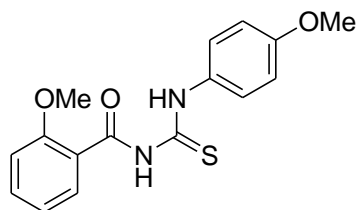
**Figura 229.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **62**.



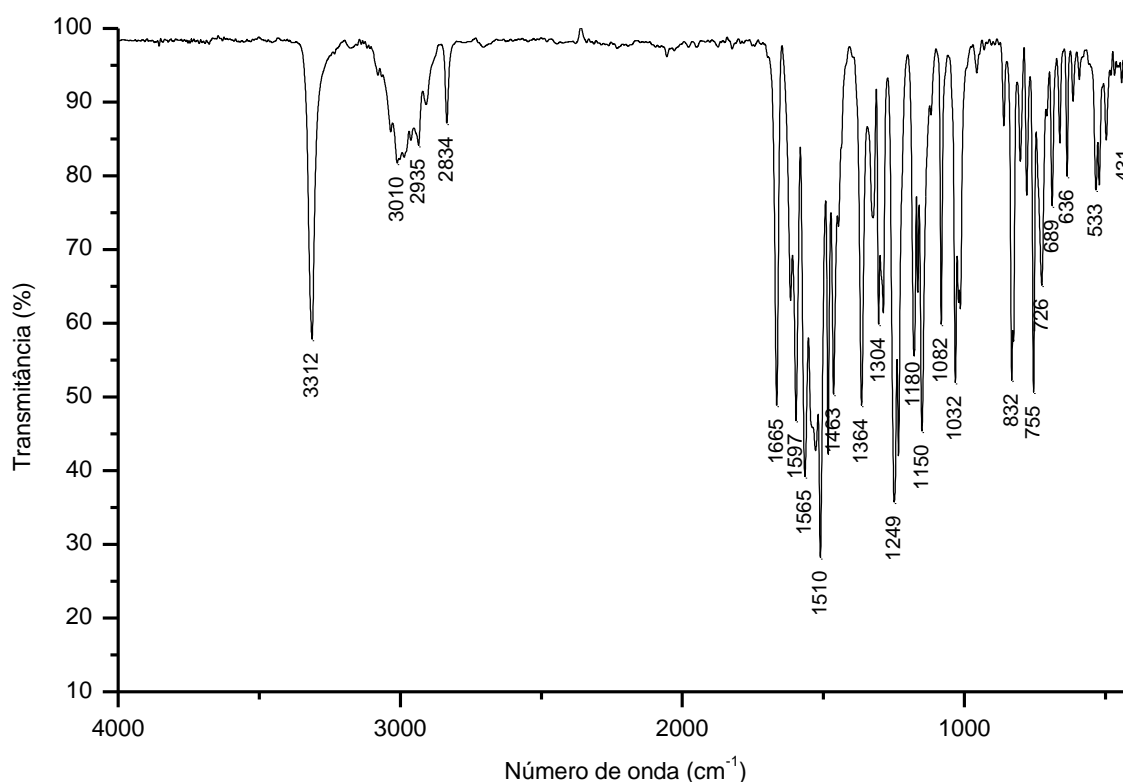
**Figura 230.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **62** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-d}_6$ ).

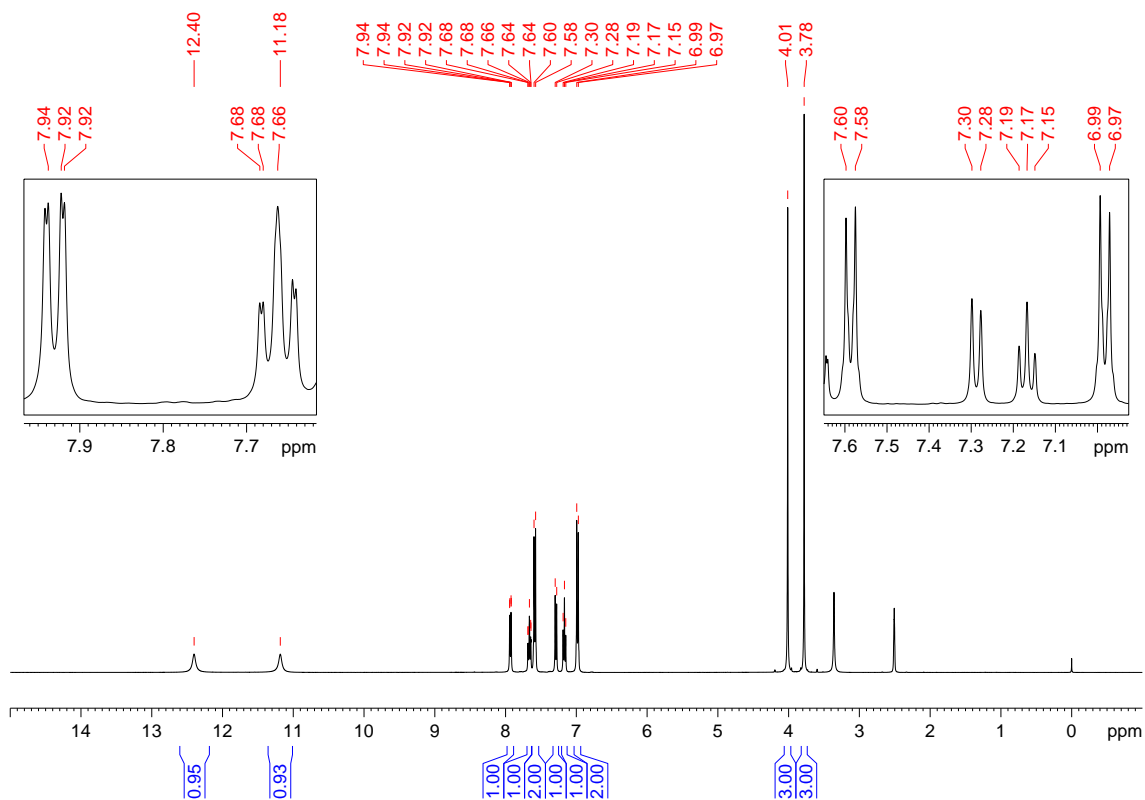


**Figura 231.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **62** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-d}_6$ ).

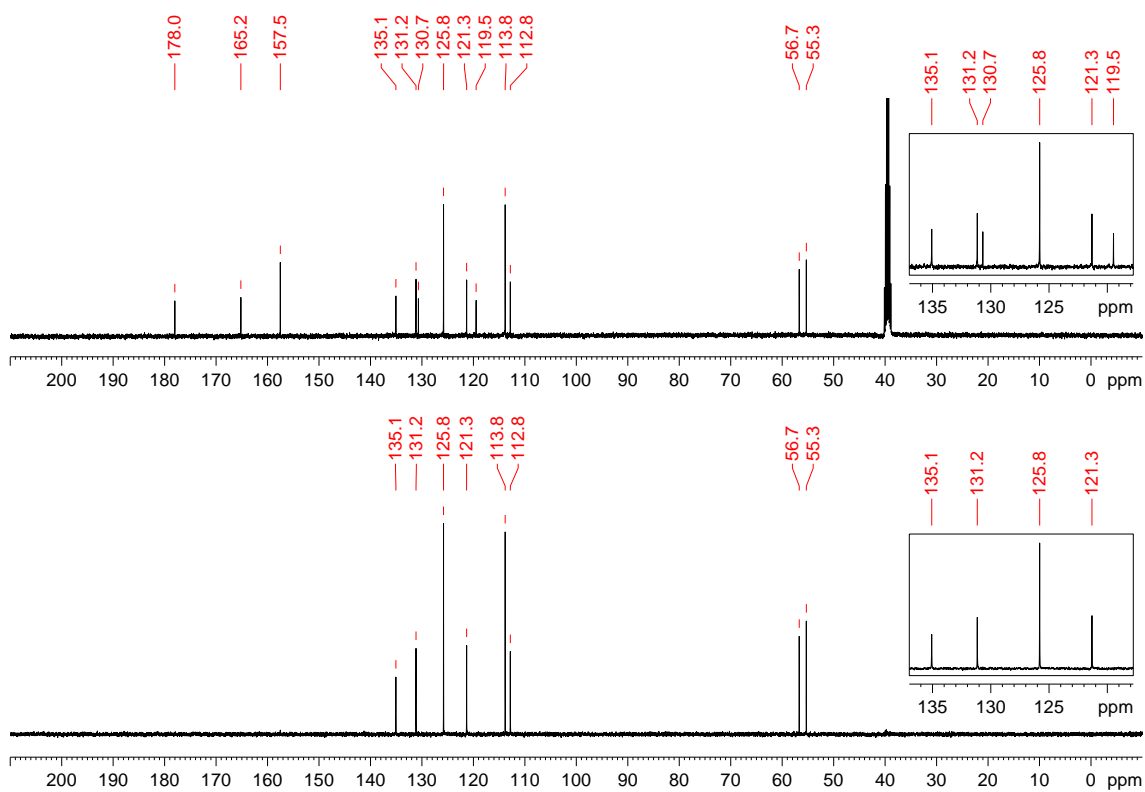
**(63) *N*-(2-metoxibenzoil)-*N'*-(4-metoxifenil)-tioureia:****(63)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 95%. PF: 116 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3312, 3010, 2935, 2834, 1665, 1597, 1565, 1510, 1463, 1364, 1304, 1249, 1180, 1150, 1082, 1032, 832, 755, 726, 689, 636, 533, 431. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 3,78 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 4,01 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 6,98 (2H, d,  $^3J$  9,0 Hz), 7,17 (1H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,29 (1H, d,  $^3J$  8,4 Hz), 7,59 (2H, d,  $^3J$  9,0 Hz), 7,64-7,68 (1H, m), 7,93 (1H, dd,  $^3J$  7,5 Hz,  $^4J$  1,7 Hz), 11,18 (1H, s, CONH), 12,40 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 55,3(+) ( $\text{OCH}_3$ ), 56,7(+) ( $\text{OCH}_3$ ), 112,8(+) (CH), 113,8(+) (CH), 119,5 (C), 121,3(+) (CH), 125,8(+) (CH), 130,7 (C), 131,2(+) (CH), 135,1(+) (CH), 157,5 (C), 165,2 (C=O), 178,0 (C=S).

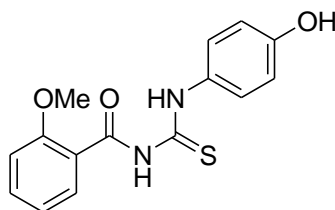
**Figura 232.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **63**.



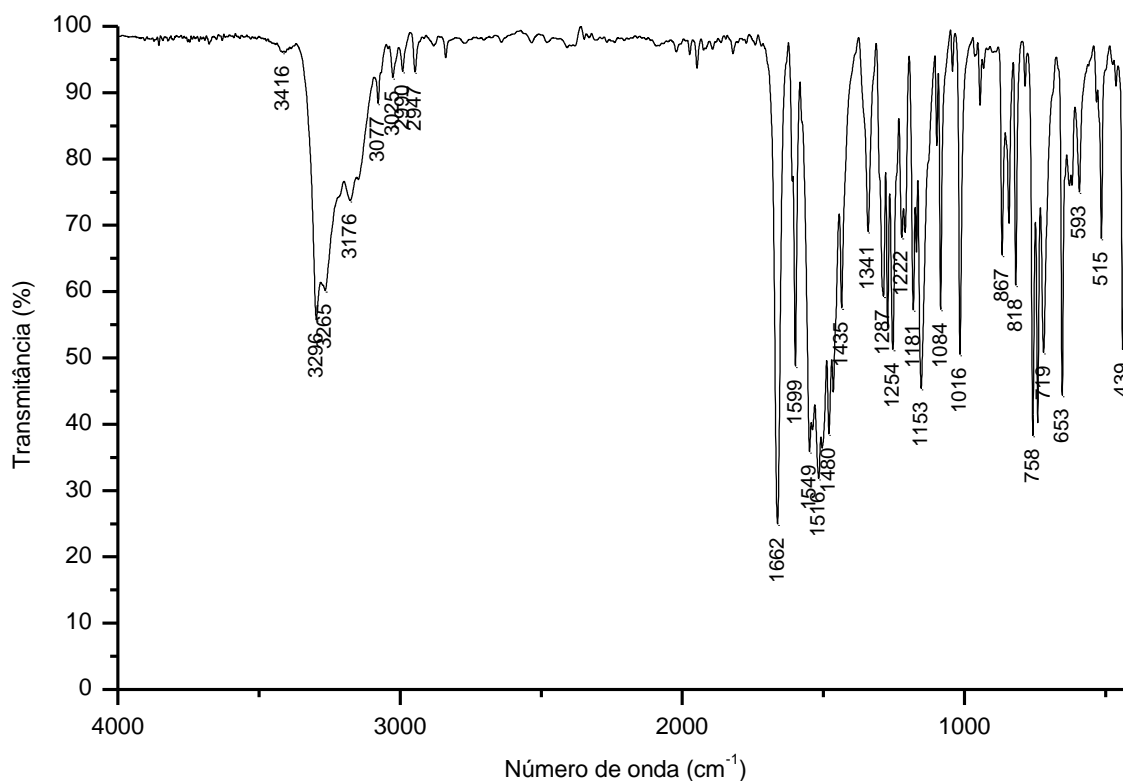
**Figura 233.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **63** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

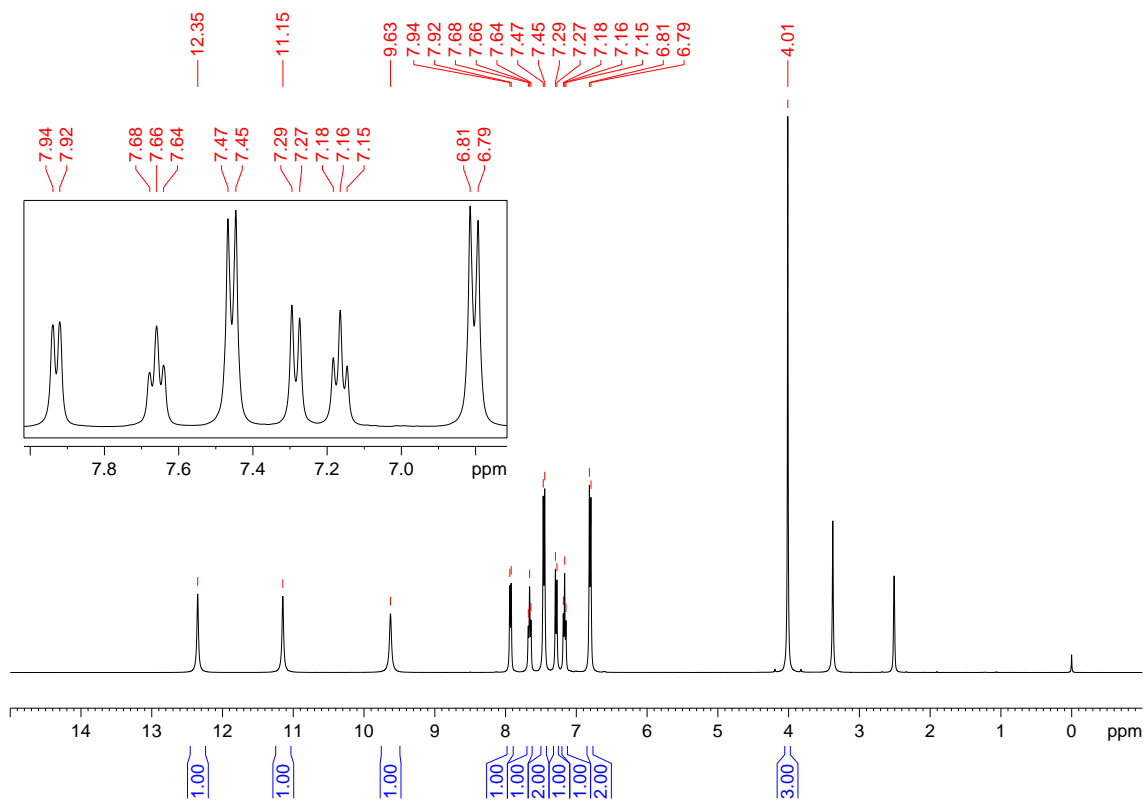


**Figura 234.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **63** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

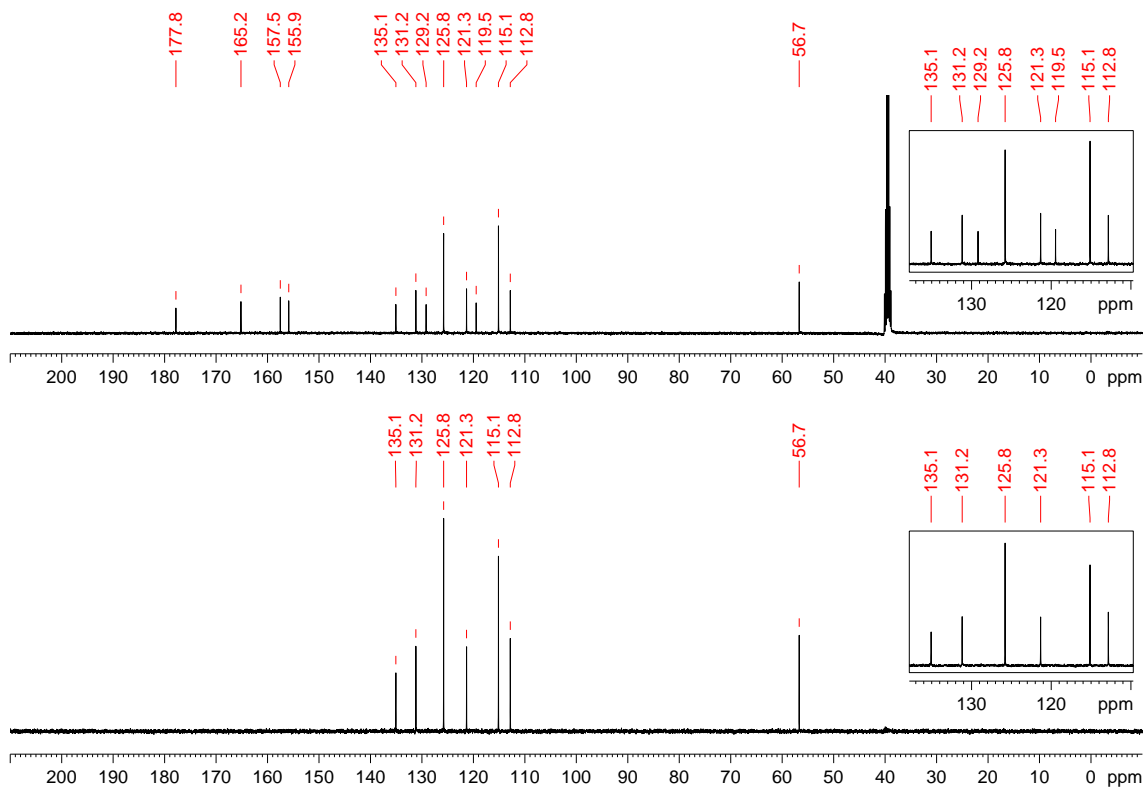
**(64) N-(2-metoxibenzoil)-N'-(4-hidroxifenil)-tioureaia****(64)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 82%. PF: 184 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3296, 3265, 3176, 3077, 3025, 2990, 2947, 1662, 1599, 1549, 1516, 1480, 1435, 1341, 1287, 1254, 1222, 1181, 1153, 1084, 1016, 867, 818, 758, 719, 653, 593, 515, 439. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 4,01 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ); 6,80 (2H, d,  $^3J$  8,5 Hz), 7,16 (1H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,28 (1H, d,  $^3J$  8,5 Hz), 7,46 (2H, d,  $^3J$  8,5 Hz), 7,66 (1H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,93 (2H, d,  $^3J$  7,5 Hz), 9,63 (1H, s, OH); 11,15 (1H, s, CONH), 12,35 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 56,7(+) ( $\text{OCH}_3$ ), 112,8(+) (CH), 115,1(+) (CH), 119,5 (C), 121,3(+) (CH), 125,8(+) (CH), 129,2 (C), 131,2(+) (CH), 135,1(+) (CH), 155,9 (C), 157,5 (C), 165,2 (C=O), 177,8 (C=S).

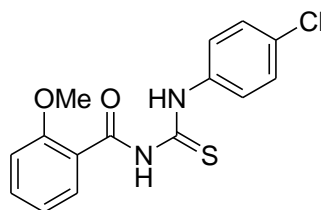
**Figura 235.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **64**.



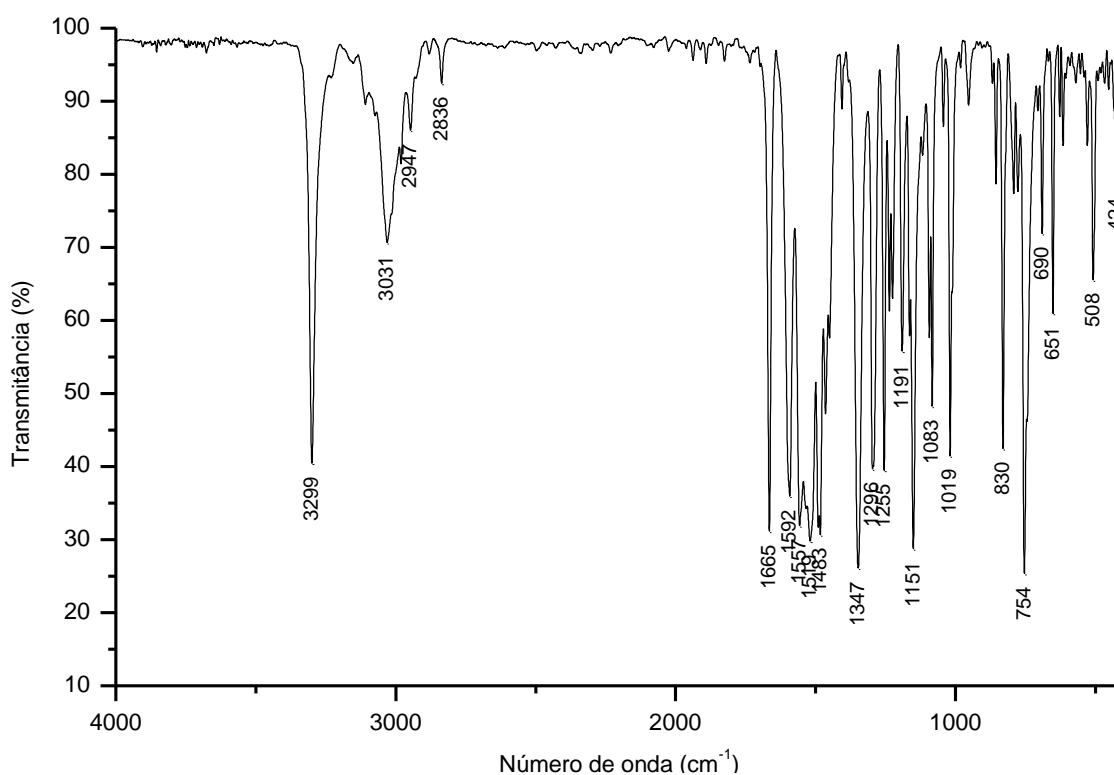
**Figura 236.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **64** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

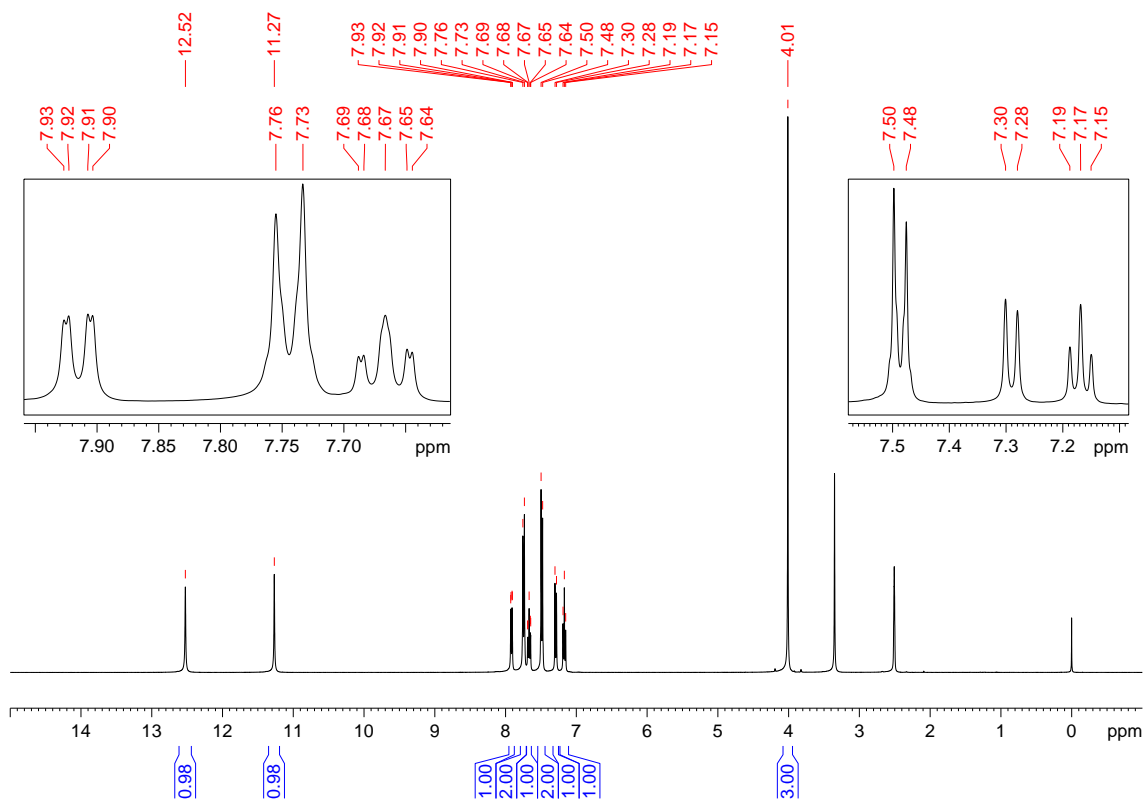


**Figura 237.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **64** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

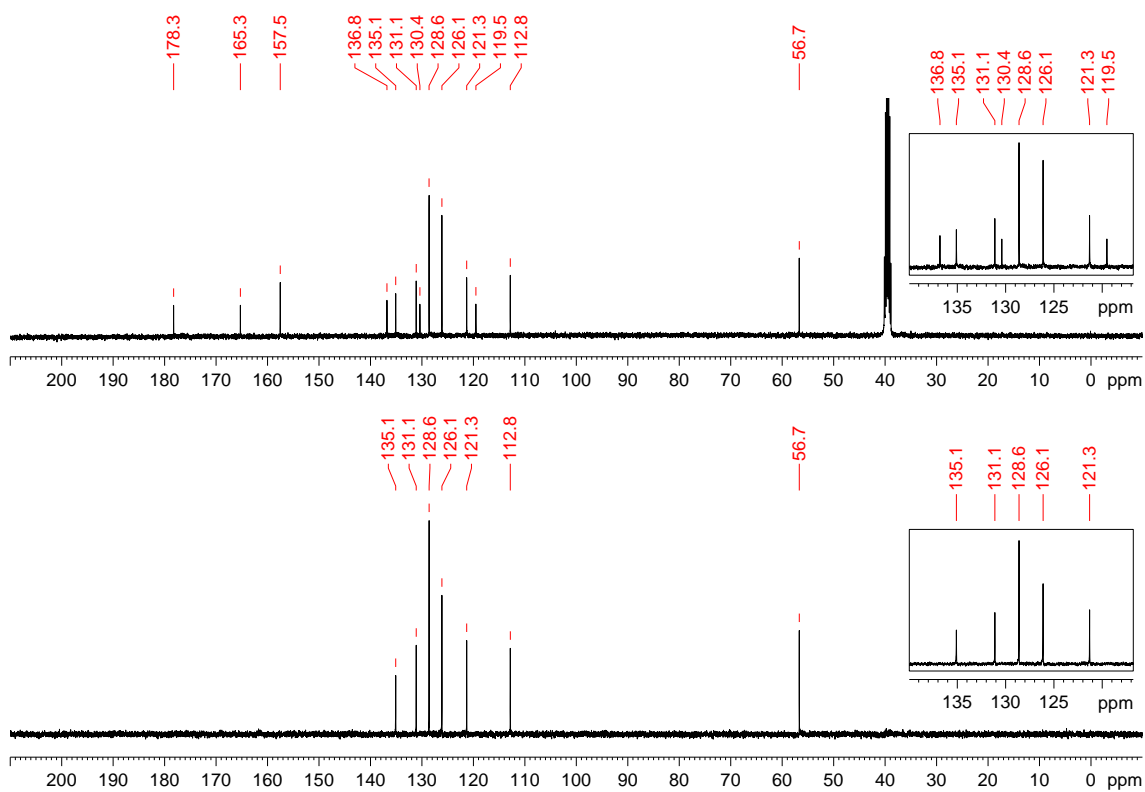
**(65) *N*-(2-metoxibenzoil)-*N'*-(4-clorofenil)-tiourea:****(65)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 76%. PF: 145 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3299, 3031, 2947, 2836, 1665, 1592, 1557, 1519, 1483, 1347, 1296, 1255, 1191, 1151, 1083, 1019, 830, 754, 690, 651, 508, 424. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 4,01 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 7,17 (1H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,29 (1H, d,  $^3J$  8,7 Hz), 7,49 (2H, d,  $^3J$  8,7 Hz), 7,67 (1H, t,  $^3J$  7,8 Hz), 7,74 (2H, d,  $^3J$  8,7 Hz), 7,91 (1H, d,  $^3J$  7,5 Hz), 11,27 (1H, s, CONH), 12,52 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 56,7(+) ( $\text{OCH}_3$ ), 112,8(+) (CH), 119,5 (C), 121,3(+) (CH), 126,1(+) (CH), 128,6(+) (CH), 130,4 (C), 131,1(+) (CH), 135,1(+) (CH), 136,8 (C), 157,5 (C), 165,3 (C=O), 178,3 (C=S).

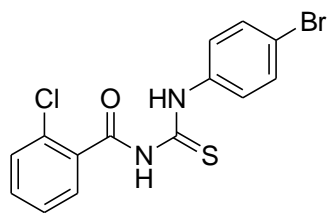
**Figura 238.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **65**.



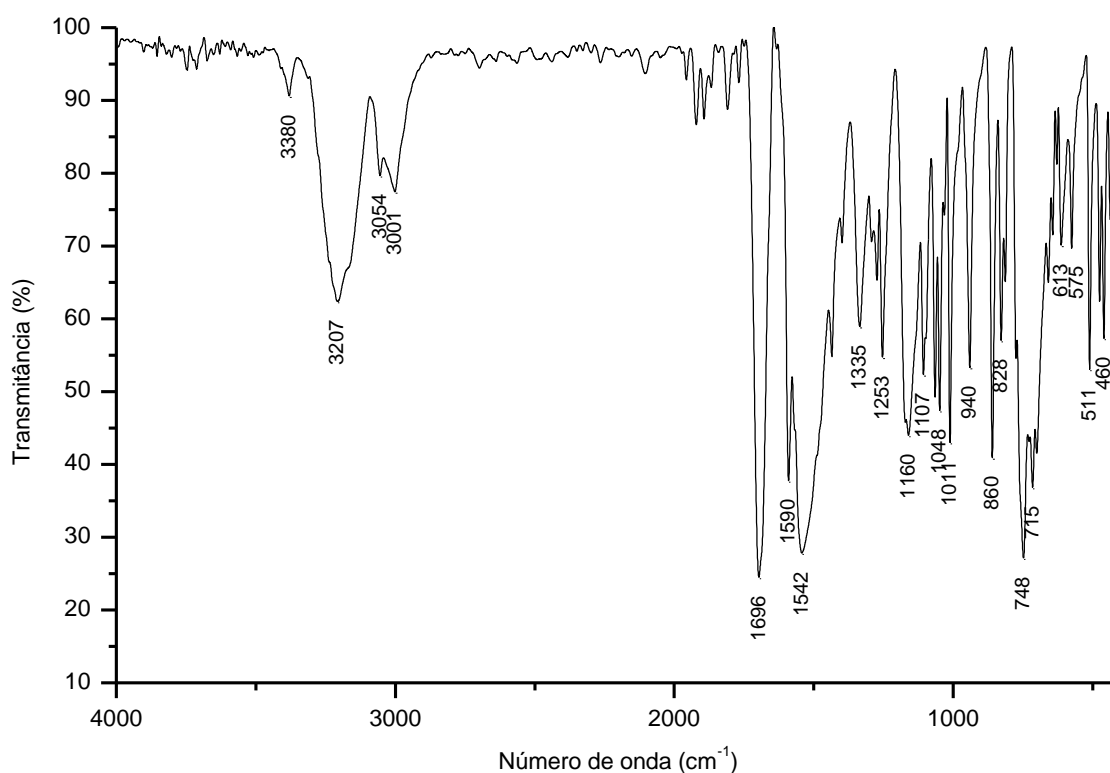
**Figura 239.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **65** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

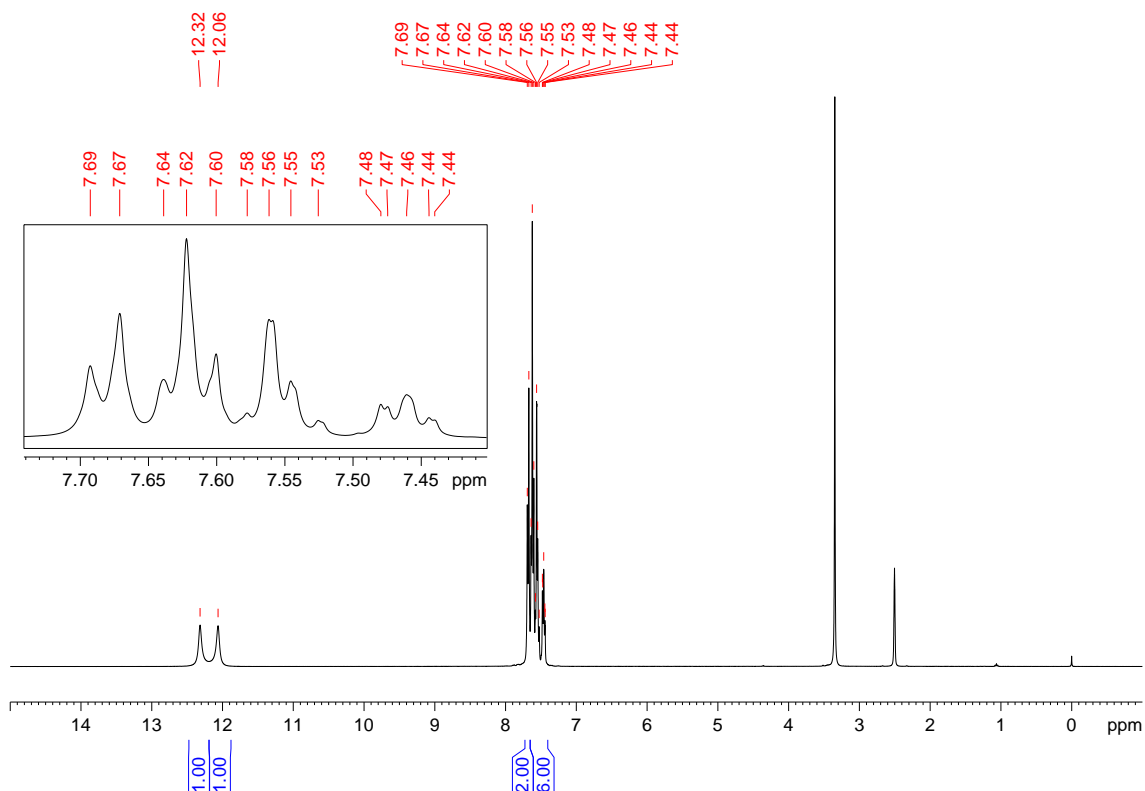


**Figura 240.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **65** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

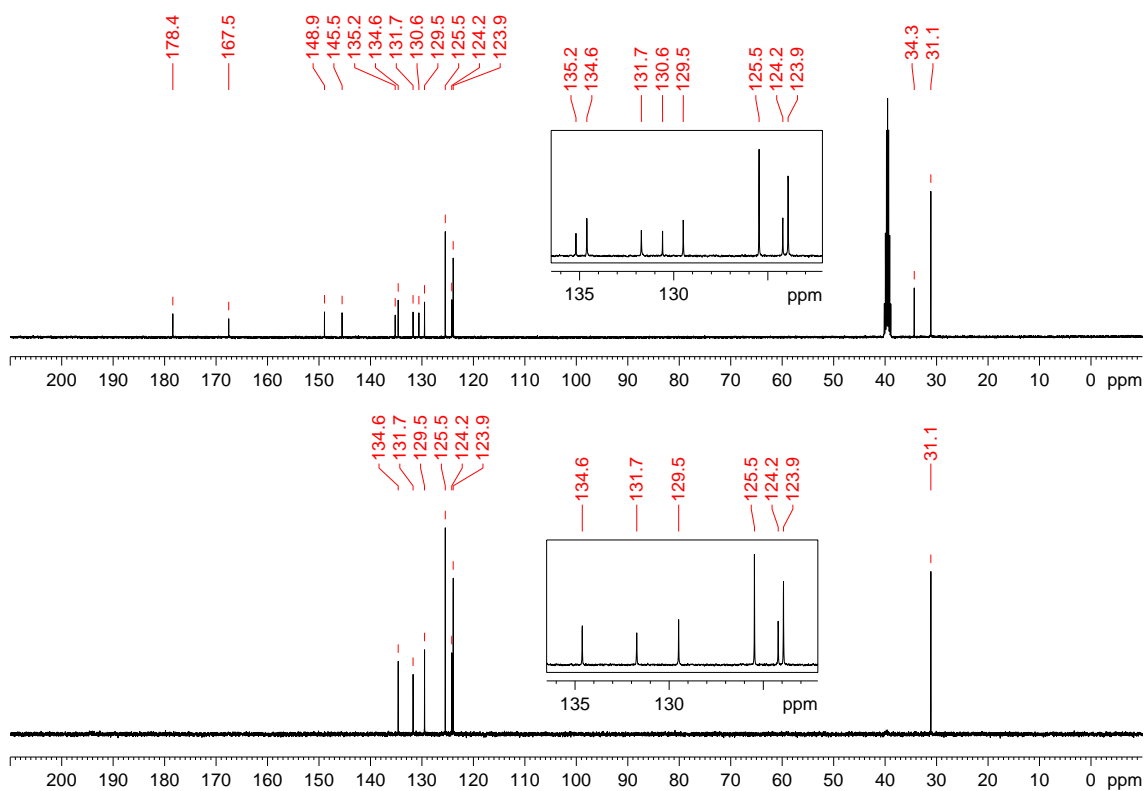
**(66) N-(2-clorobenzoil)-N'-(4-bromofenil)-tiourea:****(66)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 54%. PF: 174-176 °C (decompõe). IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3380, 3207, 3054, 3001, 1696, 1590, 142, 1335, 1253, 1160, 1107, 1048, 1011, 940, 860, 828, 748, 715, 613, 575, 511, 460. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7,44-7,64 (6H, m), 7,68 (2H, d,  $^3J$  8,7 Hz), 12,06 (1H, s, CONH), 12,32 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 31,1(+) ( $3\times\text{CH}_3$ ), 34,3 (C), 123,9(+) (CH), 124,2(+) (CH), 125,5(+) (CH), 129,5(+) (CH), 130,6 (C), 131,7(+) (CH), 134,6(+) (CH), 135,2 (C), 145,5 (C), 148,9 (C), 167,5 (C=O), 178,4 (C=S).

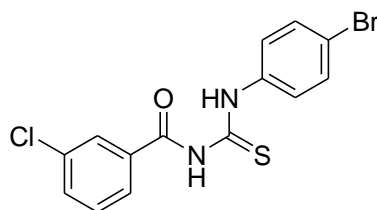
**Figura 241.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **66**.



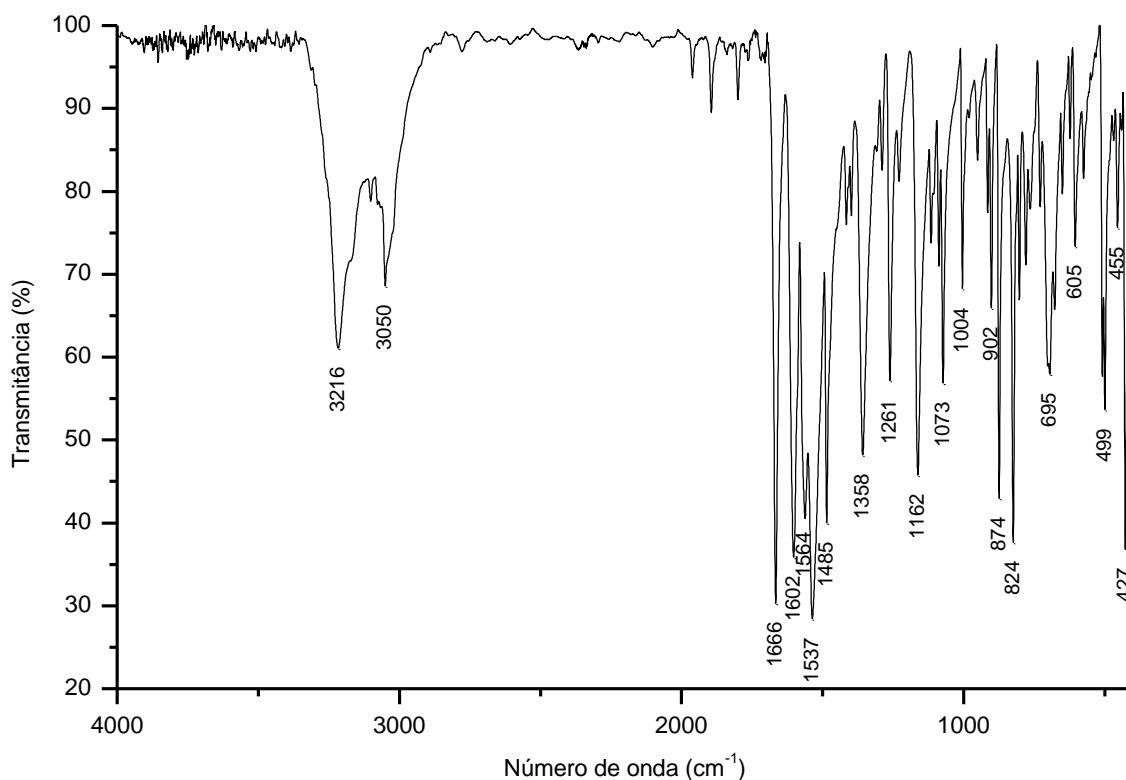
**Figura 242.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **66** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

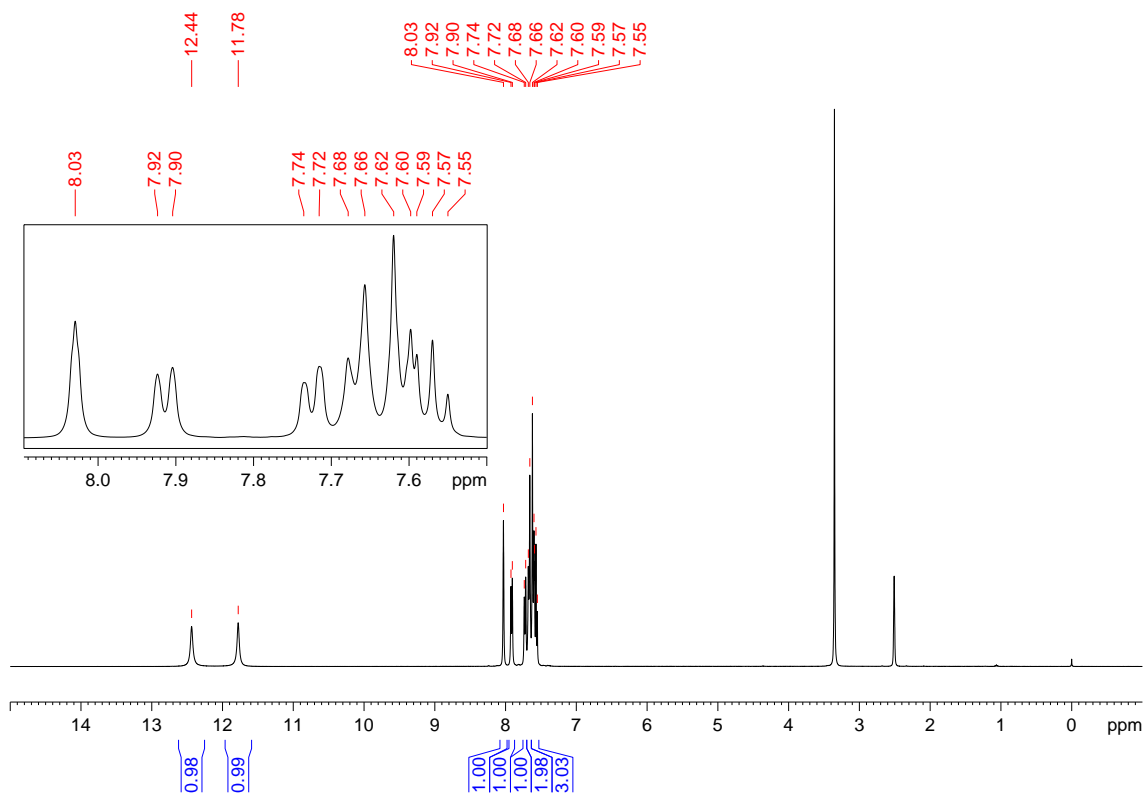


**Figura 243.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **66** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

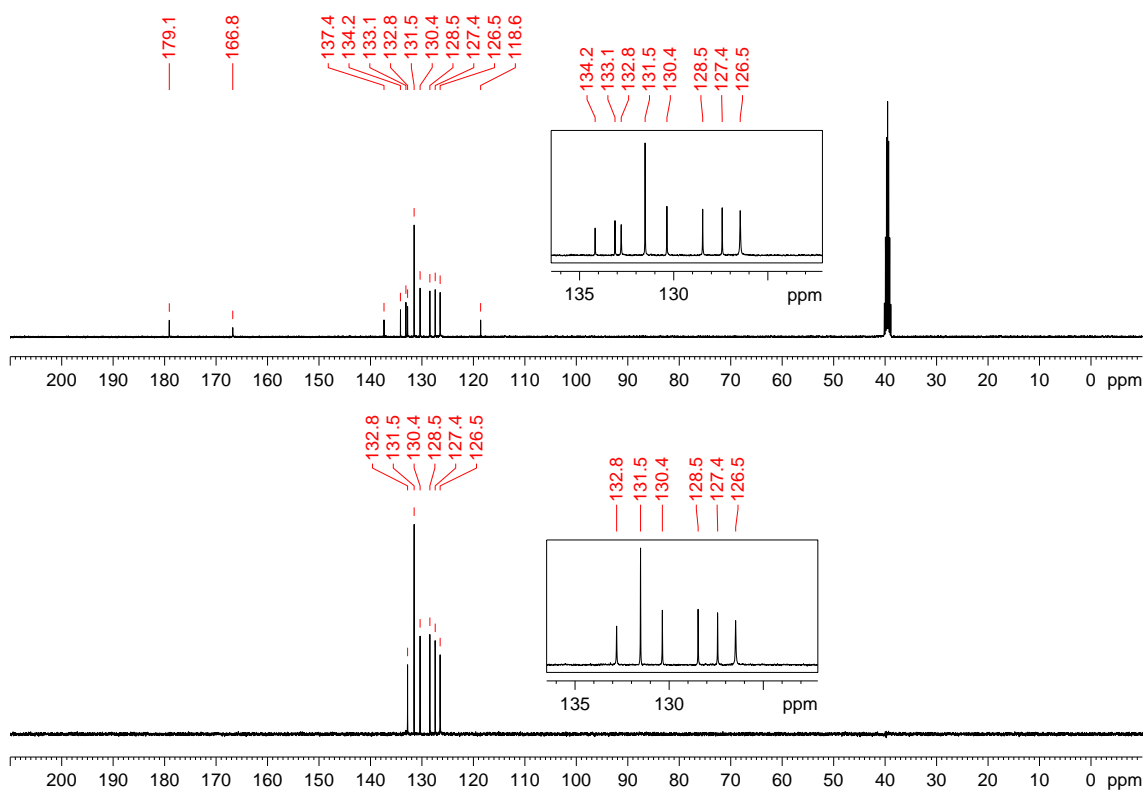
**(67) N-(3-clorobenzoil)-N'-(4-bromofenil)-tiourea:****(67)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 71%. PF: 173-175 °C (decompõe). IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3216, 3050, 1666, 1602, 1564, 1537, 1485, 1358, 1261, 1162, 1073, 1004, 902, 874, 824, 695, 605, 499, 427. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7,55-7,62 (3H, m), 7,67 (2H, d,  $^3J$  8,6 Hz), 7,72 (1H, d,  $^3J$  7,9 Hz), 7,91 (1H, d,  $^3J$  7,9 Hz), 8,03 (1H, s), 11,78 (1H, s, CONH), 12,44 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 118,6 (C), 126,5(+) (CH), 127,4(+) (CH), 128,5(+) (CH), 130,4(+) (CH), 131,5(+) (CH), 132,8(+) (CH), 133,1 (C), 134,2 (C), 137,4 (C), 166,8 (C=O), 179,1 (C=S).

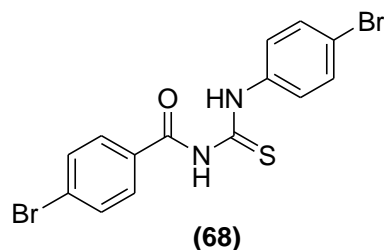
**Figura 244.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **67**.



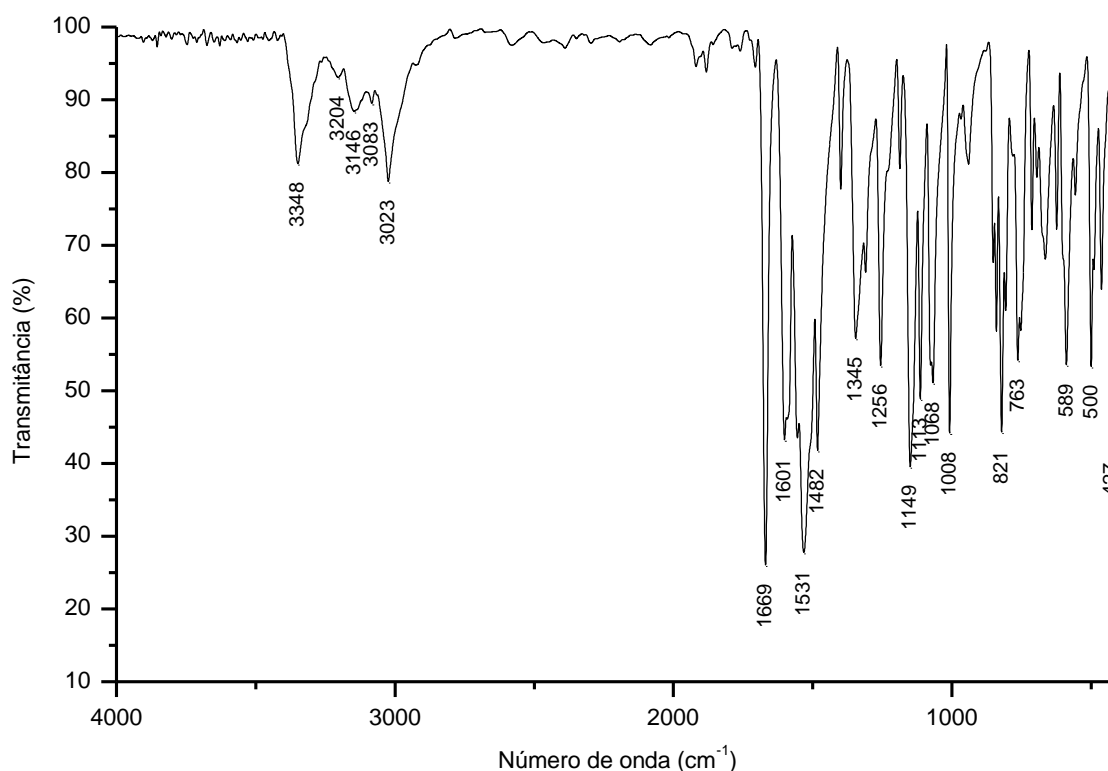
**Figura 245.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **67** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-d}_6$ ).



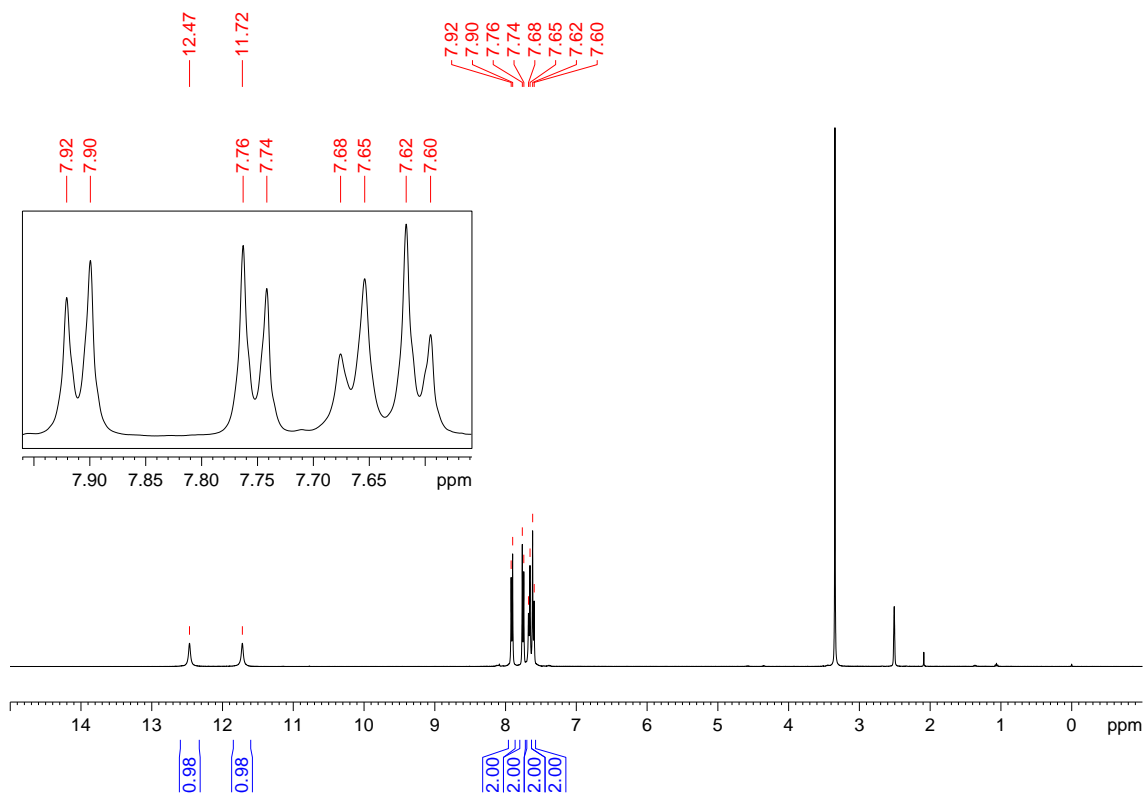
**Figura 246.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **67** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-d}_6$ ).

**(68) N-(4-bromobenzoyl)-N'-(4-bromofenil)-tiourea:**

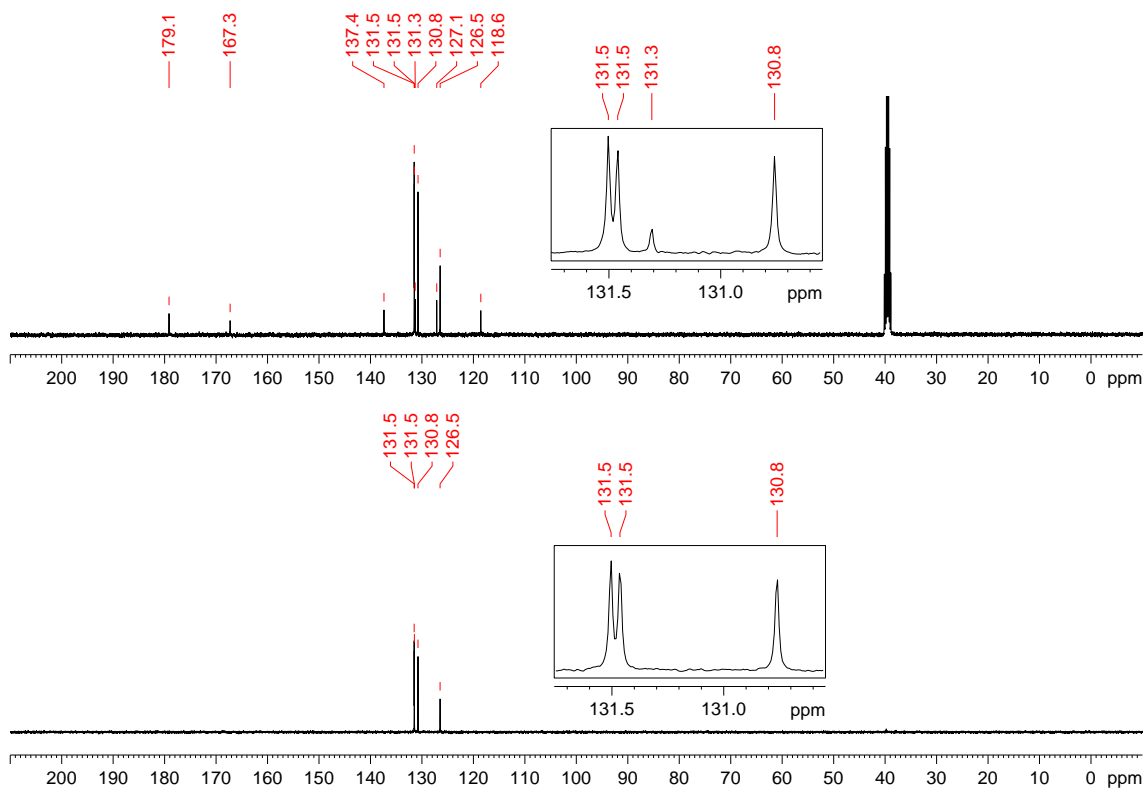
Recristalizado em etanol/acetona com rendimento de 64%. PF: 195-196 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3348, 3146, 3023, 1669, 1601, 1531, 1482, 1345, 1256, 1149, 1113, 1068, 1008, 821, 763, 589, 500, 427. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7,61 (2H, d,  $^3J$  8,5 Hz), 7,67 (2H, d,  $^3J$  8,5 Hz), 7,75 (2H, d,  $^3J$  8,5 Hz), 7,91 (2H, d,  $^3J$  8,5 Hz), 11,72 (1H, s, CONH), 12,47 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 118,6 (C), 126,5(+) (CH), 127,1 (C), 130,8(+) (CH), 131,3 (C), 131,5(+) (CH), 131,5(+) (CH), 137,4 (C), 167,3 (C=O), 179,1 (C=S).



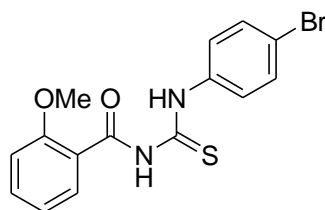
**Figura 247.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **68**.



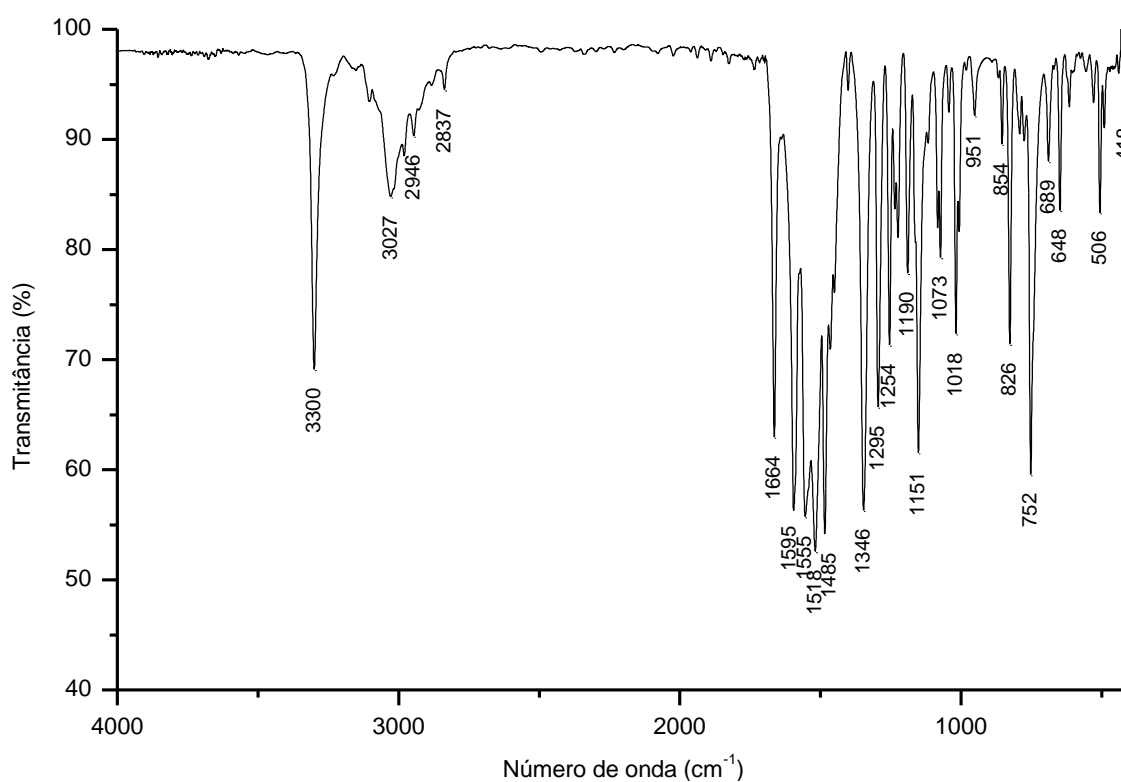
**Figura 248.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **68** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

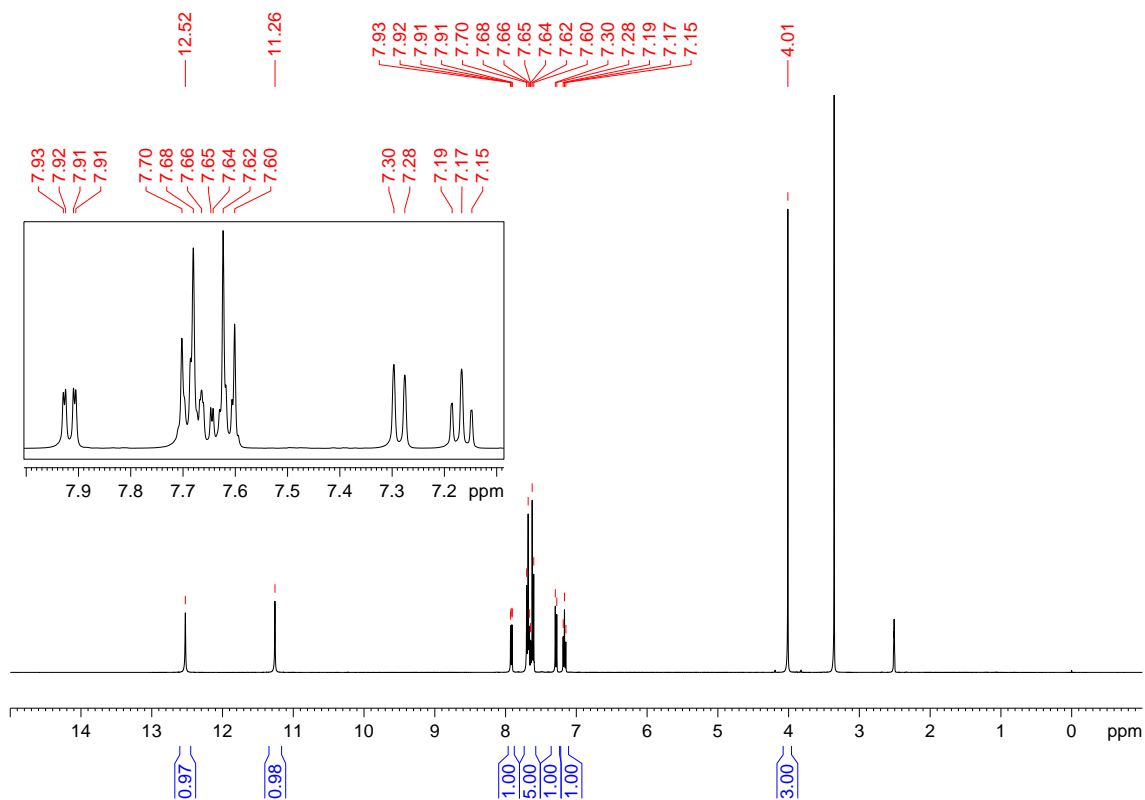


**Figura 249.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **68** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

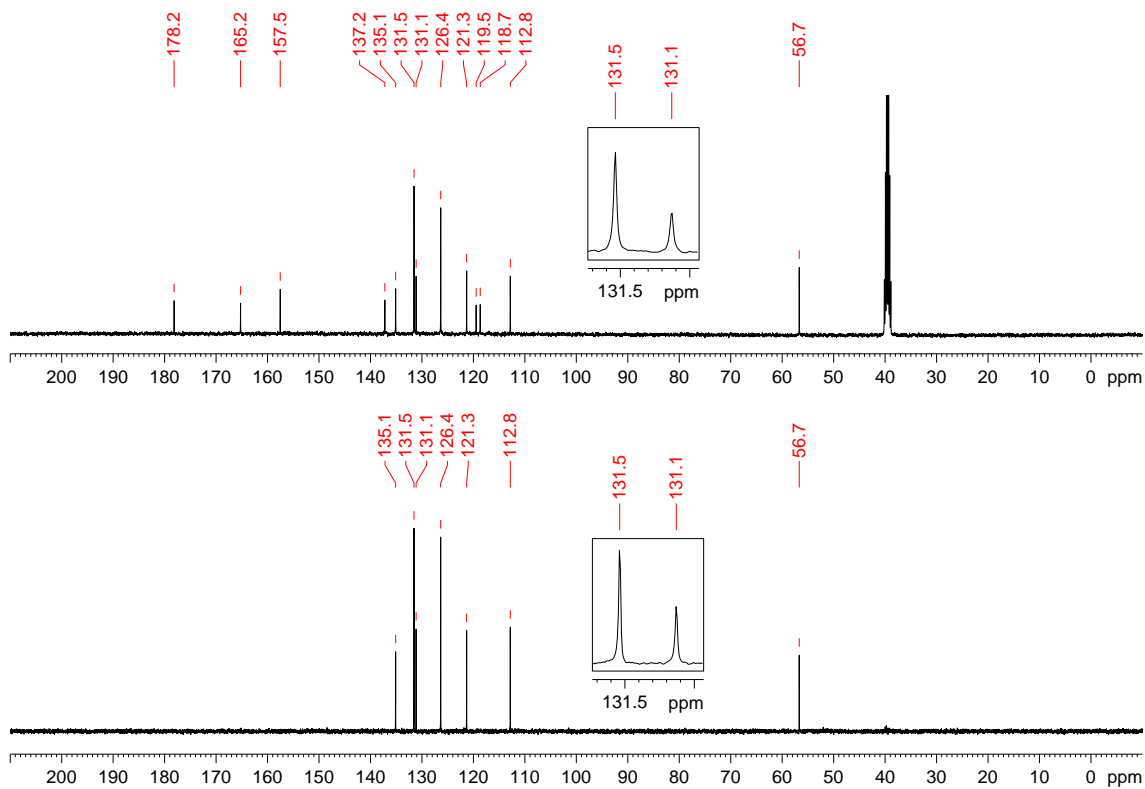
**(69) *N*-(2-metoxibenzoil)-*N'*-(4-bromofenil)-tiourea:****(69)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 52%. PF: 132-133 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3300, 3027, 2946, 2837, 1664, 1595, 1555, 1518, 1485, 1346, 1295, 1254, 1190, 1151, 1073, 1018, 826, 752, 648, 506. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 4,01 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 7,17 (1H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 7,29 (1H, d,  $^3J$  8,4 Hz), 7,60-7,70 (5H, m), 7,91 (1H, d,  $^3J$  7,5 Hz,  $^4J$  1,7 Hz), 11,26 (1H, s,  $\text{CONH}$ ), 12,52 (1H, s,  $\text{CSNH}$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 56,7(+) ( $\text{OCH}_3$ ), 112,8(+) (CH), 118,7 (C), 119,5 (C), 121,3(+) (CH), 126,4(+) (CH), 131,1(+) (CH), 131,5(+) (CH), 135,1(+) (CH), 137,2 (C), 157,5 (C), 165,2 ( $\text{C=O}$ ), 178,2 ( $\text{C=S}$ ).

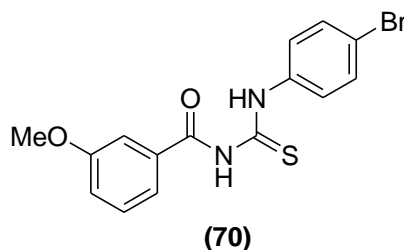
**Figura 250.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **69**.



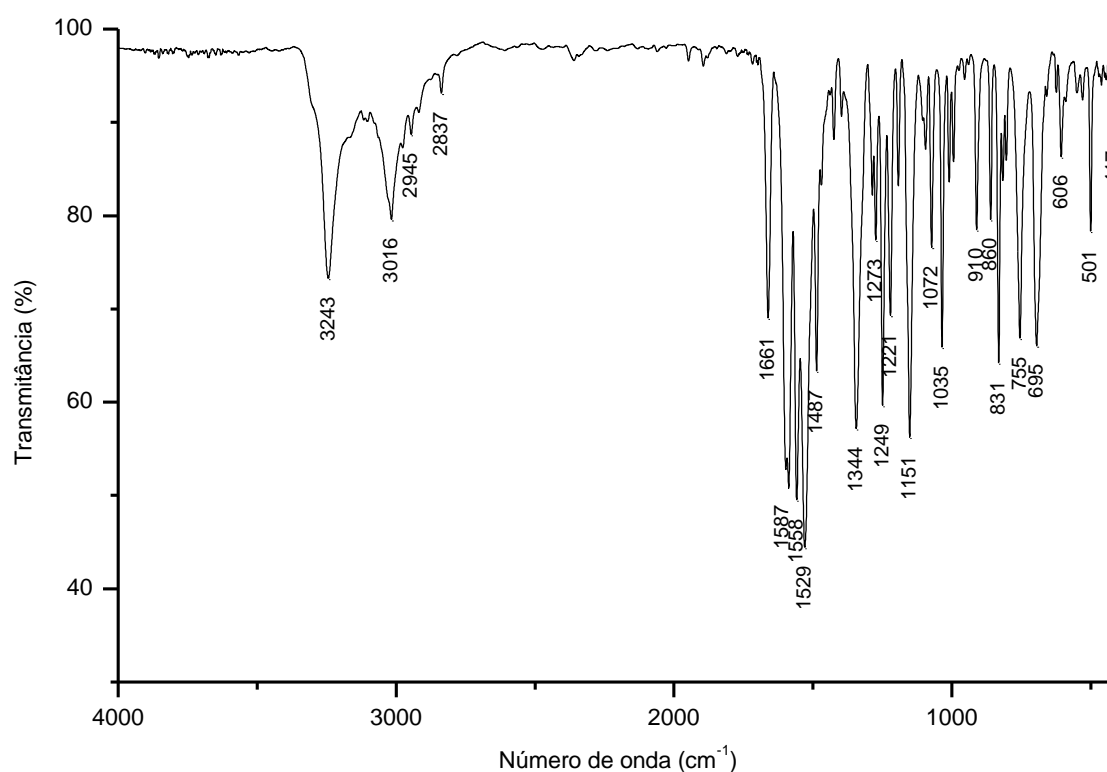
**Figura 251.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **69** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO}-d_6$ ).



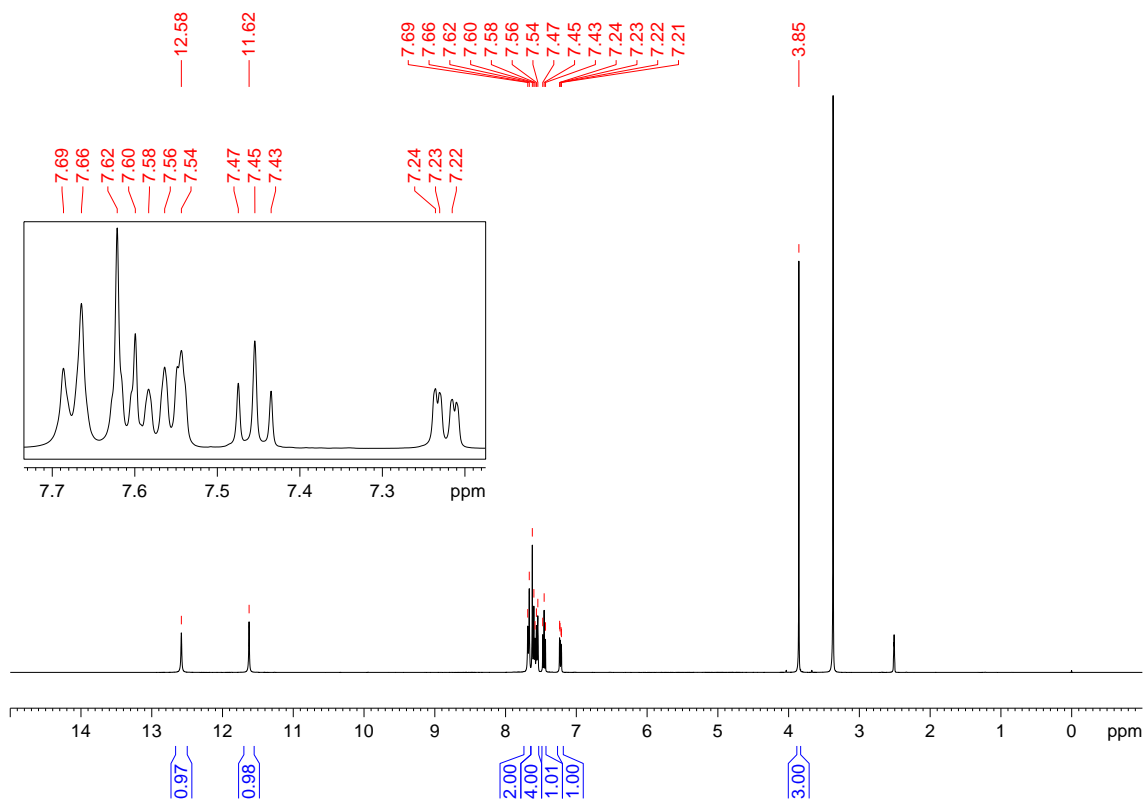
**Figura 252.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **69** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO}-d_6$ ).

**(70) *N*-(3-metoxibenzoil)-*N'*-(4-bromofenil)-tiourea:**

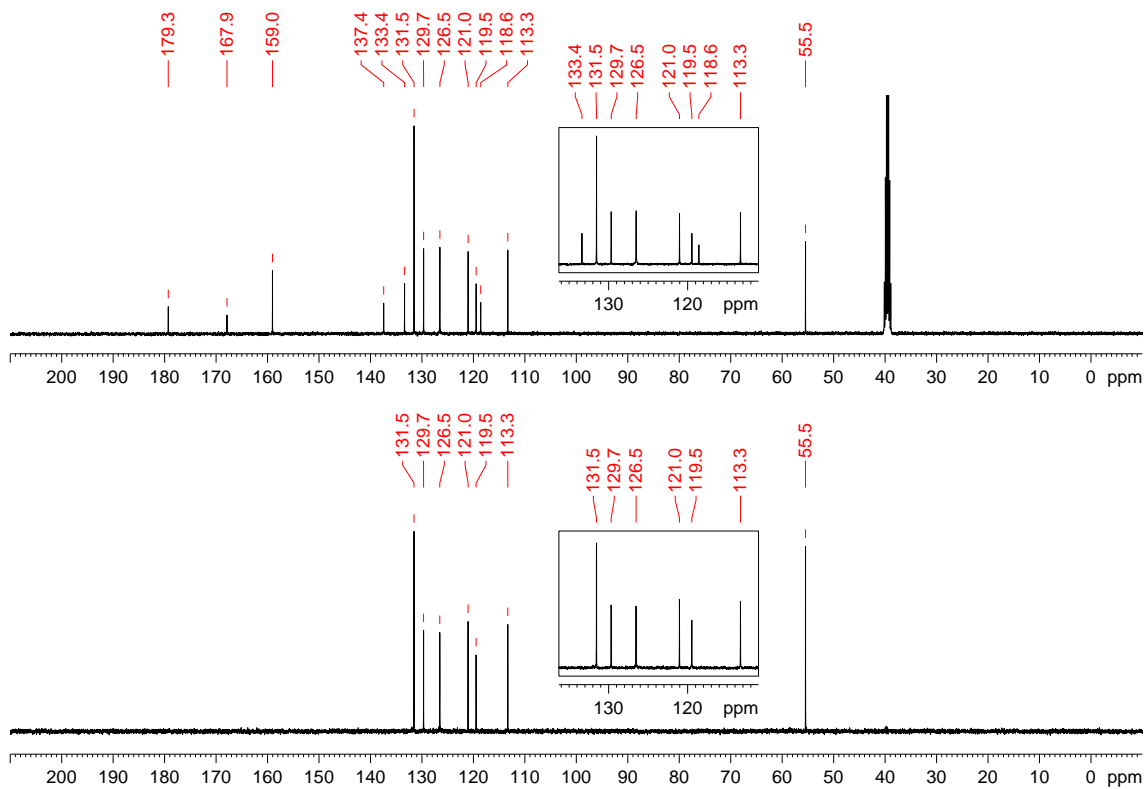
Recristalizado em etanol com rendimento de 60%. PF: 144-146 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3243, 3016, 2945, 2837, 1661, 1587, 1558, 1529, 1487, 1344, 1273, 1249, 1221, 1151, 1072, 1035, 910, 860, 831, 755, 695, 606, 501, 417. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 3,85 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 7,22 (1H, dd,  $^3J$  8,3 Hz,  $^4J$  2,1 Hz), 7,45 (1H, t,  $^3J$  8,2 Hz), 7,54-7,62 (4H, m), 7,67 (2H, d,  $^3J$  8,3 Hz), 11,62 (1H, s,  $\text{CONH}$ ), 12,58 (1H, s,  $\text{CSNH}$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 55,5(+) ( $\text{OCH}_3$ ), 113,3(+) (CH), 118,6 (C), 119,5(+) (CH), 121,0(+) (CH), 126,5(+) (CH), 129,7(+) (CH), 131,5(+) (CH), 133,4 (C), 137,4(C), 159,0(C), 167,9 (C=O), 179,3 (C=S).



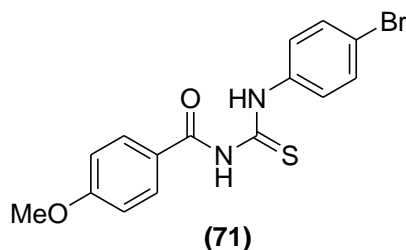
**Figura 253.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **70**.



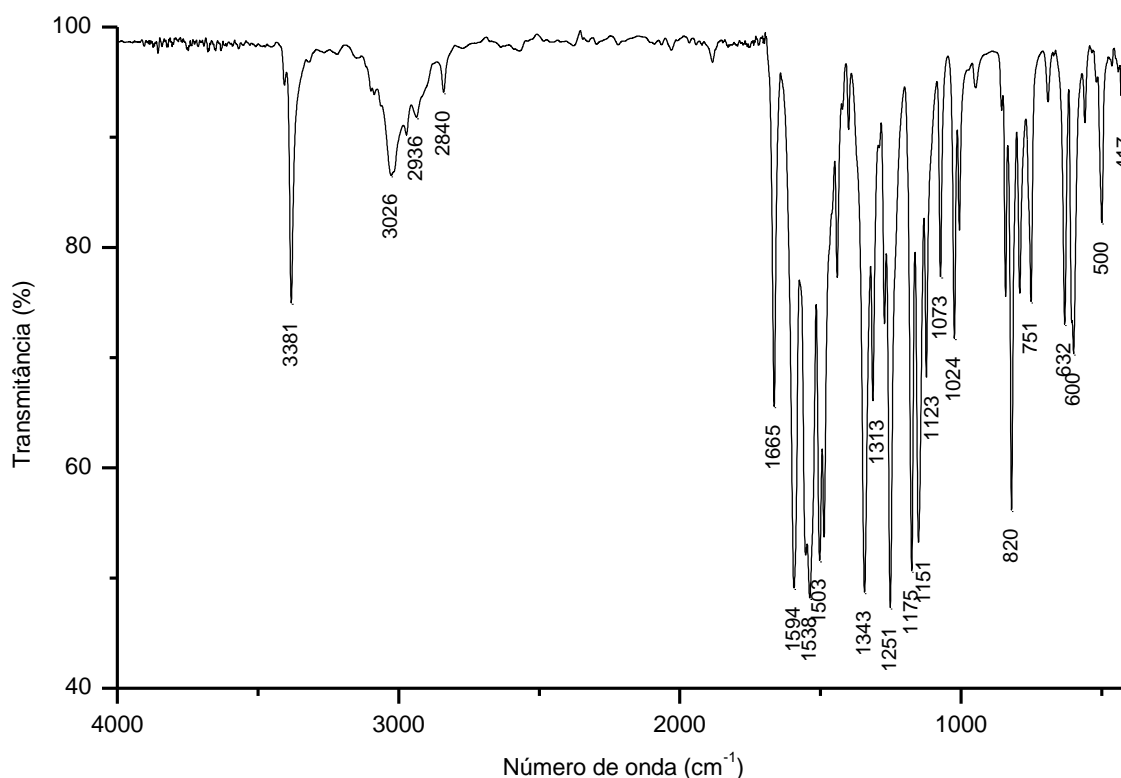
**Figura 254.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **70** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



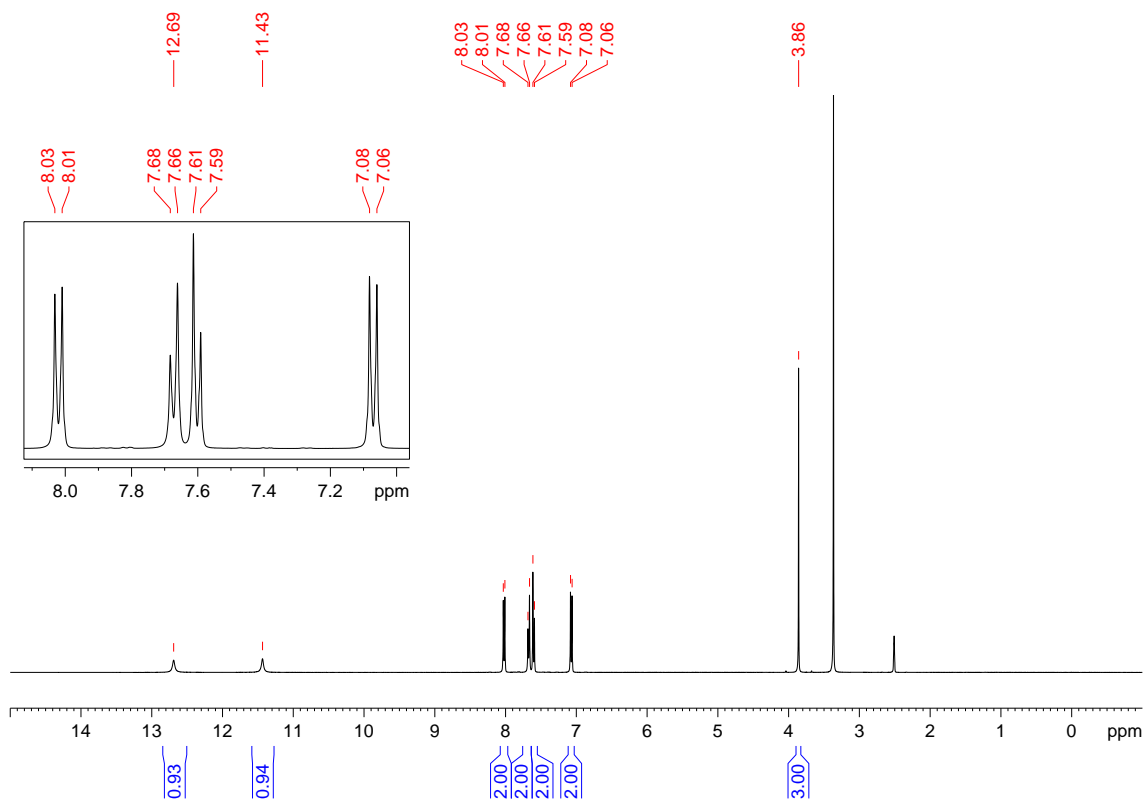
**Figura 255.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **70** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

**(71) *N*-(4-metoxibenzoil)-*N'*-(4-bromofenil)-tiourea:**

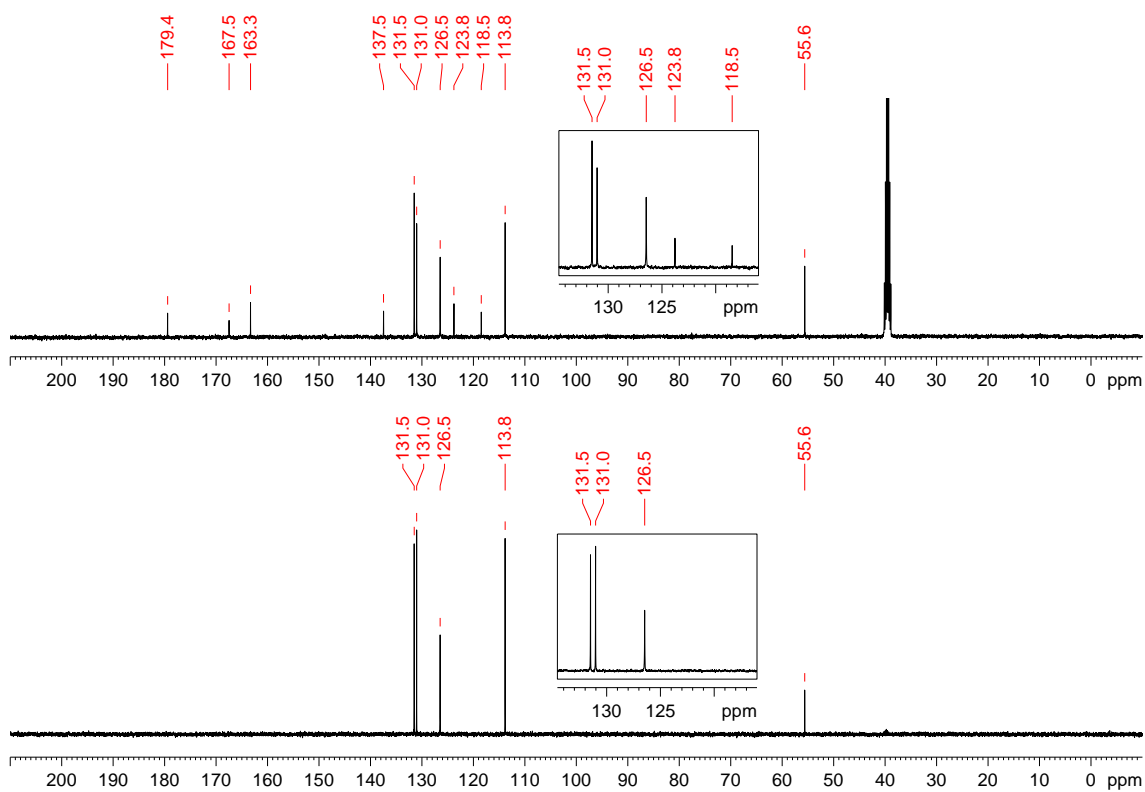
Recristalizado em etanol/acetona com rendimento de 73%. PF: 192 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3381, 3026, 2936, 2840, 1665, 1594, 1538, 1503, 1343, 1313, 1251, 1175, 1151, 1123, 1073, 1024, 820, 751, 632, 600, 500, 417. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 3,86 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 7,07 (2H, d,  $^3J$  8,9 Hz), 7,60 (2H, d,  $^3J$  8,7 Hz), 7,67 (2H, d,  $^3J$  8,7 Hz), 8,02 (2H, d,  $^3J$  8,9 Hz), 11,43 (1H, s,  $\text{CONH}$ ), 12,69 (1H, s,  $\text{CSNH}$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 55,6(+) ( $\text{OCH}_3$ ), 113,8(+) (CH), 118,5 (C), 123,8 (C), 126,5(+) (CH), 131,0(+) (CH), 131,5(+) (CH), 137,5 (C), 163,3 (C), 167,5 (C=O), 179,4 (C=S).



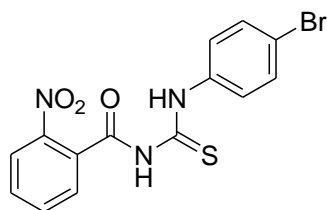
**Figura 256.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **71**.



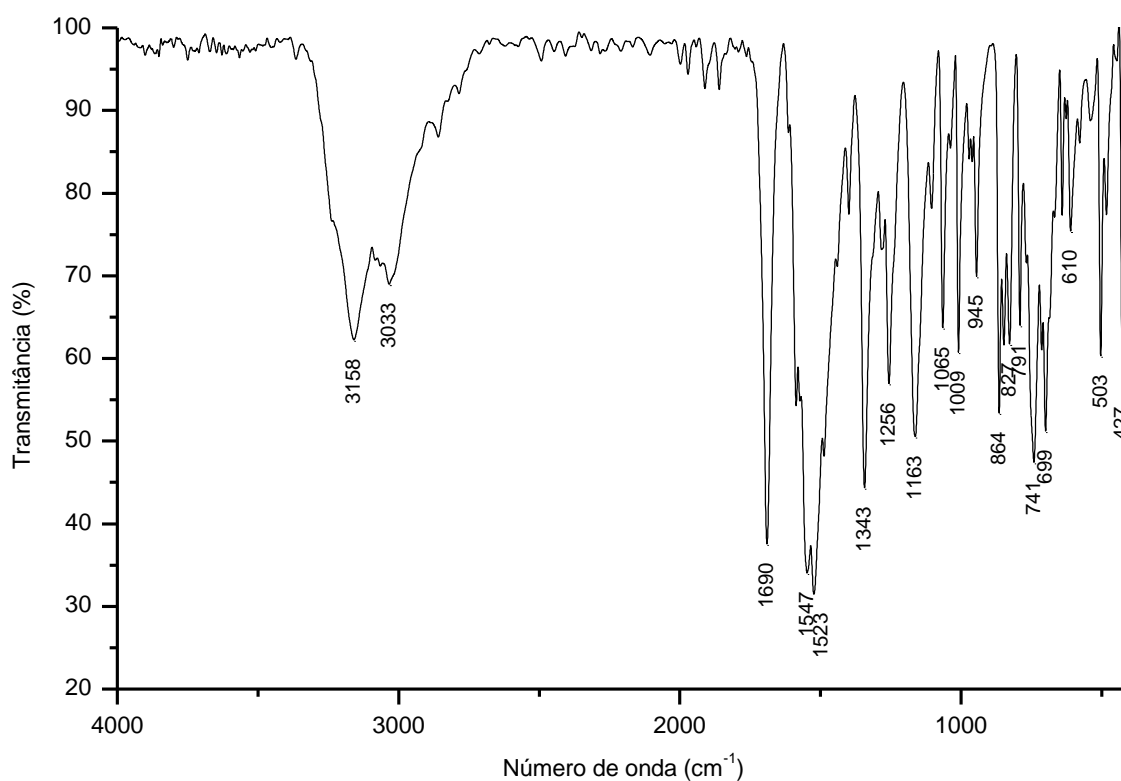
**Figura 257.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **71** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente DMSO- $d_6$ ).

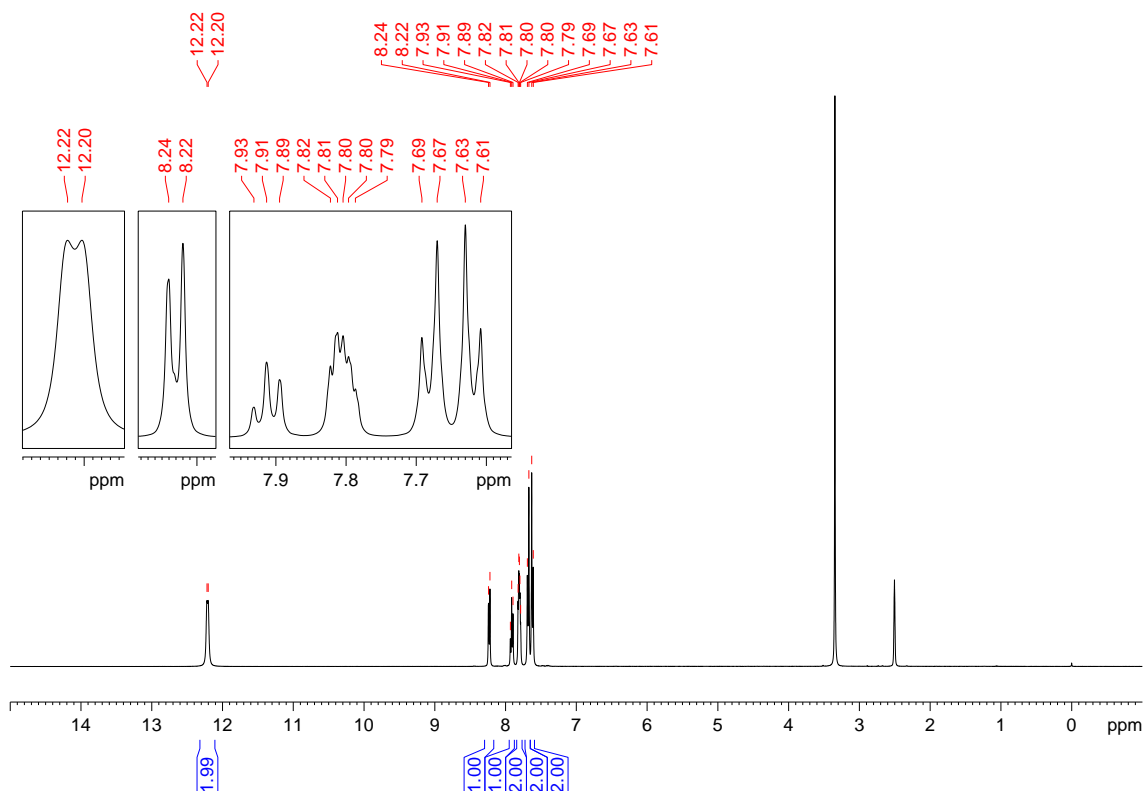


**Figura 258.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **71** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente DMSO- $d_6$ ).

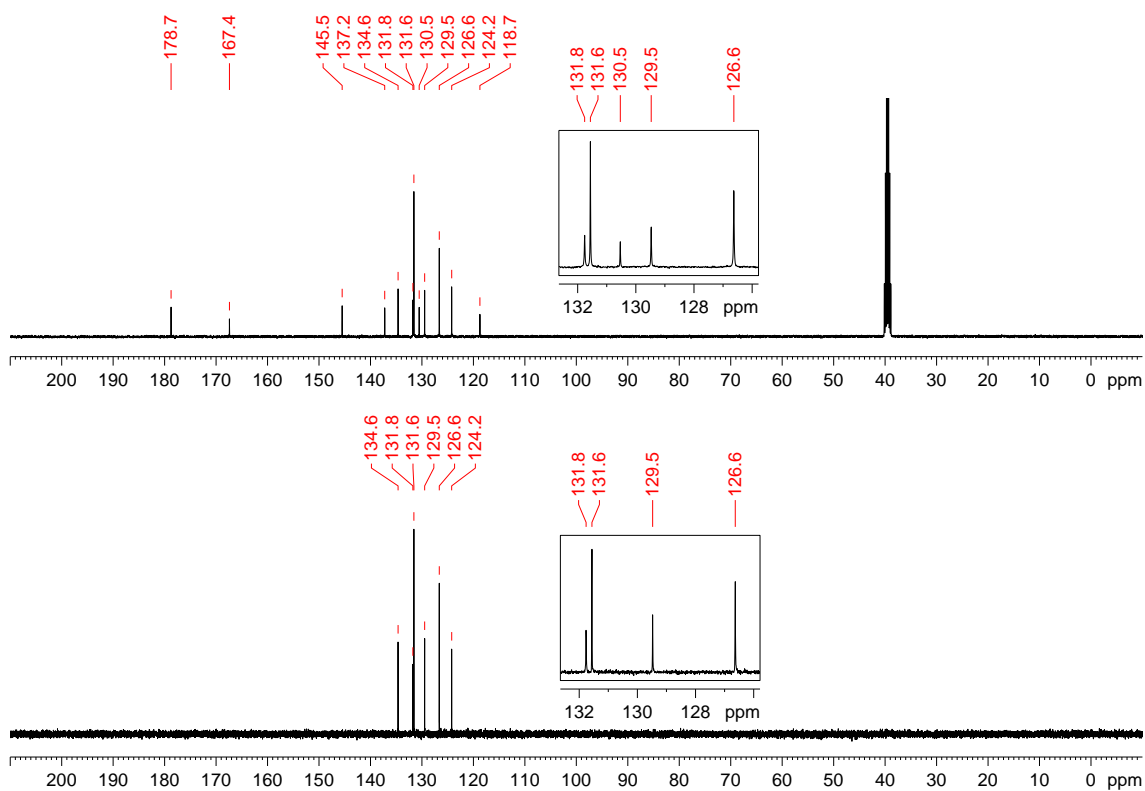
**(72) *N*-(2-nitrobenzoyl)-*N'*-(4-bromofenil)-tiourea:****(72)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 50%. PF: 213-215 °C (decompõe). IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3158, 3033, 1690, 1547, 1523, 1343, 1256, 1163, 1065, 1009, 945, 864, 827, 791, 741, 699, 610, 503, 427. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7,62 (2H, d,  $^3J$  8,8 Hz), 7,68 (2H, d,  $^3J$  8,8 Hz), 7,79-7,82 (2H, m), 7,91 (1H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 8,23 (1H, d,  $^3J$  8,1 Hz) 12,20 (1H, s, CONH), 12,22 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 118,7 (C), 124,2(+) (CH), 126,6(+) (CH), 129,5(+) (CH), 130,5 (C), 131,6(+) (CH), 131,8(+) (CH), 134,6(+) (CH), 137,2 (C), 145,5 (C), 167,4 (C=O), 178,7 (C=S).

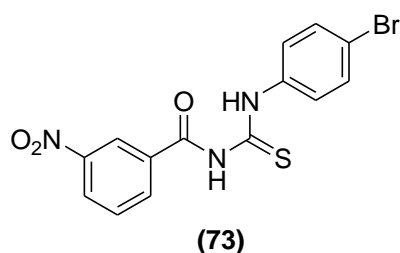
**Figura 259.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **72**.



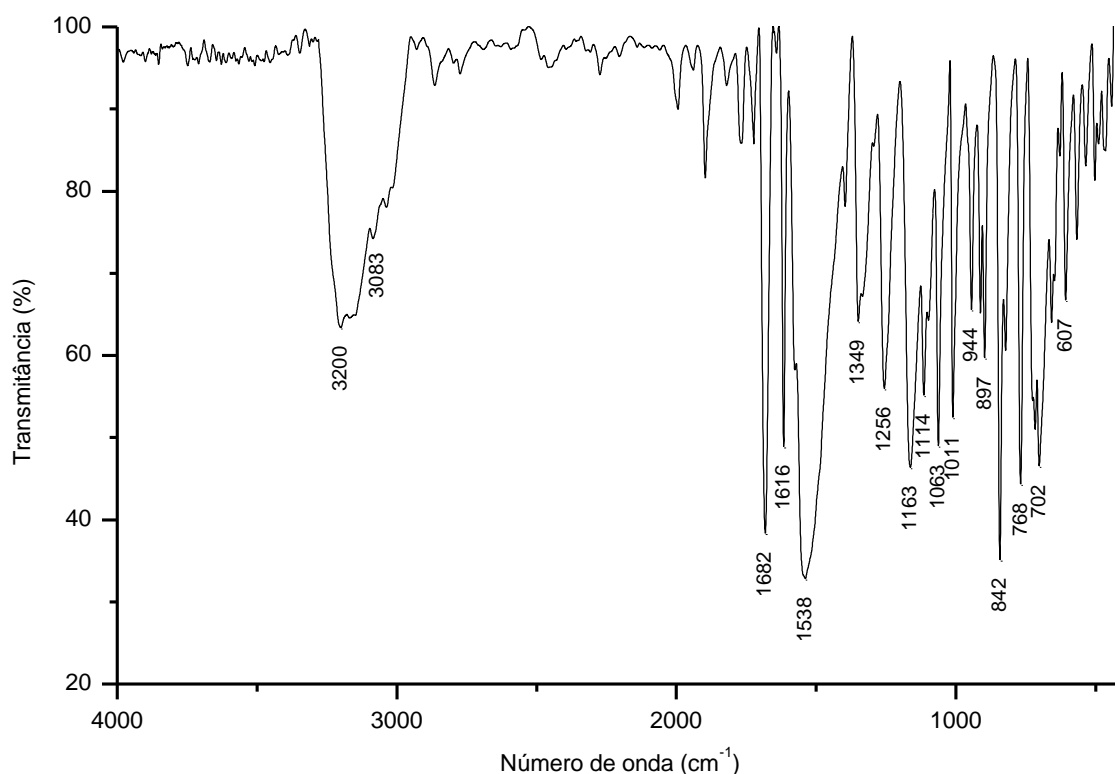
**Figura 260.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **72** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



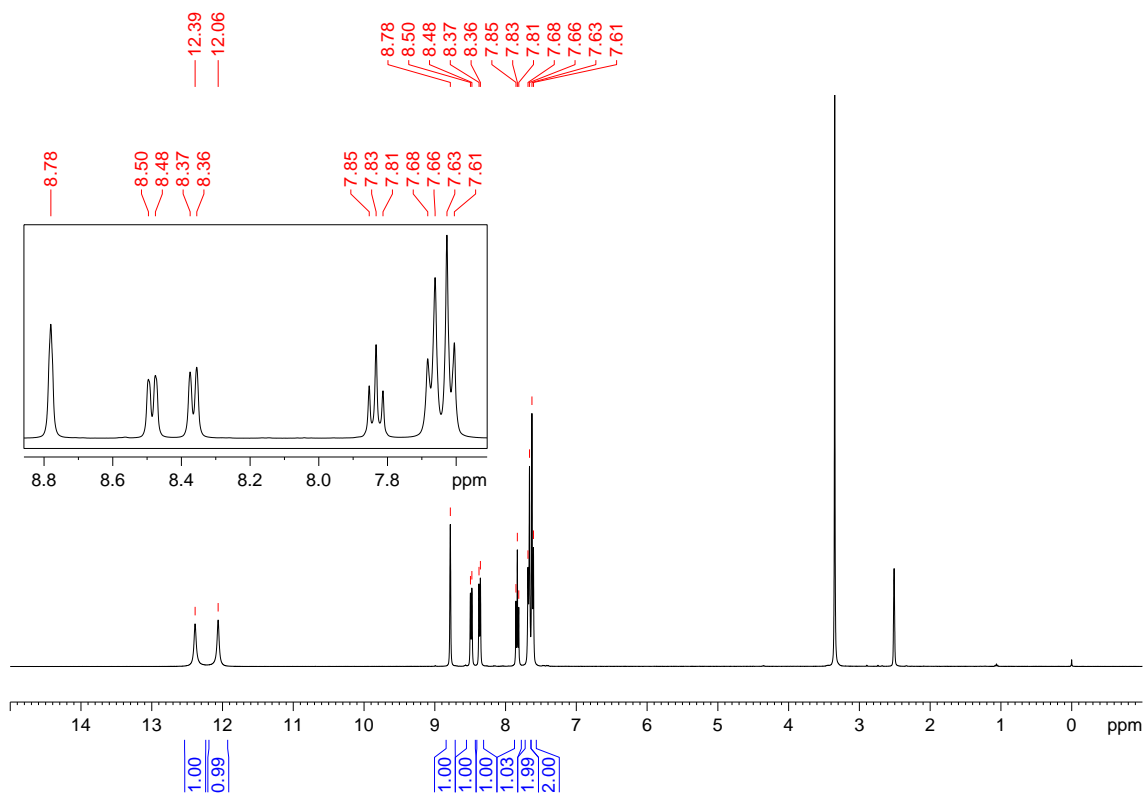
**Figura 261.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **72** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

**(73) *N*-(3-nitrobenzoi)-*N'*-(4-bromofenil)-tiourea:**

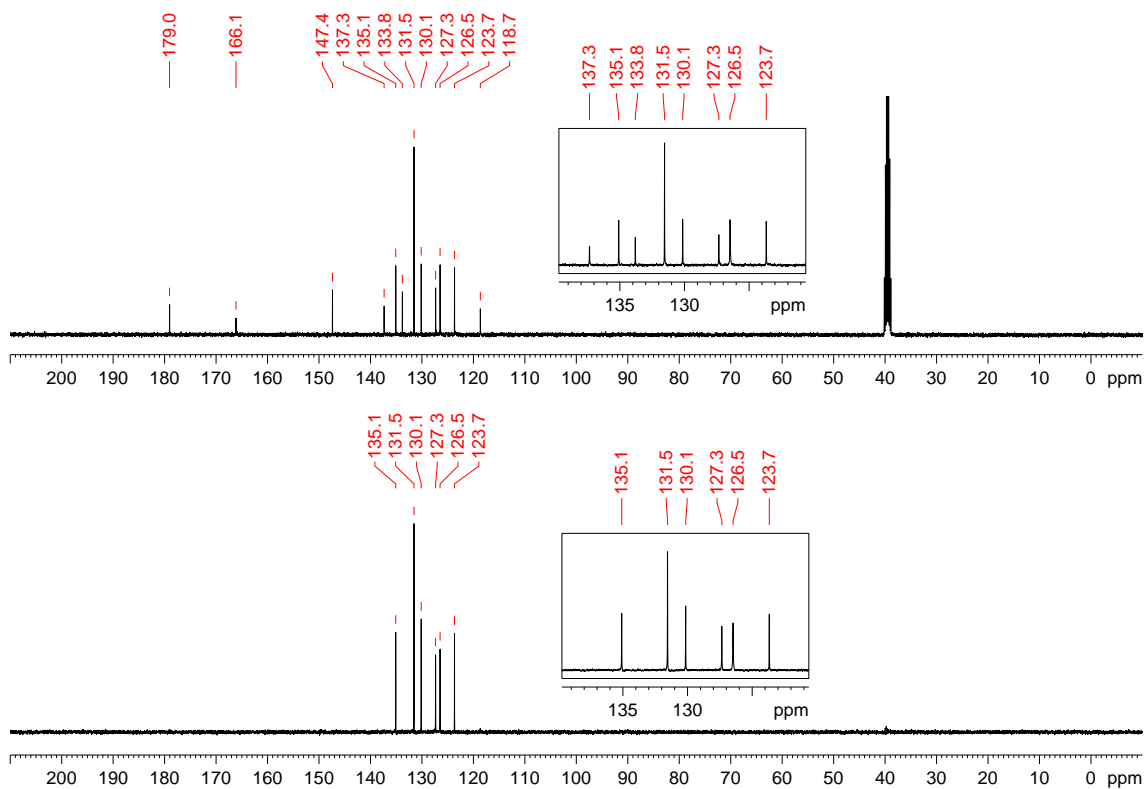
Recristalizado em etanol/acetona com rendimento de 53%. PF: 173-175 °C (decompõe). IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3200, 3083, 1682, 1616, 1538, 1149, 1256, 1163, 1114, 1063, 1011, 944, 897, 842, 768, 702, 607. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7,62 (2H, d,  $^3J$  8,6 Hz), 7,67 (2H, d,  $^3J$  8,6 Hz), 7,83 (1H, t,  $^3J$  8,0 Hz), 8,36 (1H, d,  $^3J$  7,7 Hz), 8,49 (1H, d,  $^3J$  8,1 Hz), 8,78 (1H, s), 12,06 (1H, s, CONH), 12,39 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 118,7 (C), 123,7(+) (CH), 126,5(+) (CH), 127,3(+) (CH), 130,1(+) (CH), 131,5(+) (CH), 133,8 (C), 135,1(+) (CH), 137,3 (C), 147,4 (C), 166,1 (C=O), 179,0 (C=S).



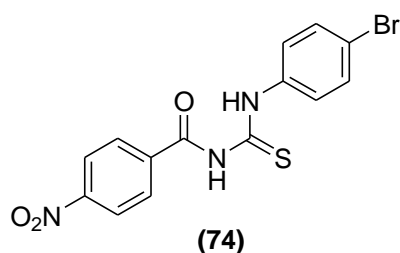
**Figura 262.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **73**.



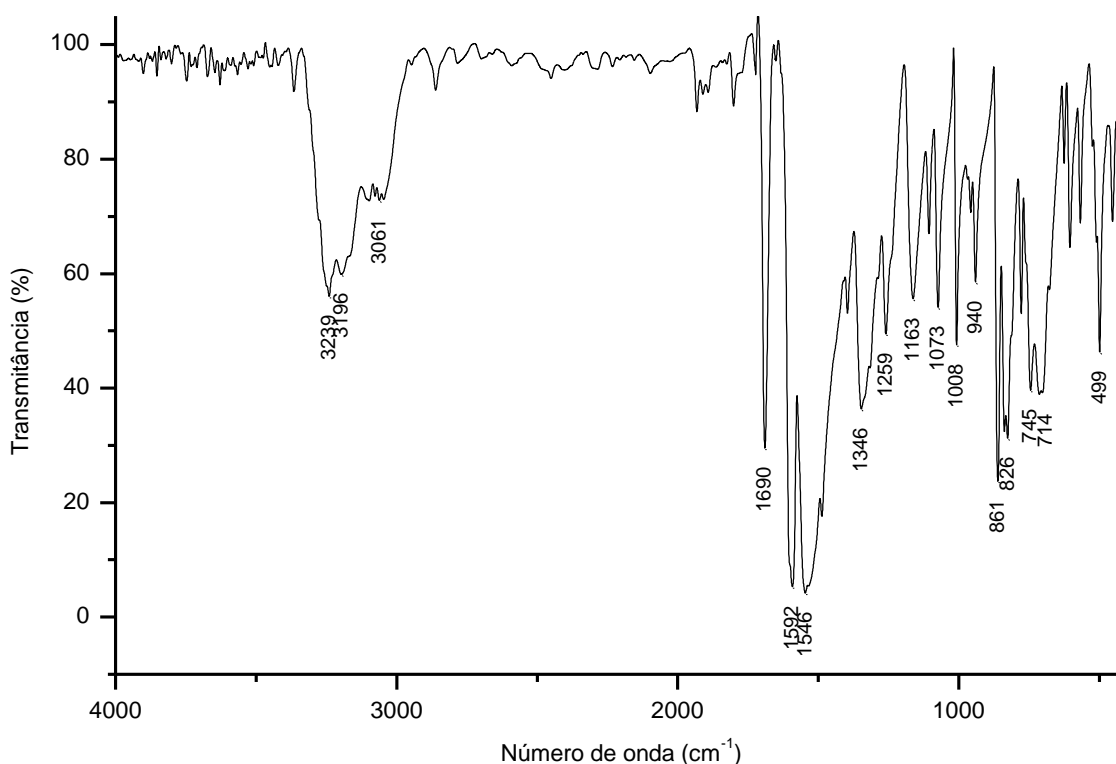
**Figura 263.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **73** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-d}_6$ ).



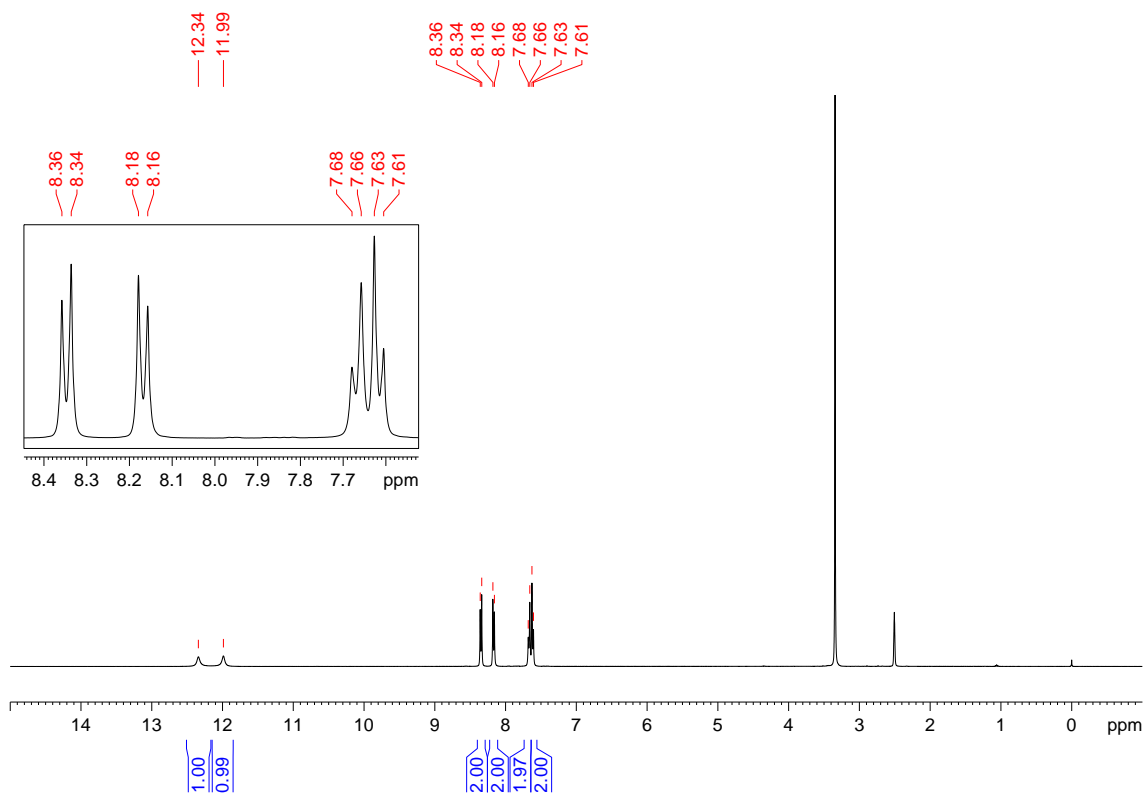
**Figura 264.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **73** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-d}_6$ ).

**(74) N-(4-nitrobenzoi)-N'-(4-bromofenil)-tiourea:**

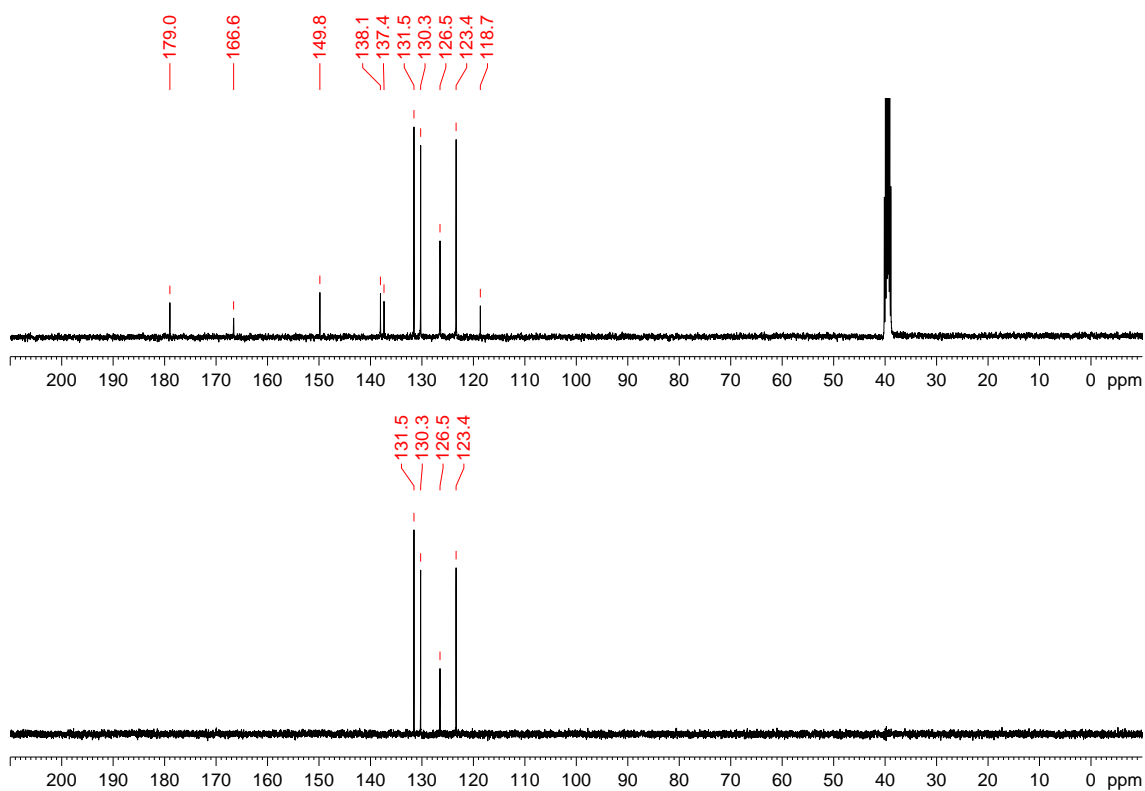
Recristalizado em etanol/acetona com rendimento de 56%. PF: 185-186 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3239, 3196, 3061, 1690, 1592, 1546, 1346, 1259, 1163, 1073, 1008, 940, 861, 826, 745, 714, 499. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7,62 (2H, d,  $^3J$  8,7 Hz), 7,67 (2H, d,  $^3J$  8,7 Hz), 8,17 (2H, d,  $^3J$  8,6 Hz), 8,35 (2H, d,  $^3J$  8,6 Hz), 11,99 (1H, s, CONH), 12,34 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 118,7 (C), 123,4(+) (CH), 126,5(+) (CH), 130,3(+) (CH), 131,5(+) (CH), 137,4 (C), 138,1(C), 149,8 (C), 166,6 (C=O), 179,0 (C=S).



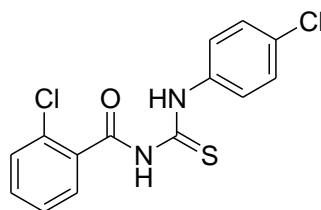
**Figura 265.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **74**.



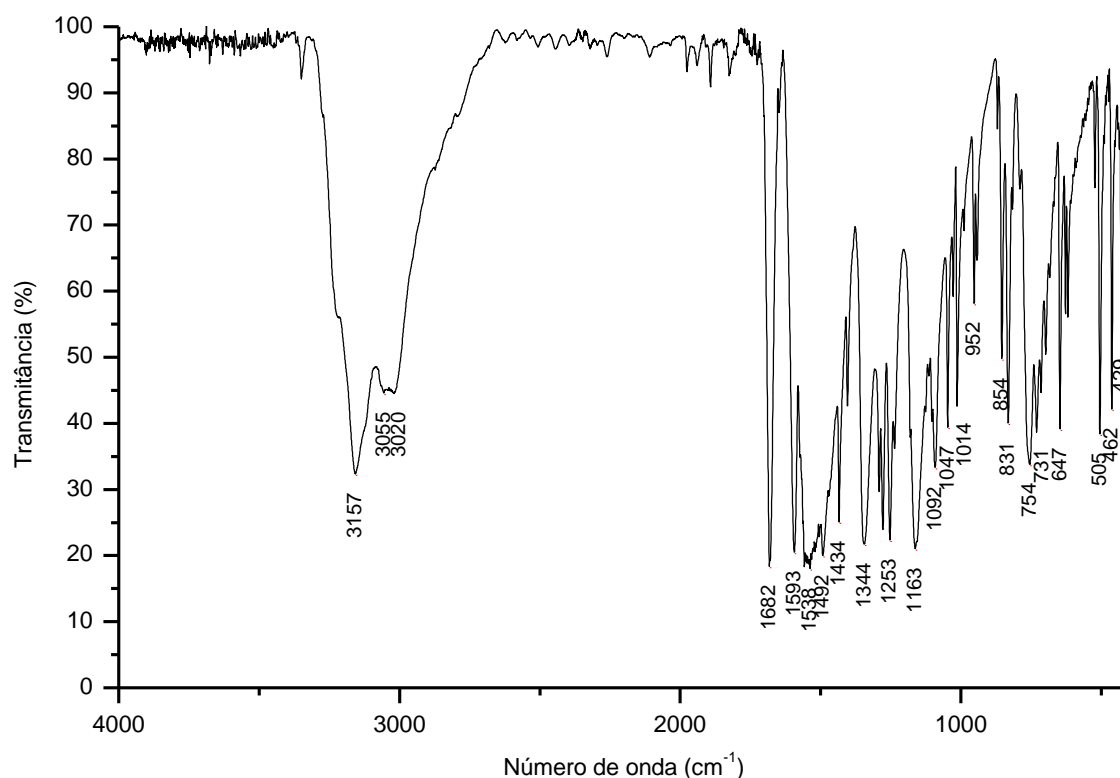
**Figura 266.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **74** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

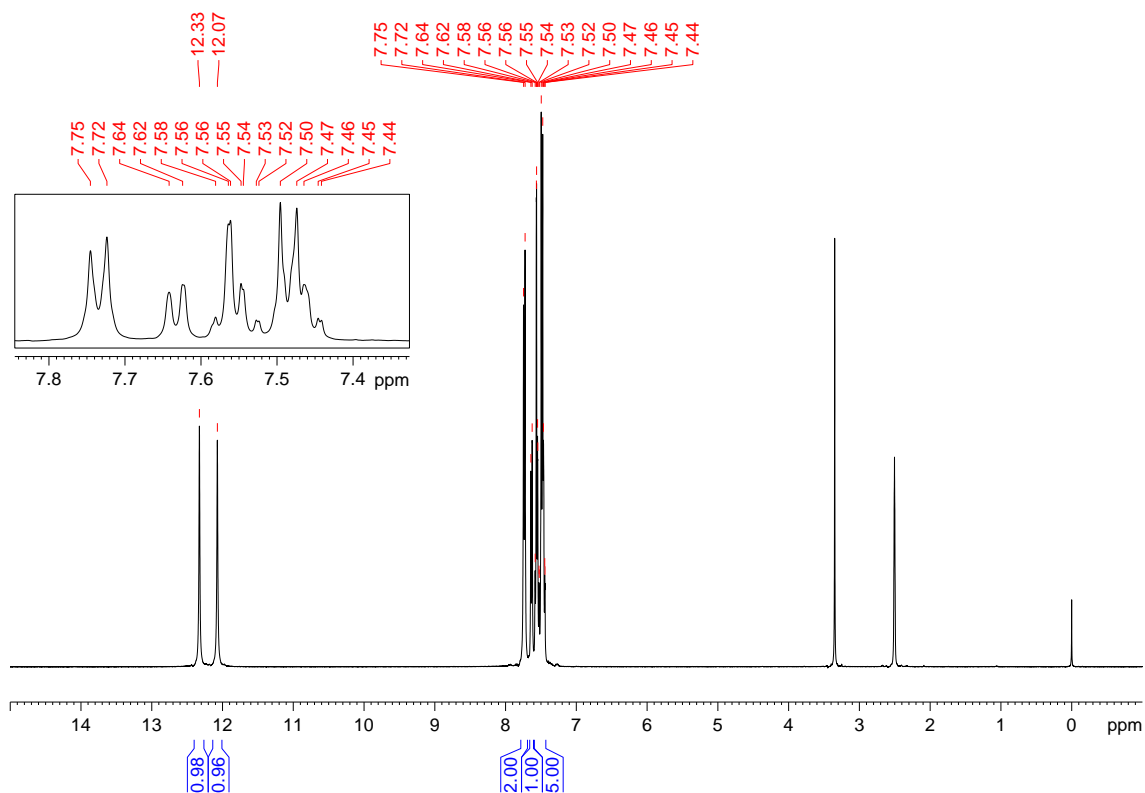


**Figura 267.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **74** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

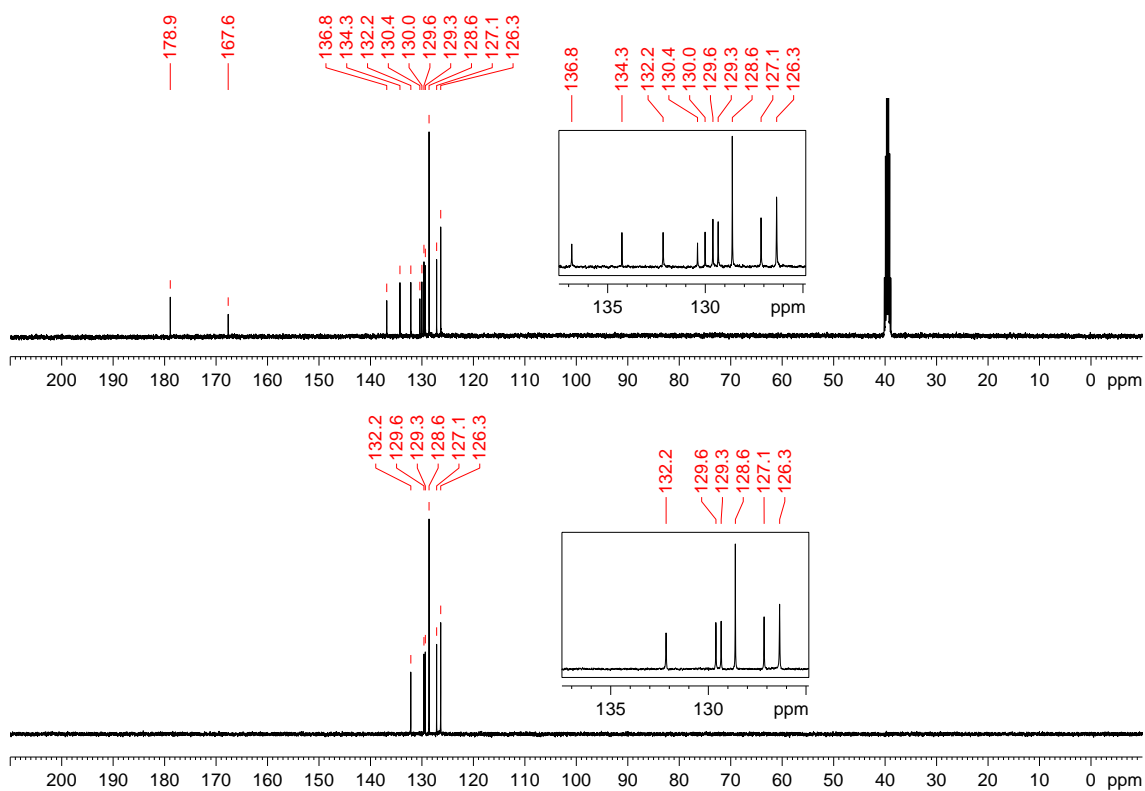
**(75) N-(2-clorobenzoil)-N'-(4-clorofenil)-tioureia:****(75)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 88%. PF: 177-178 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3157, 3055, 3020, 1682, 1593, 1538, 1492, 1434, 1344, 1253, 1163, 1092, 1047, 1014, 952, 854, 831, 754, 731, 647, 505, 462, 429. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7,44-7,58 (5H, m), 7,63 (1H, d,  $^3J$  7,4 Hz), 7,73 (2H, d,  $^3J$  8,5 Hz), 12,07 (1H, s, CONH), 12,33 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 126,3(+)(C), 127,1(+)(C), 128,6(+)(C), 129,3(+)(C), 129,6(+)(C), 130,0(C), 130,4(C), 132,2(+)(C), 134,3(C), 136,8(C), 167,6(C=O), 178,9(C=S).

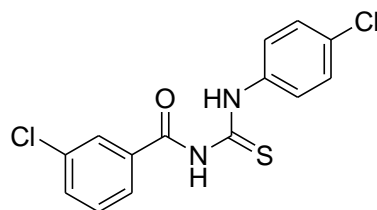
**Figura 268.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **75**.



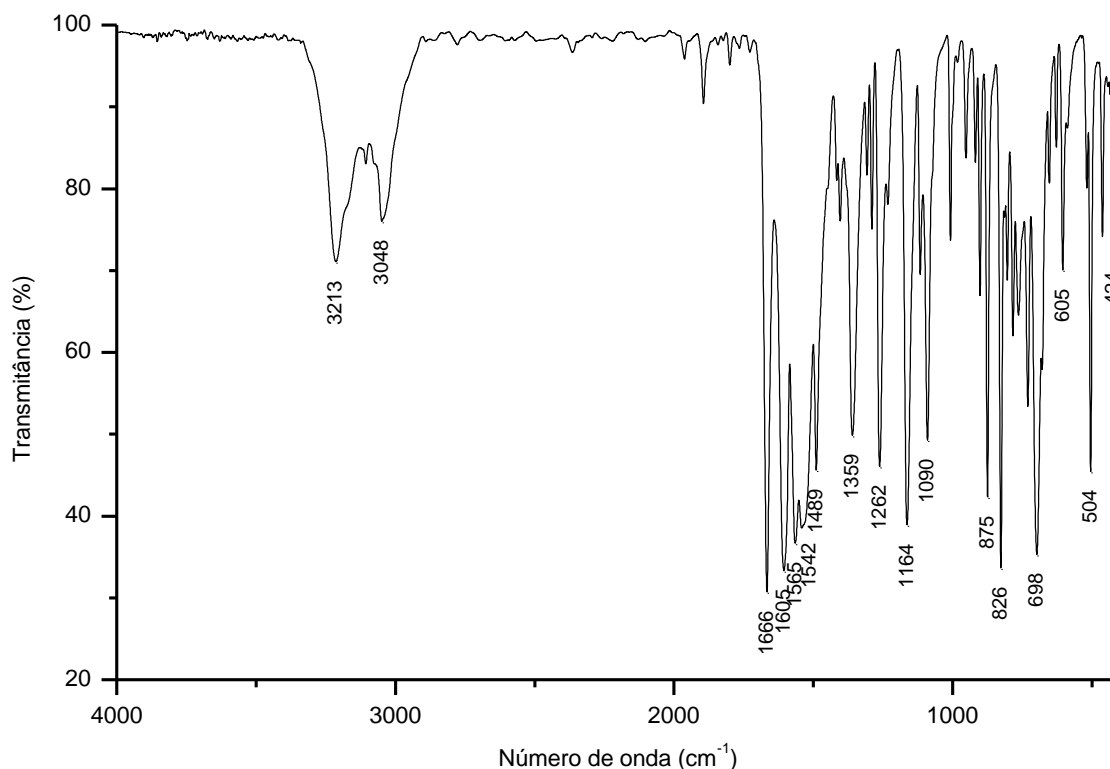
**Figura 269.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **75** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-d}_6$ ).

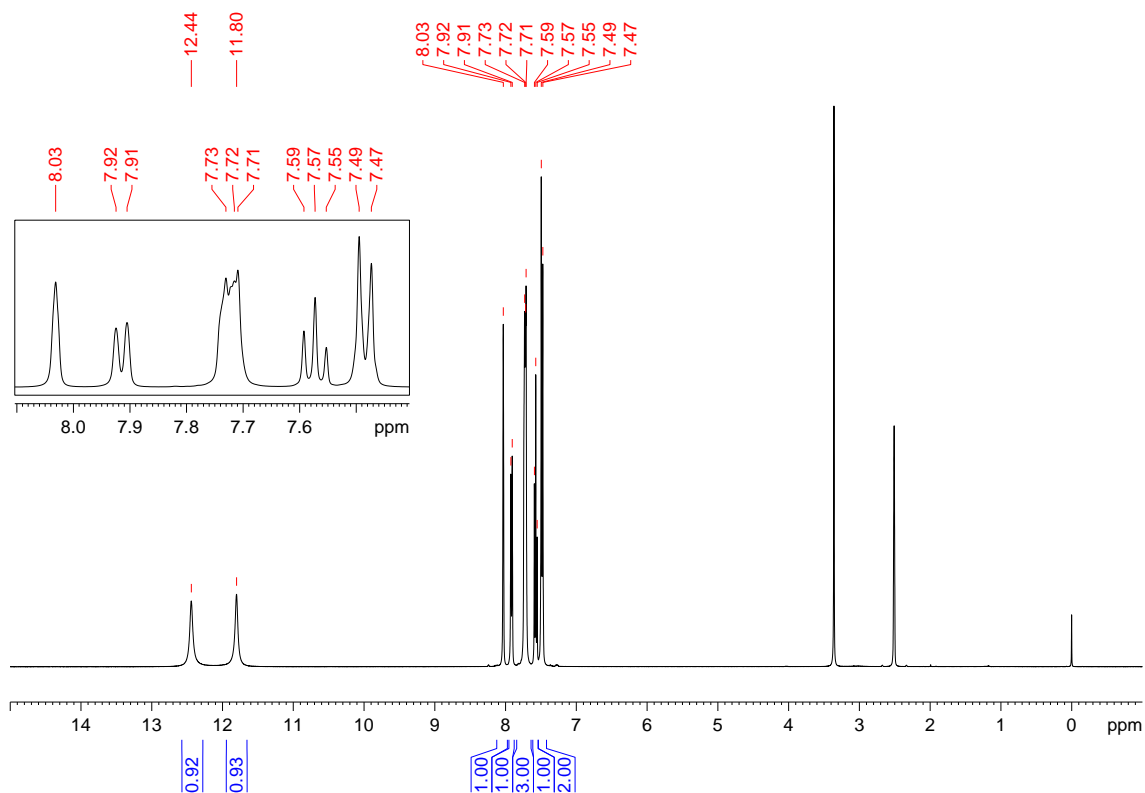


**Figura 270.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **75** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-d}_6$ ).

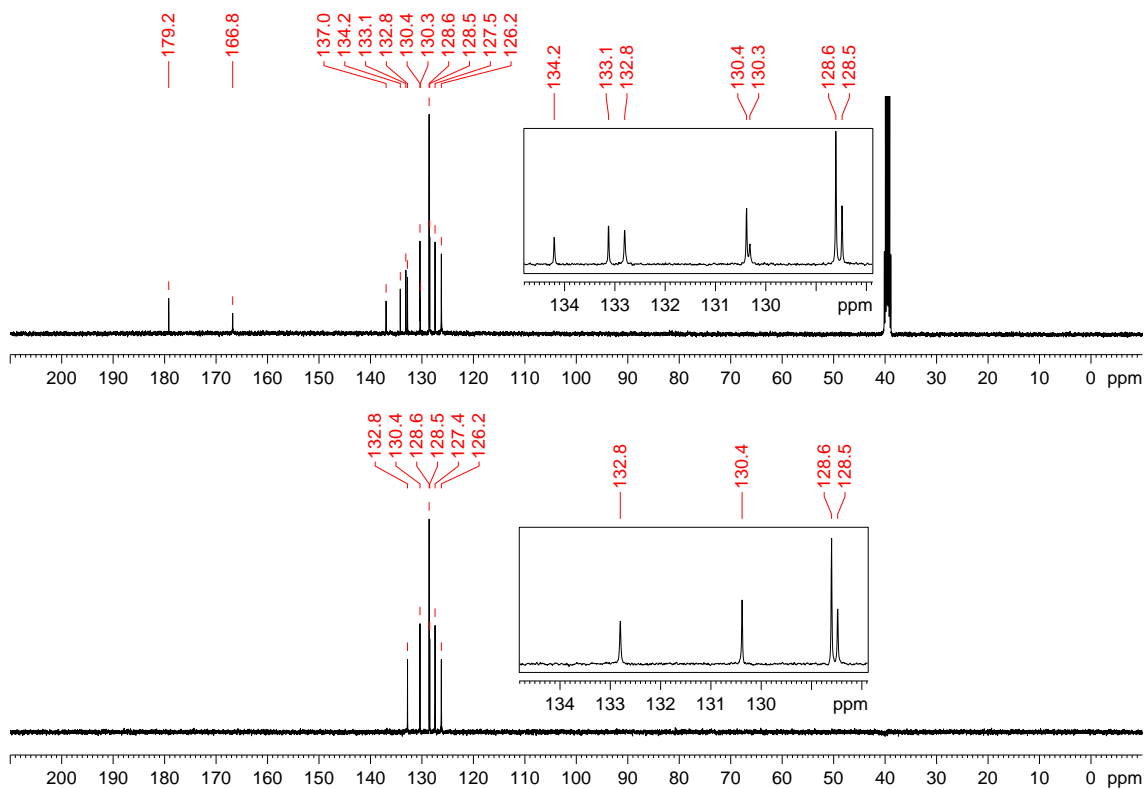
**(76) N-(3-clorobenzoil)-N'-(4-clorofenil)-tioureia:****(76)**

Recristalizado em etanol/acetona com rendimento de 77%. PF: 162-163 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3213, 3048, 1666, 1605, 1565, 1542, 1489, 1359, 1262, 1164, 1090, 875, 826, 698, 605, 504, 424. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7,48 (2H, d,  $^3J$  8,6 Hz), 7,57 (1H, t,  $^3J$  7,8 Hz), 7,70-7,74 (3H, m), 7,91 (1H, d,  $^3J$  7,8 Hz), 8,03 (1H, s), 11,80 (1H, s, CONH), 12,44 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 126,2(+) (CH), 127,5(+) (CH), 128,5(+) (CH), 128,6(+) (CH), 130,3 (C), 130,4(+) (CH), 132,8(+) (CH), 133,1 (C), 134,2 (C), 137,0 (C), 166,8 (C=O), 179,2 (C=S).

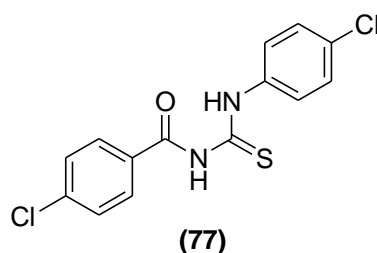
**Figura 271.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **76**.



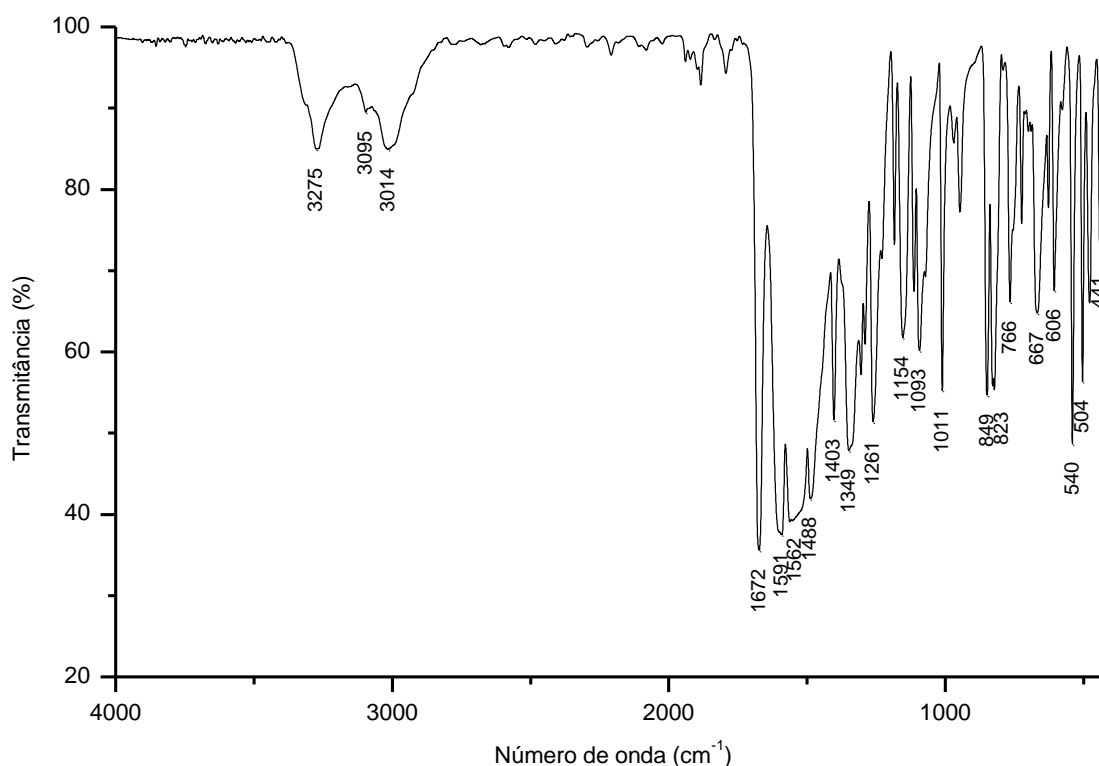
**Figura 272.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **76** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-d}_6$ ).



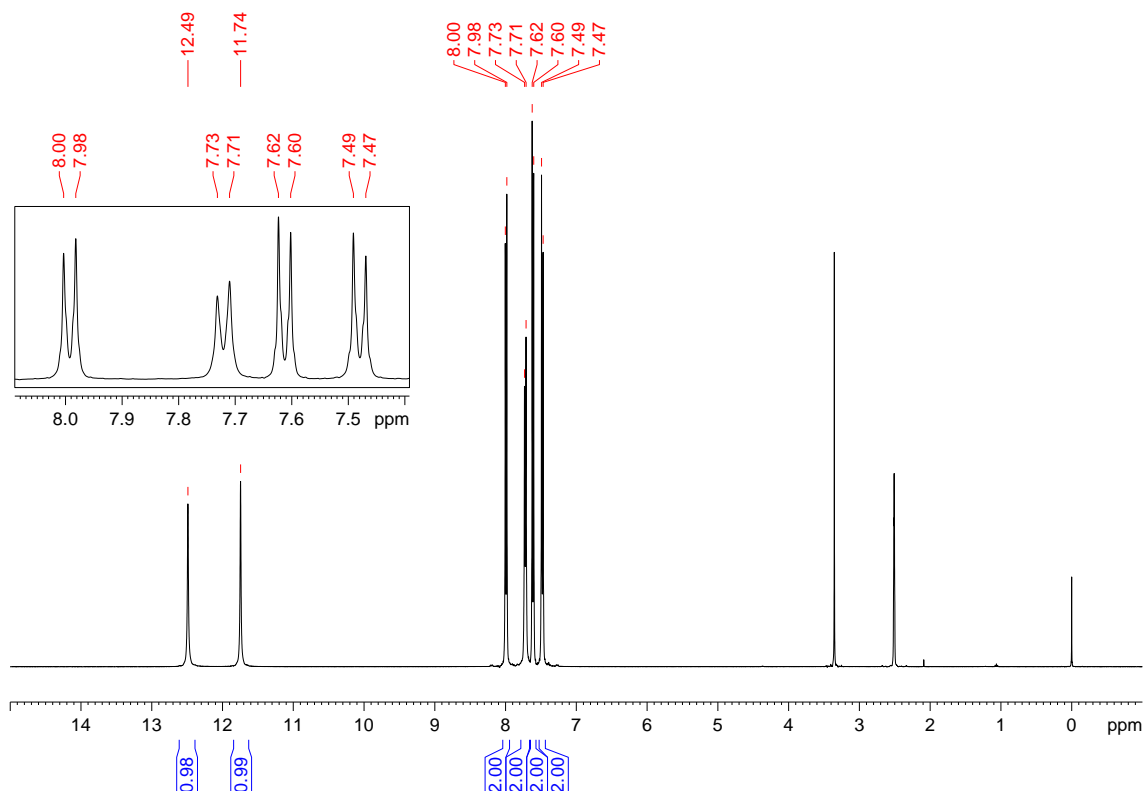
**Figura 273.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **76** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-d}_6$ ).

**(77) N-(4-clorobenzoil)-N'-(4-clorofenil)-tioureia:**

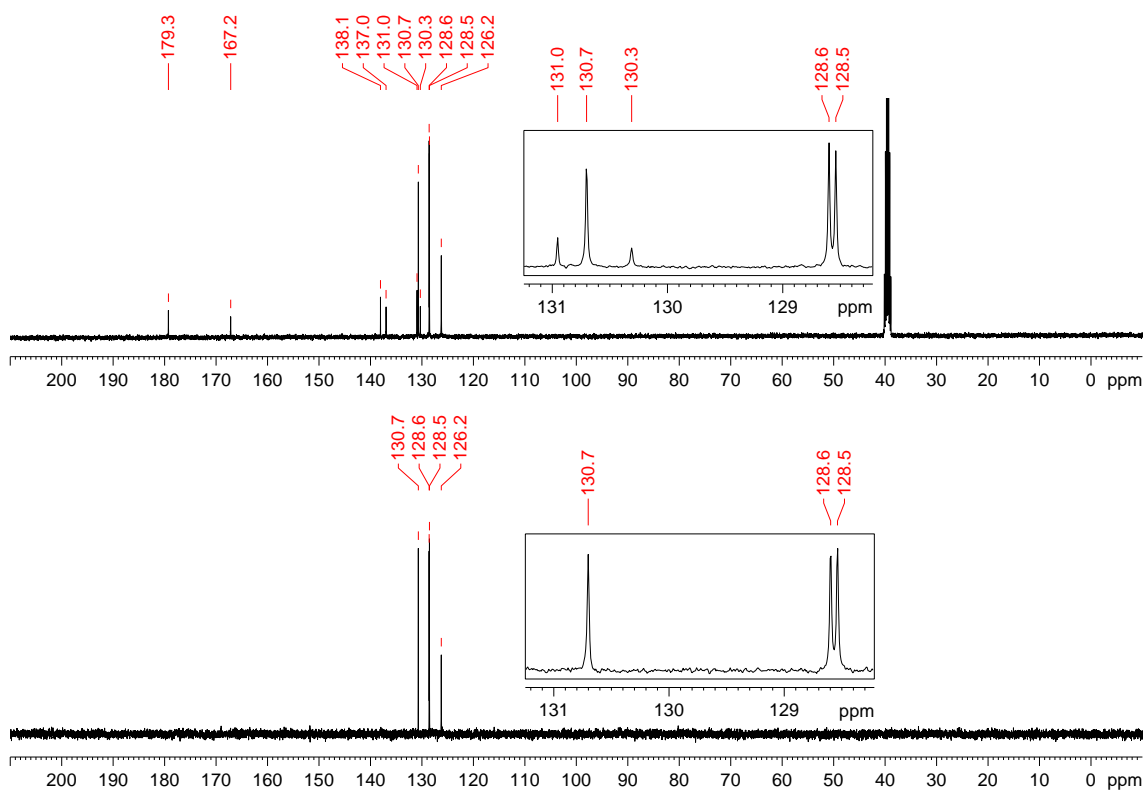
Recristalizado em etanol/acetona com rendimento de 99%. PF: 194 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3275, 3095, 3014, 1672, 1591, 1562, 1488, 1403, 1349, 1261, 1154, 1093, 1011, 849, 823, 766, 667, 608, 540, 504, 441. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7,48 (2H, d,  $^3J$  8,7 Hz), 7,61 (2H, d,  $^3J$  8,5 Hz), 7,72 (2H, d,  $^3J$  8,5 Hz), 7,99 (2H, d,  $^3J$  8,7 Hz), 11,74 (1H, s, CONH), 12,49 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 126,2(+) (CH), 128,5(+) (CH), 128,6(+) (CH), 130,3 (C), 130,7(+) (CH), 131,0 (C), 137,0 (C), 138,1 (C), 167,2 (C=O), 179,3 (C=S).



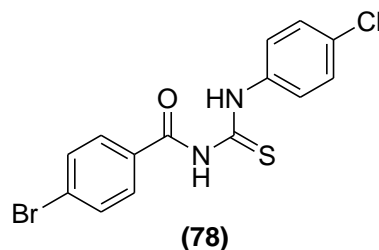
**Figura 274.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **77**.



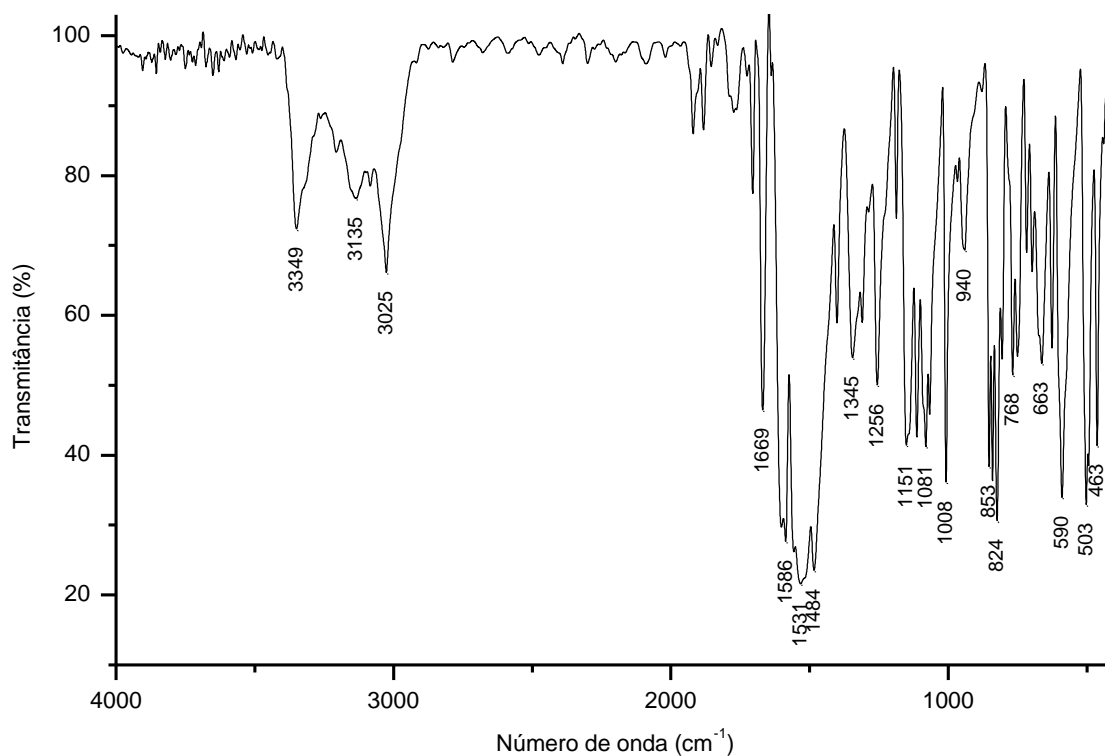
**Figura 275.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **77** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-d}_6$ ).



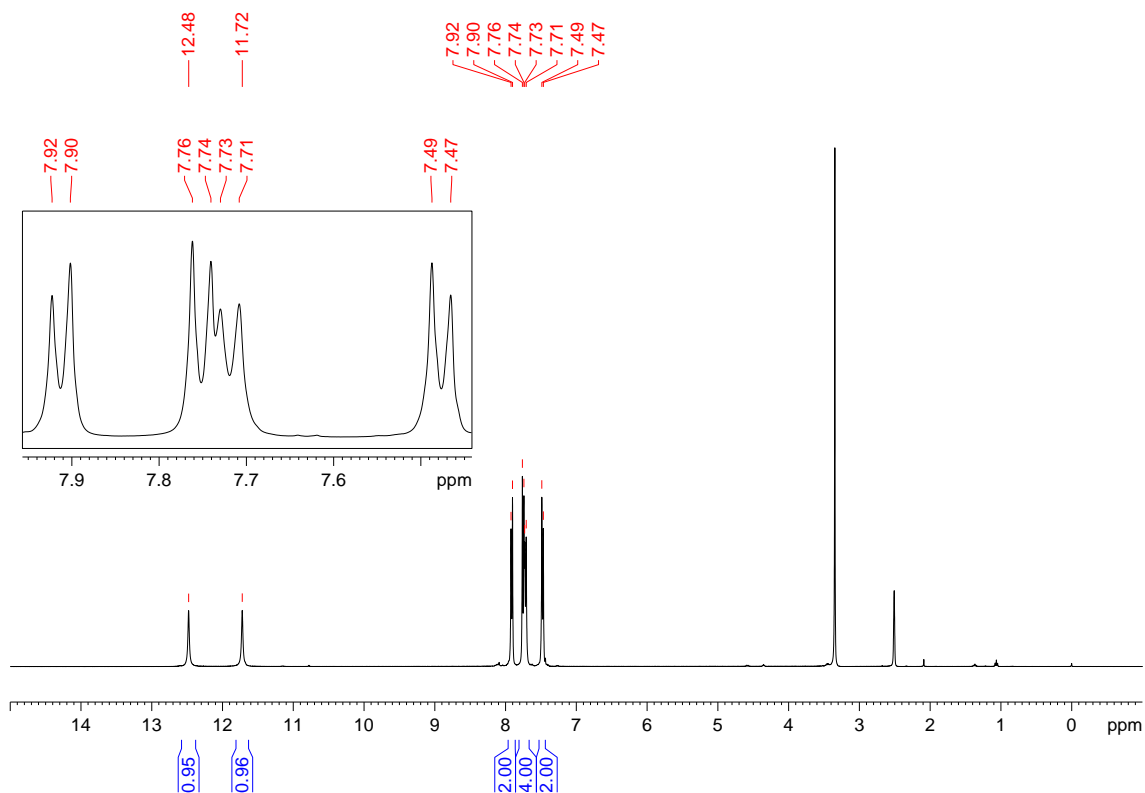
**Figura 276.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **77** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-d}_6$ ).

**(78) N-(4-bromobenzoyl)-N'-(4-clorofenil)-tioureia:**

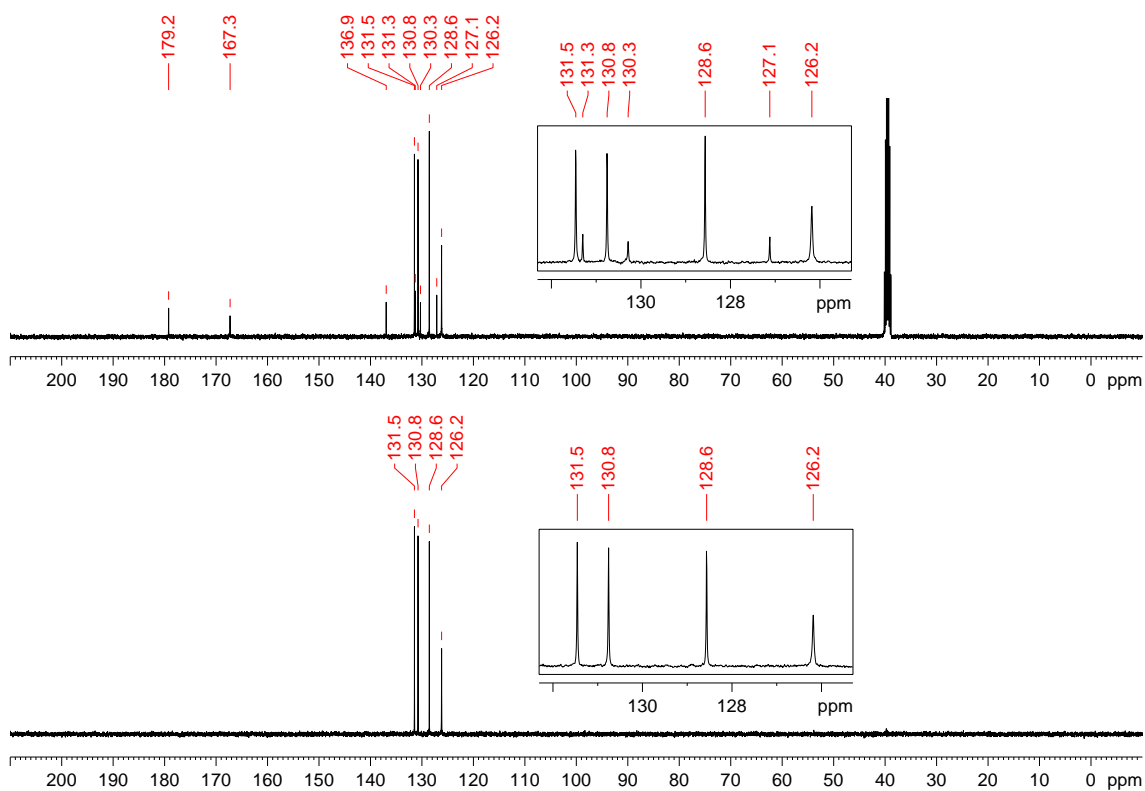
Recristalizado em etanol/acetona com rendimento de 81%. PF: 183-185 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3349, 3135, 3025, 1669, 1531, 1484, 1345, 1256, 1151, 1081, 1008, 940, 853, 824, 768, 663, 590, 503, 463. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7,48 (2H, d,  $^3J$  8,5 Hz), 7,70-7,76 (4H, m), 7,91 (2H, d,  $^3J$  8,5 Hz), 11,72 (1H, s, CONH), 12,48 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 126,2(+) (CH), 127,1 (C), 128,6(+) (CH), 130,3 (C), 130,8(+) (CH), 131,3 (C), 131,5(+) (CH), 136,9 (C), 167,3 (C=O), 179,2 (C=S).



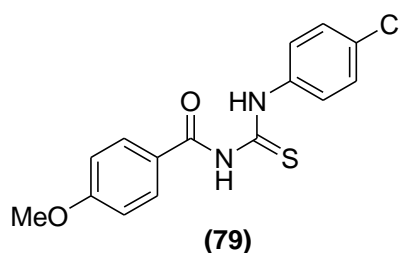
**Figura 277.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **78**.



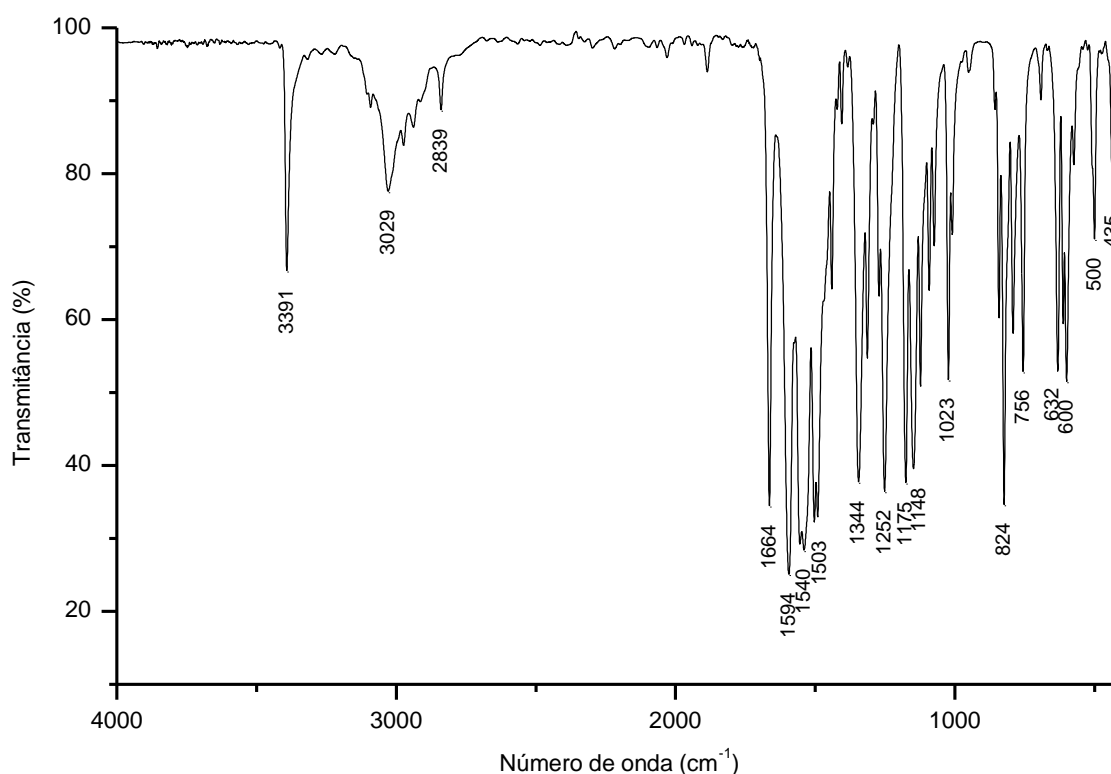
**Figura 278.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **78** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente DMSO- $d_6$ ).



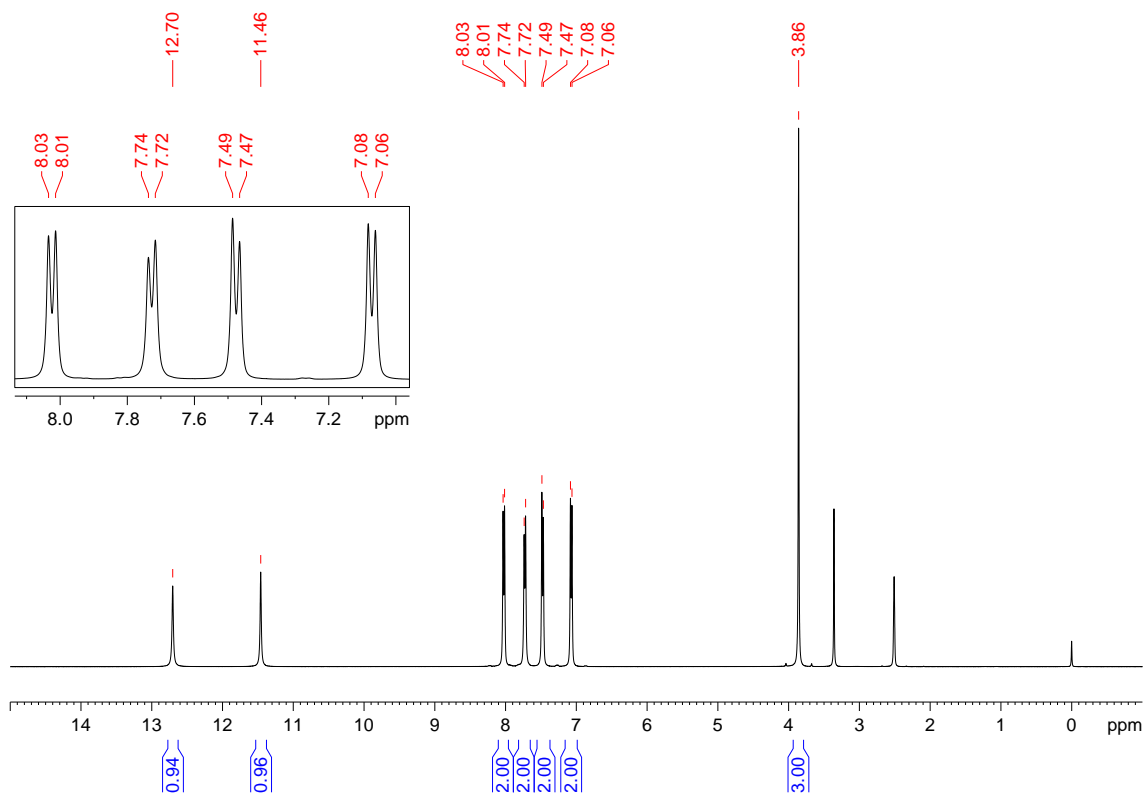
**Figura 279.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **78** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente DMSO- $d_6$ ).

**(79) *N*-(4-metoxibenzoil)-*N'*-(4-clorofenil)-tiourea:**

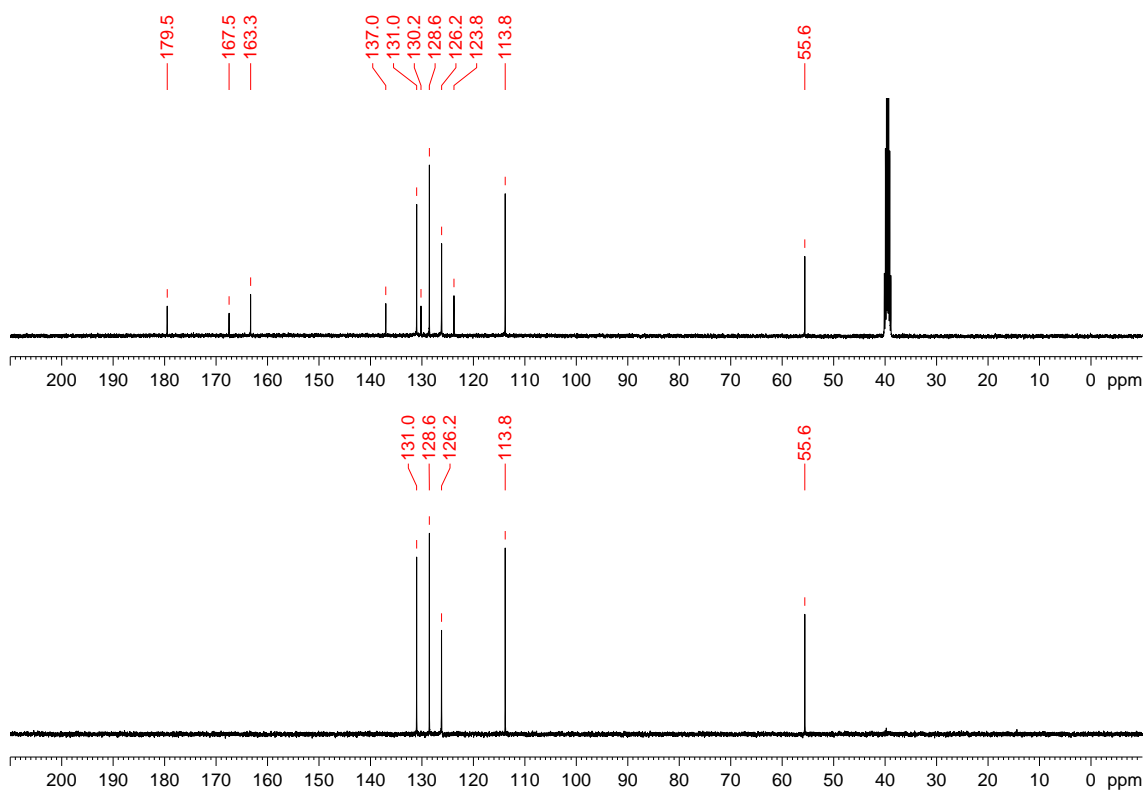
Recristalizado em etanol/acetona com rendimento de 85%. PF: 146 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3391, 3029, 2839, 1664, 1594, 1540, 1503, 1344, 1252, 1175, 1148, 1023, 824, 756, 632, 600, 500, 435. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 3,86 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 7,07 (2H, d,  $^3J$  8,5 Hz), 7,48 (2H, d,  $^3J$  8,2 Hz), 7,73 (2H, d,  $^3J$  8,2 Hz), 8,02 (2H, d,  $^3J$  8,5 Hz), 11,46 (1H, s,  $\text{CONH}$ ), 12,70 (1H, s,  $\text{CSNH}$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 55,6(+) ( $\text{OCH}_3$ ), 113,8(+) (CH), 123,8 (C), 126,2(+) (CH), 128,6(+) (CH), 130,2 (C), 131,0(+) (CH), 137,0 (C), 163,3 (C), 167,5 (C=O), 179,5 (C=S).



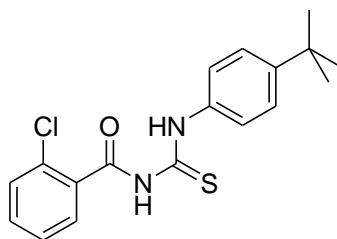
**Figura 280.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **79**.



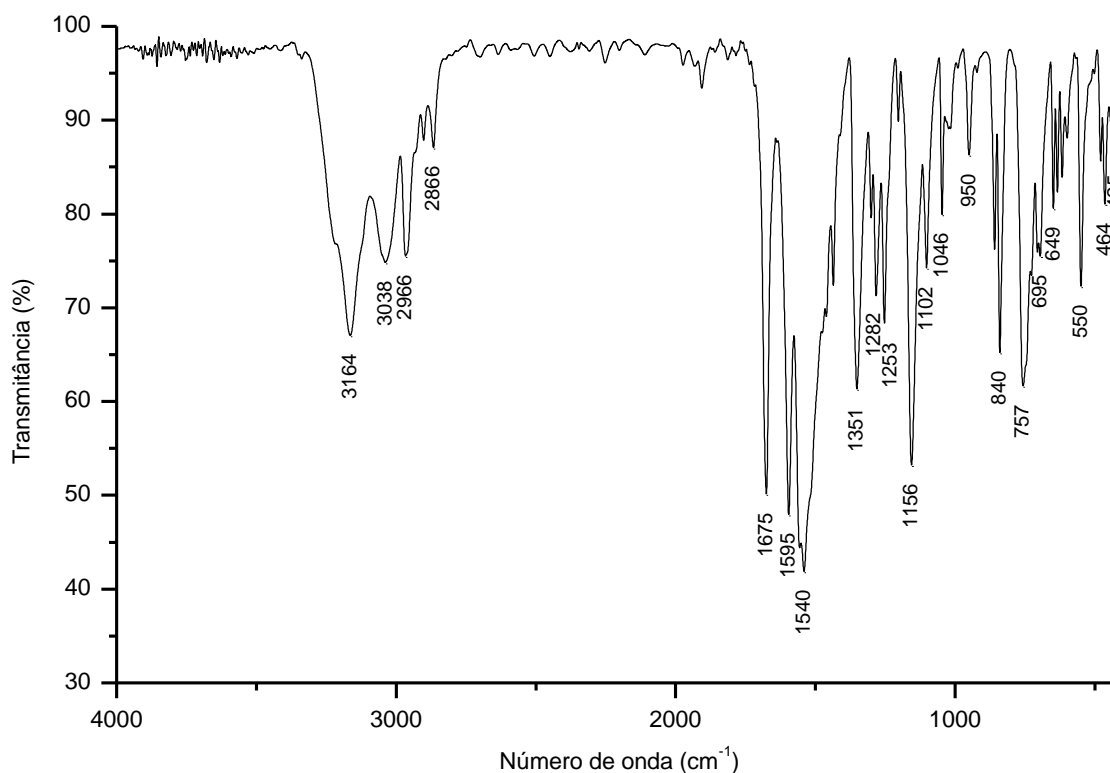
**Figura 281.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **79** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

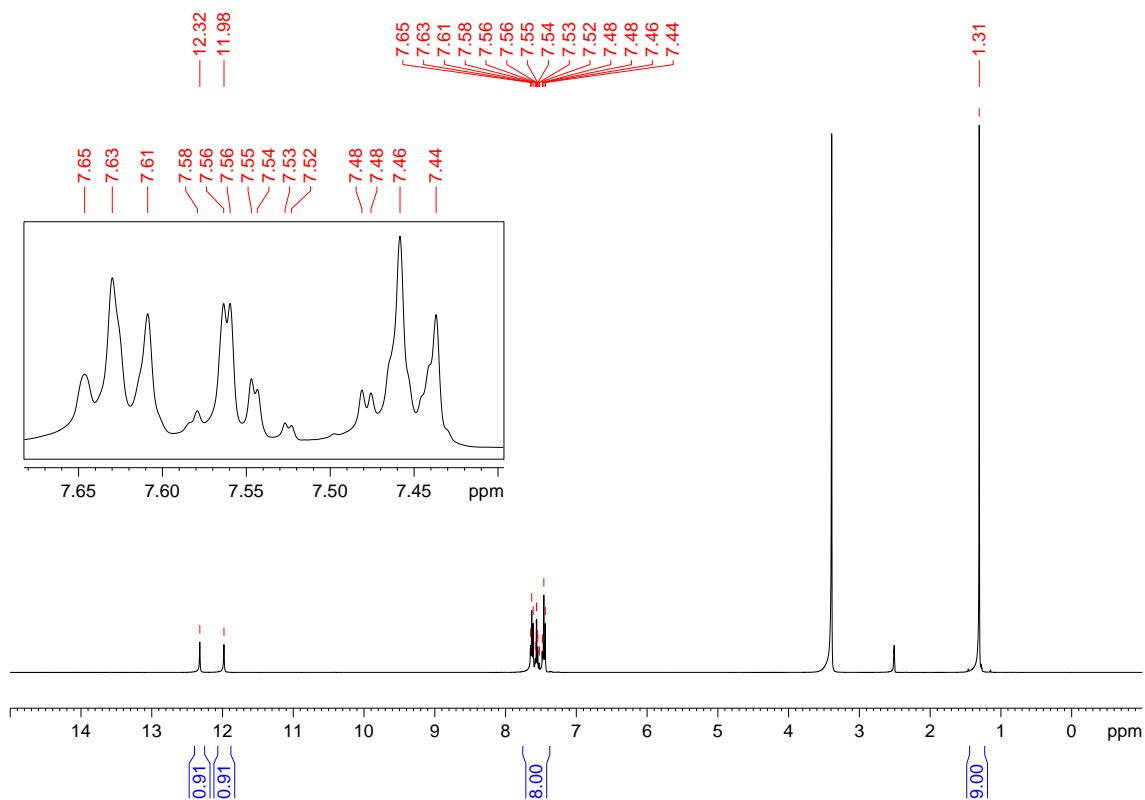


**Figura 282.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **79** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

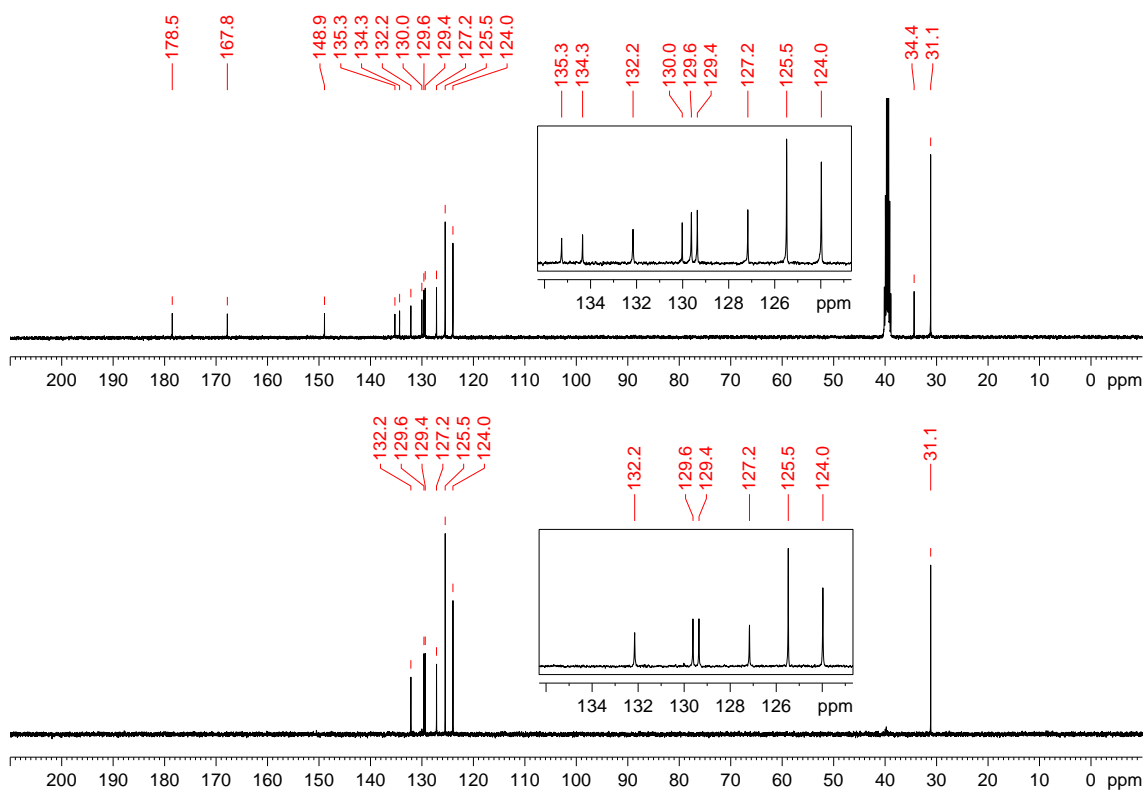
**(80) N-(2-clorobenzoil)-N'-(4-tercbutilfenil)-tiourea:****(80)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 58%. PF: 115-117 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3164, 3038, 2966, 2866, 1675, 1595, 1540, 1351, 1282, 1253, 1156, 1102, 1046, 950, 840, 757, 695, 649, 550, 464, 425. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 1,31 (9H,  $3 \times \text{CH}_3$ ), 7,43-7,65 (8H, m), 11,98 (1H, s, CONH), 12,32 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 124,0(+) (CH), 125,5(+) (CH), 127,2(+) (CH), 129,4(+) (CH), 129,6(+) (CH), 130,0 (C), 132,2(+) (CH), 134,3 (C), 135,3 (C), 148,9 (C), 167,8 (C=O), 178,5 (C=S).

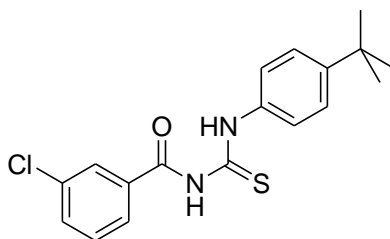
**Figura 283.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **80**.



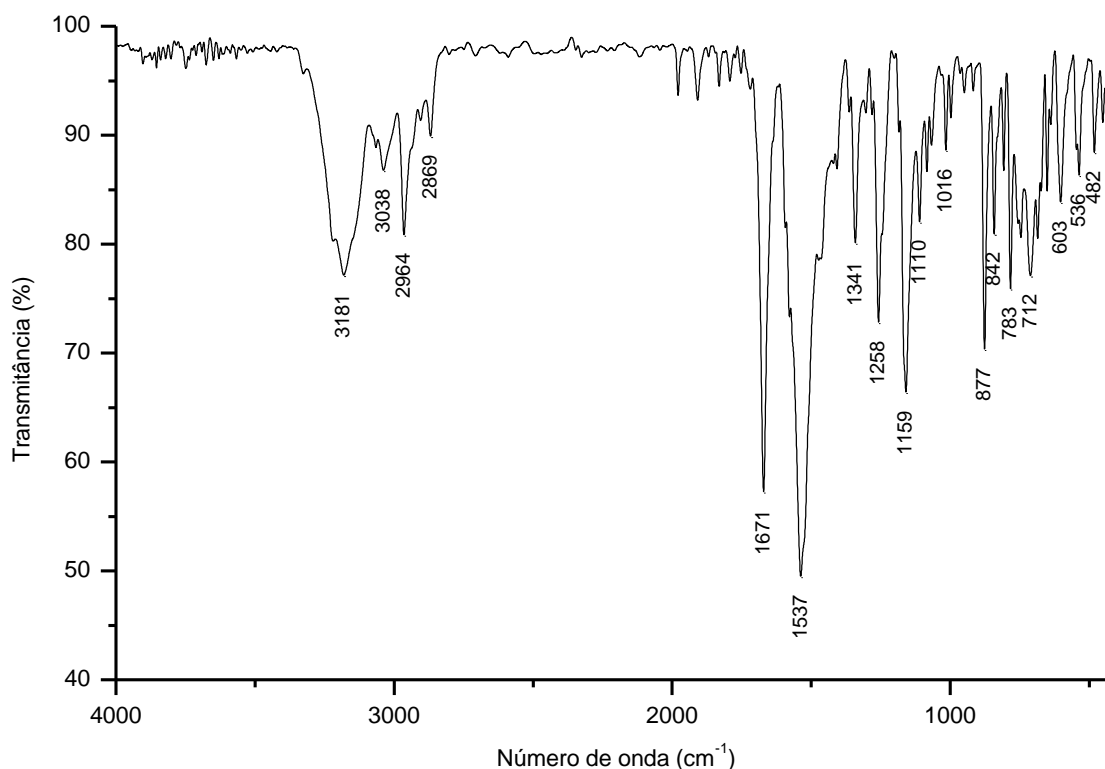
**Figura 284.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **80** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

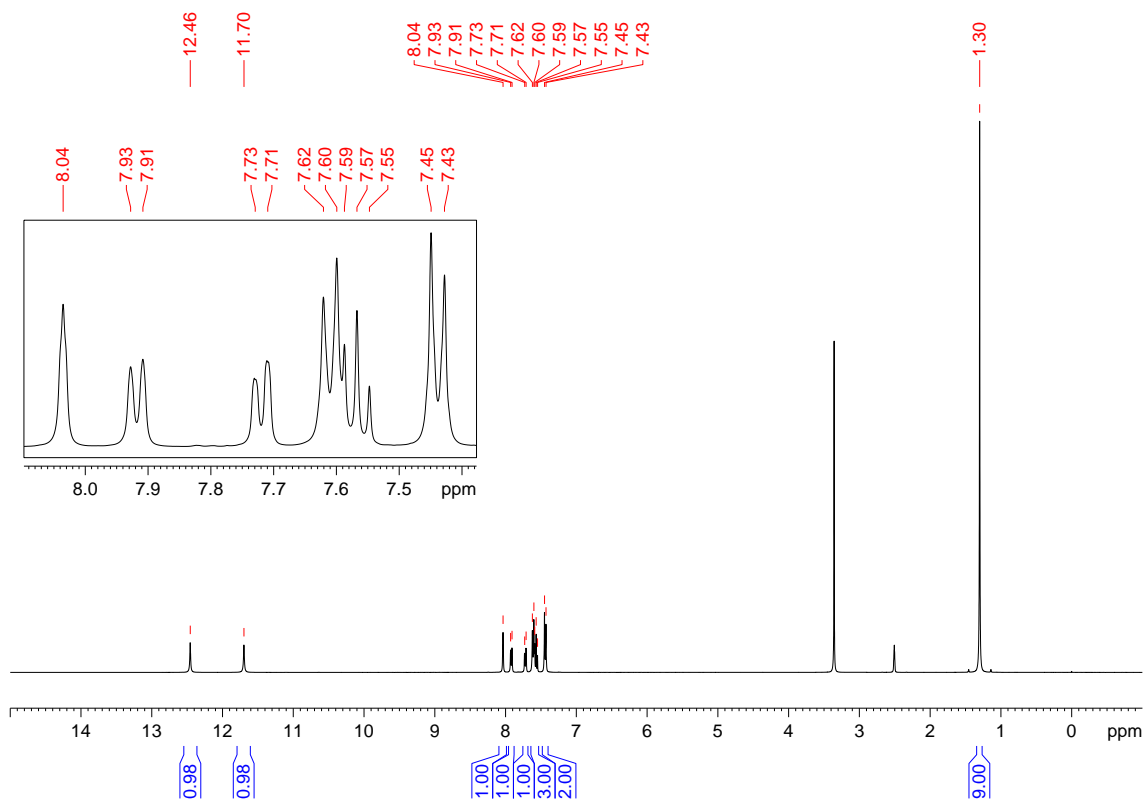


**Figura 285.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **80** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

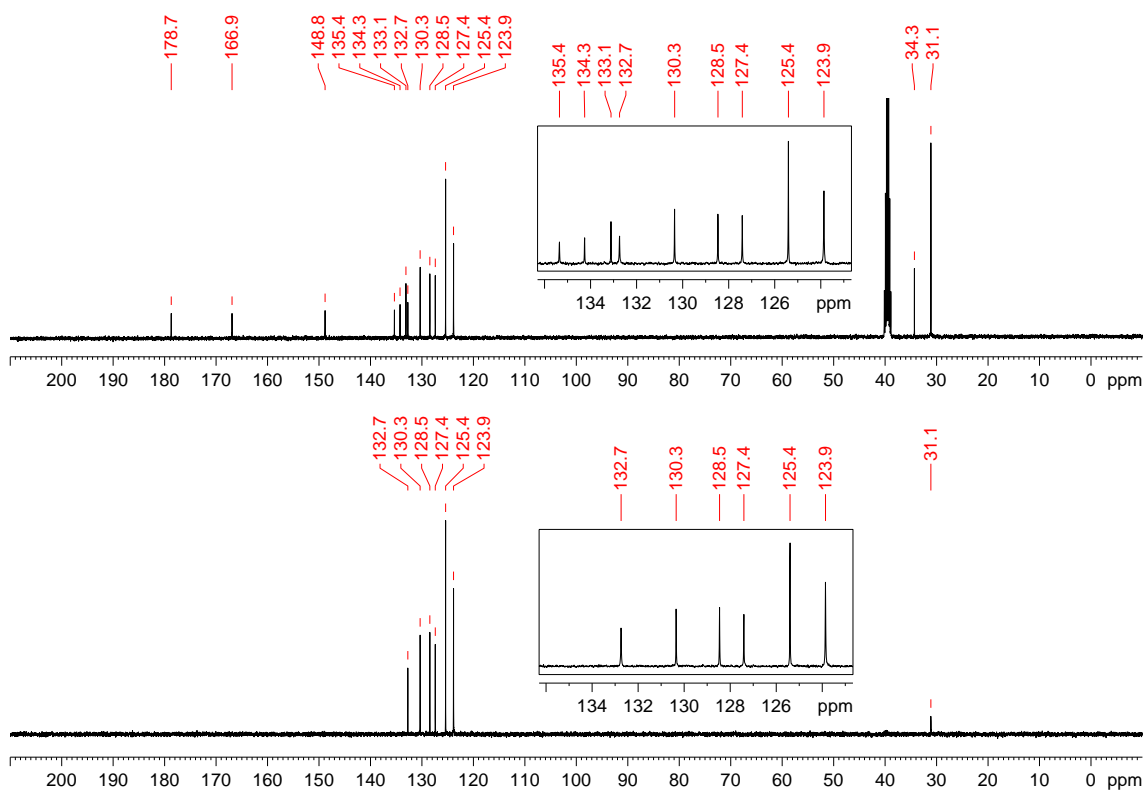
**(81) *N*-(3-clorobenzoil)-*N'*-(4-tercbutilfenil)-tiourea:****(81)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 69%. PF: 154-155 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3181, 3038, 2964, 2869, 1671, 1537, 1341, 1258, 1159, 1110, 1016, 877, 842, 783, 712, 603, 536, 482. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 1,30 (9H,  $3\times\text{CH}_3$ ), 7,44 (2H, d,  $^3J$  8,6 Hz), 7,54-7,62 (3H, m), 7,72 (1H, d,  $^3J$  8,1 Hz), 7,92 (1H, d,  $^3J$  8,1 Hz), 8,04 (1H, s), 11,70 (1H, s, CONH), 12,46 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 31,1(+), ( $3\times\text{CH}_3$ ), 34,3 (C), 123,9(+), (CH), 125,4(+), (CH), 127,4(+), (CH), 128,5(+), (CH), 130,3(+), (CH), 132,7(+), (CH), 133,1 (C), 134,3 (C), 135,4 (C), 148,8 (C), 166,9 (C=O), 178,7 (C=S).

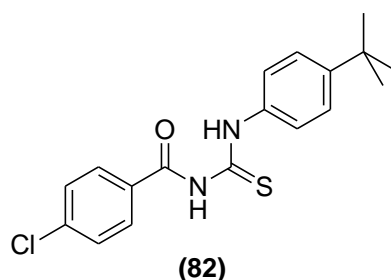
**Figura 286.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **81**.



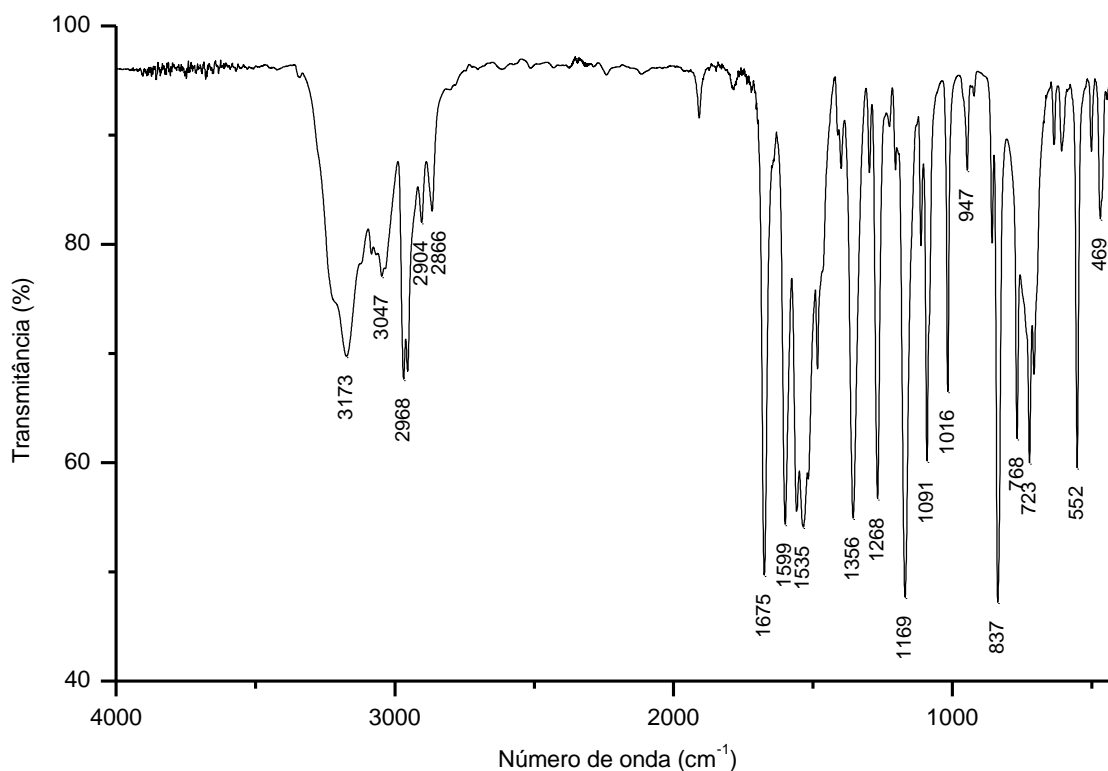
**Figura 287.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **81** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



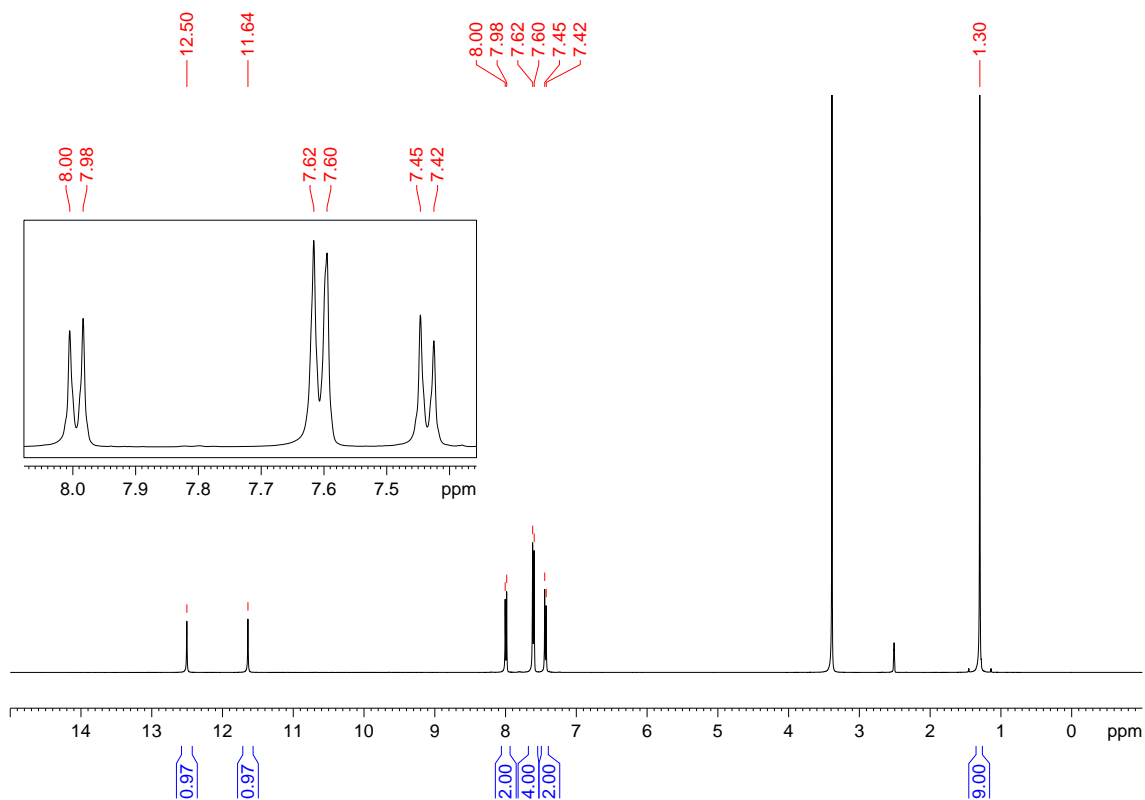
**Figura 288.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **81** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

**(82) *N*-(4-clorobenzoil)-*N'*-(4-tercbutilfenil)-tiourea:**

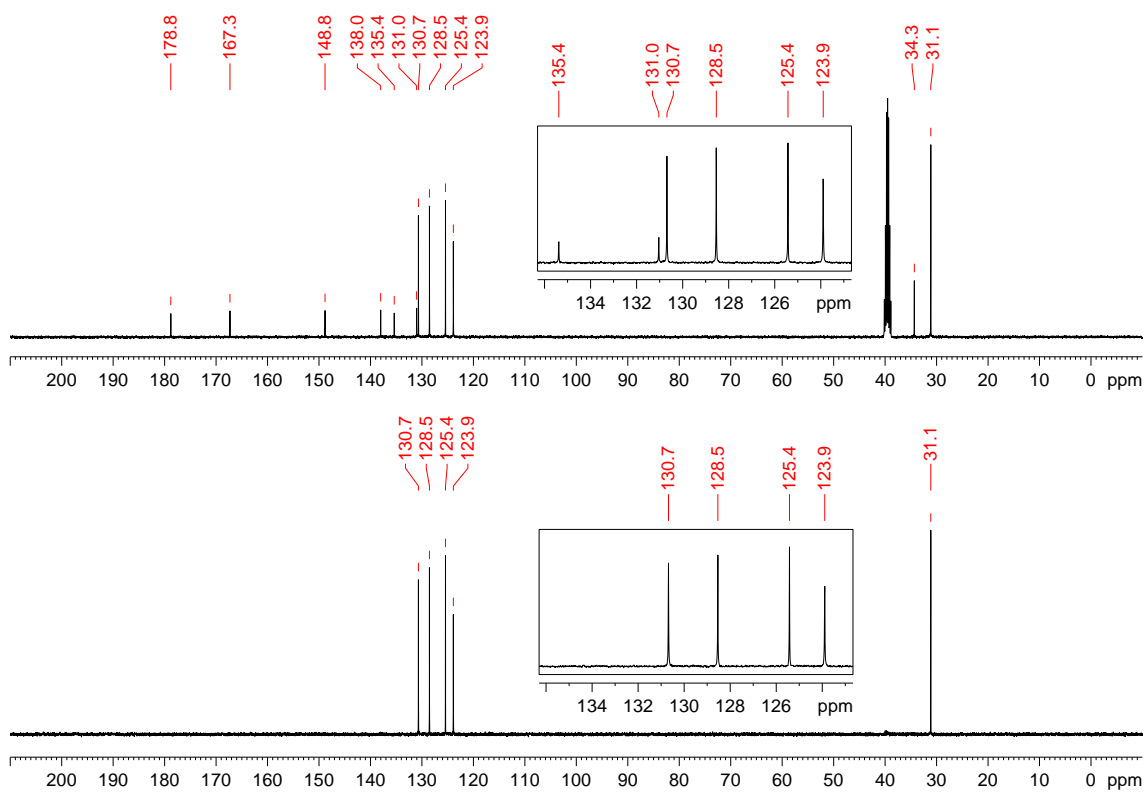
Recristalizado em etanol com rendimento de 68%. PF: 149-151 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3173, 3047, 2968, 2904, 2866, 1675, 1599, 1535, 1356, 1268, 1169, 1091, 1016, 947, 837, 768, 723, 552, 469. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 1,30 (9H,  $3\times\text{CH}_3$ ), 7,44 (2H, d,  $^3J$  8,6 Hz), 7,58-7,62 (4H, m), 7,99 (2H, d,  $^3J$  8,6 Hz), 11,64 (1H, s, CONH), 12,50 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 31,1(+) ( $3\times\text{CH}_3$ ), 34,3 (C), 123,9(+) (CH), 125,4(+) (CH), 128,5(+) (CH), 130,7(+) (CH), 131,0 (C), 135,4 (C), 138,0 (C), 148,8 (C), 167,3 (C=O), 178,8 (C=S).



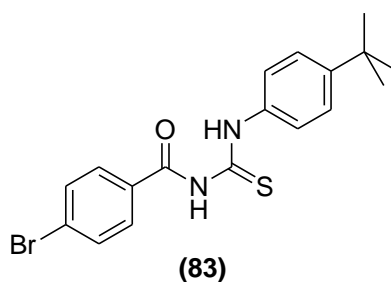
**Figura 289.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **82**.



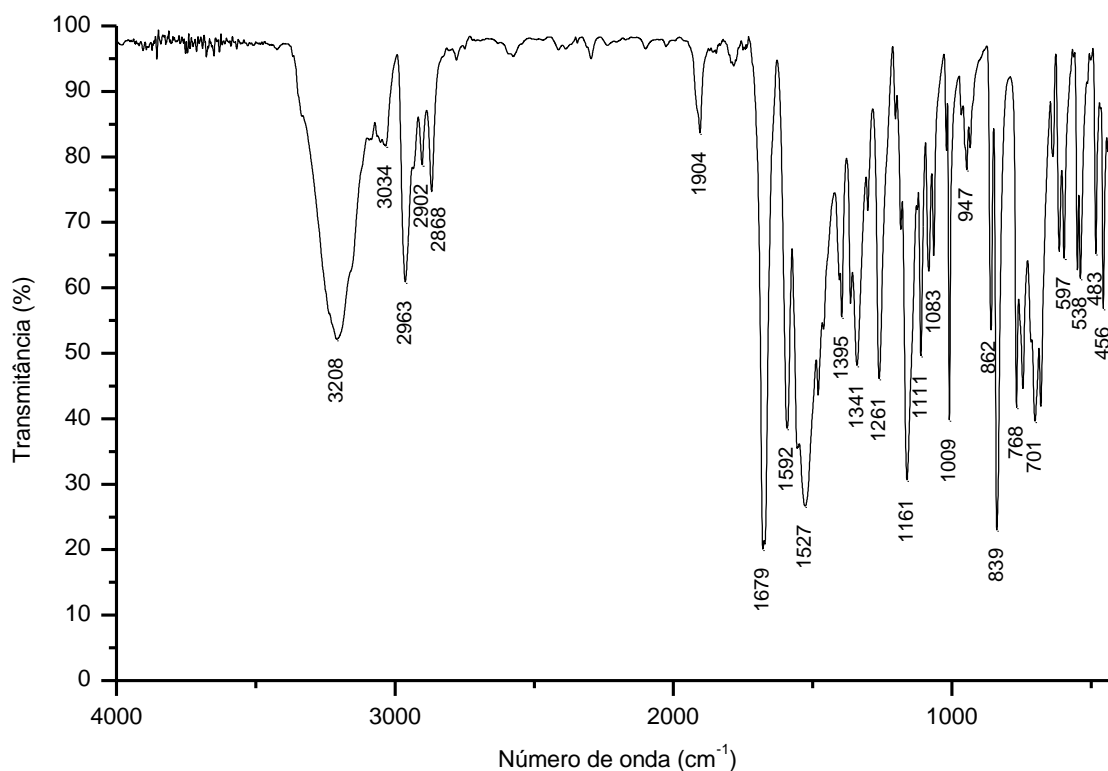
**Figura 290.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **82** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-d}_6$ ).



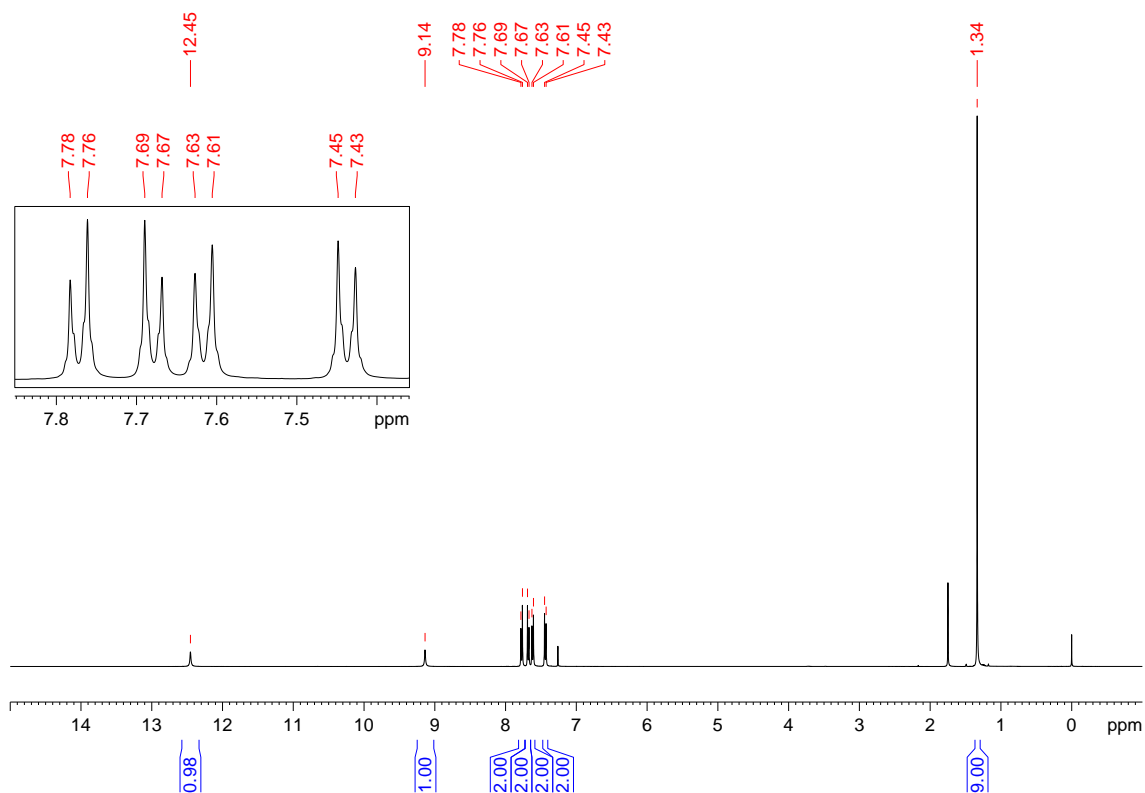
**Figura 291.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **82** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-d}_6$ ).

**(83) N-(4-bromobenzoyl)-N'-(4-tercbutilfenil)-tiourea:**

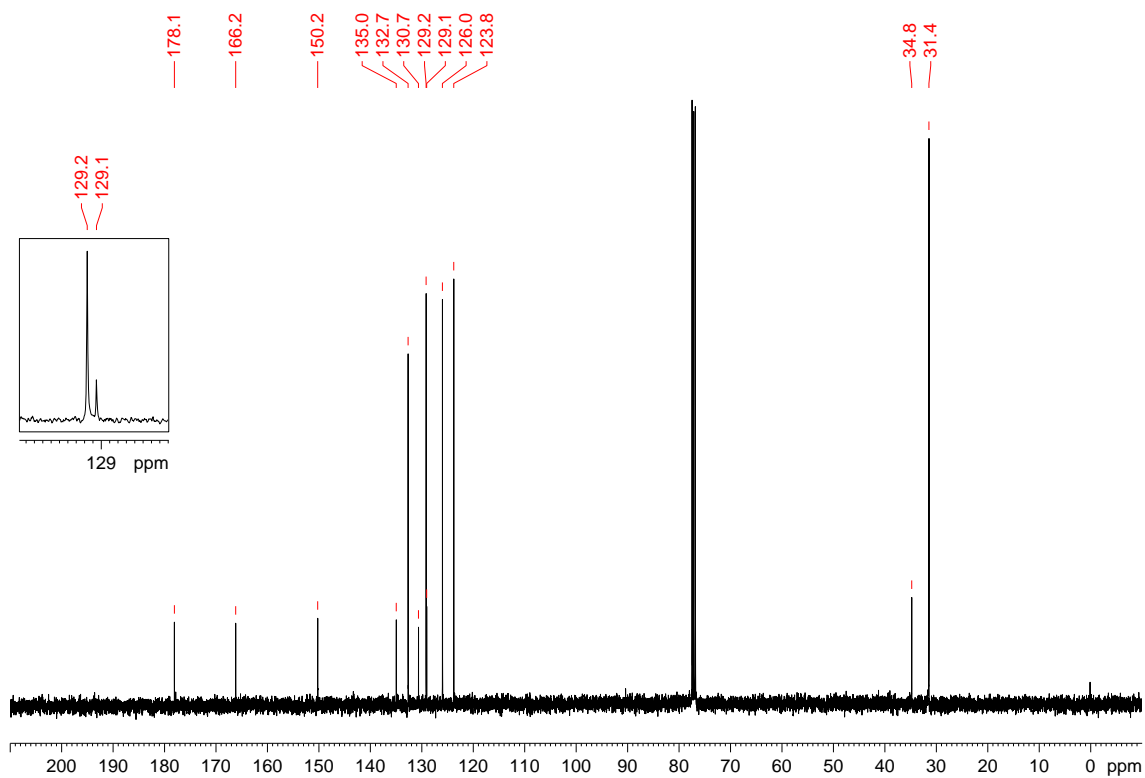
Recristalizado em etanol com rendimento de 70%. PF: 151-152 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3208, 3034, 2963, 2902, 2868, 1679, 1592, 1527, 1395, 1341, 1261, 1161, 1111, 1083, 1009, 947, 862, 839, 768, 701, 597, 538, 483, 456. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,34 (9H, s,  $3\times\text{CH}_3$ ), 7,44 (2H, d,  $^3J$  8,8 Hz), 7,62 (2H, d,  $^3J$  8,8 Hz), 7,68 (2H, d,  $^3J$  8,8 Hz), 7,77 (2H, d,  $^3J$  8,8 Hz), 9,14 (1H, s, CONH), 12,45 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 31,4, 34,8, 123,8, 126,0, 129,1, 129,2, 130,7, 132,7, 135,0, 150,2, 166,2 (C=O), 178,1 (C=S).



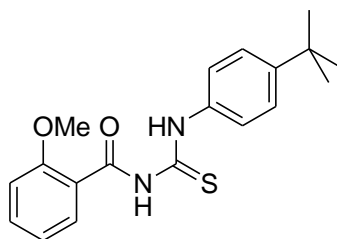
**Figura 292.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **83**.



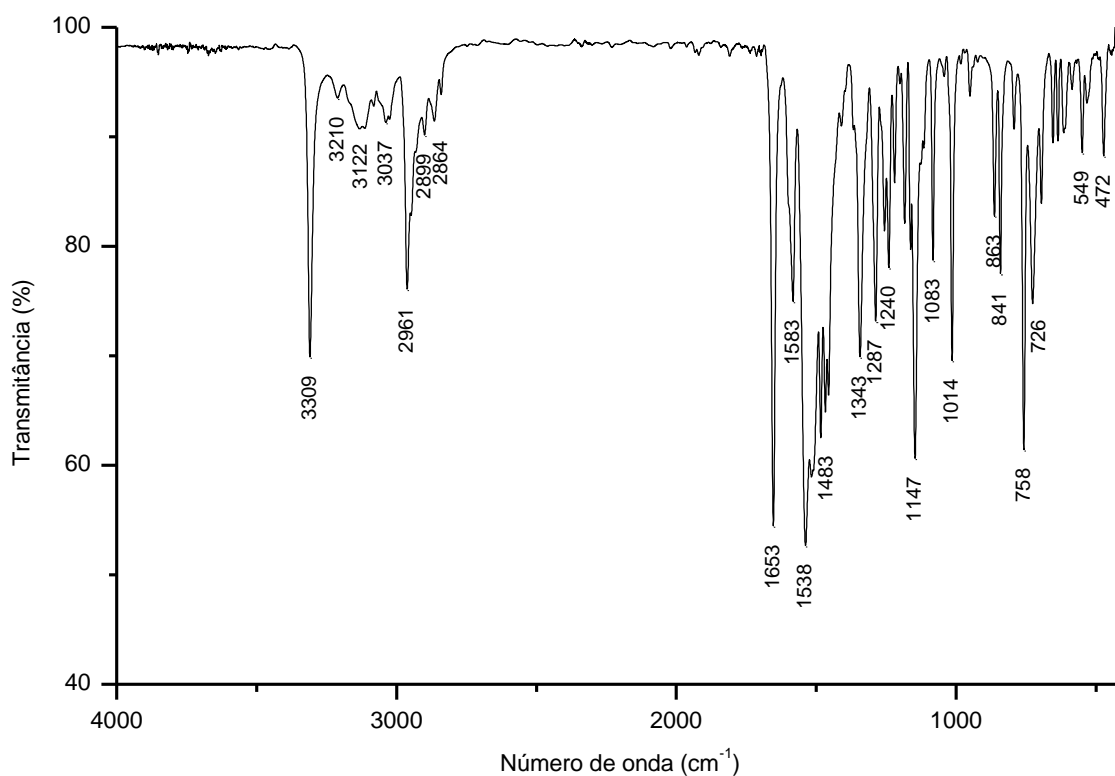
**Figura 293.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **83** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

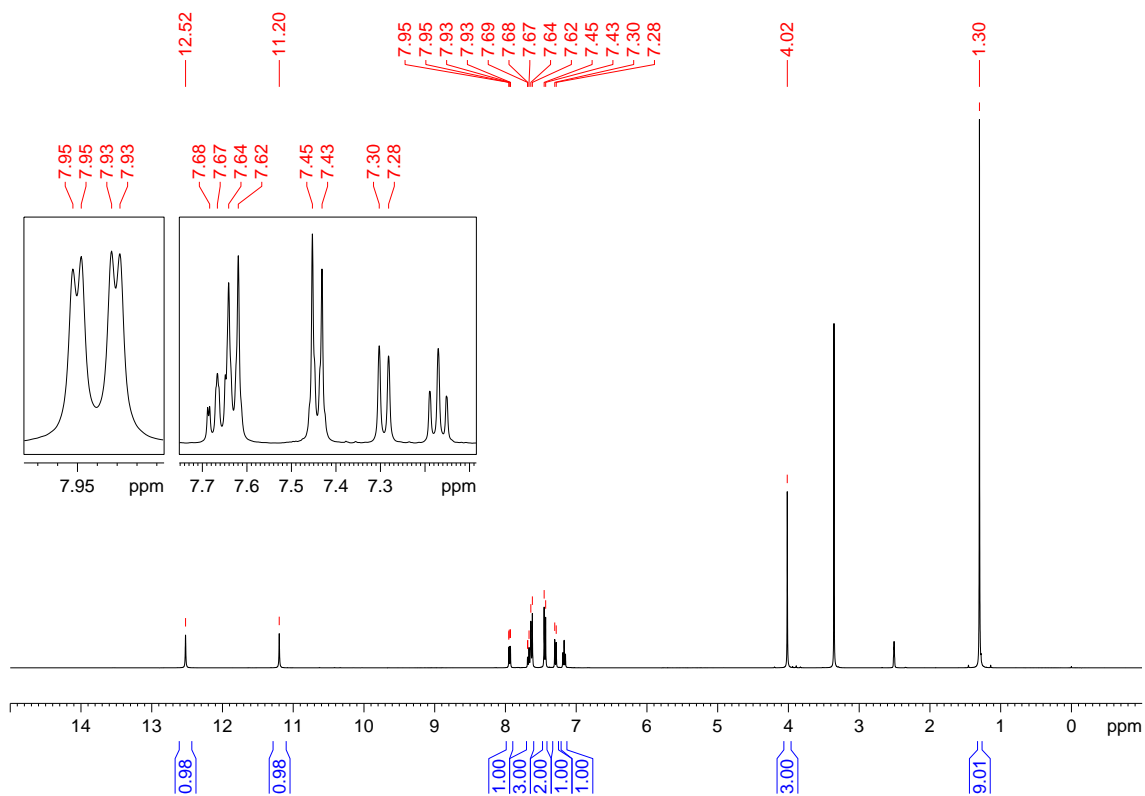


**Figura 294.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  do composto **83** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

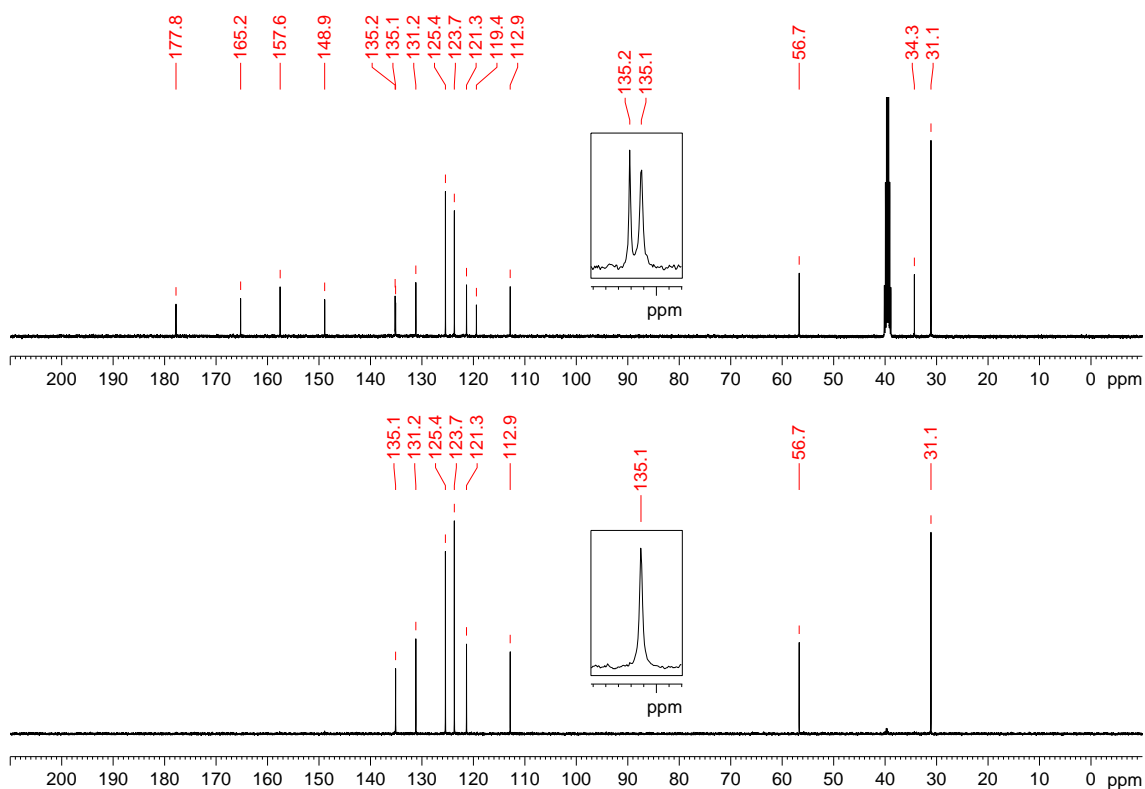
**(84) *N*-(2-metoxibenzoil)-*N'*-(4-tercbutilfenil)-tiourea:****(84)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 55%. PF: 103-104 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3309, 3210, 3122, 3037, 2961, 2899, 2864, 1653, 1583, 1538, 1483, 1343, 1287, 1240, 1147, 1083, 1014, 863, 841, 758, 726, 549, 472. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 1,30 (9H,  $3\times\text{CH}_3$ ), 4,02 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 7,17 (1H, d,  $^3J$  7,7 Hz), 7,29 (1H, d,  $^3J$  8,5 Hz), 7,44 (2H, d,  $^3J$  8,5 Hz), 7,61-7,69 (3H, m), 7,94 (1H, dd,  $^3J$  7,7 Hz,  $^4J$  1,7 Hz), 11,20 (1H, s,  $\text{CONH}$ ), 12,52 (1H, s,  $\text{CSNH}$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 31,1(+), 34,3 (C), 56,7(+), 112,9(+), 119,4 (C), 121,3(+), 123,7(+), 125,4(+), 131,2(+), 135,1(+), 135,2 (C), 148,9 (C), 157,6 (C), 165,2 (C=O), 177,8 (C=S).

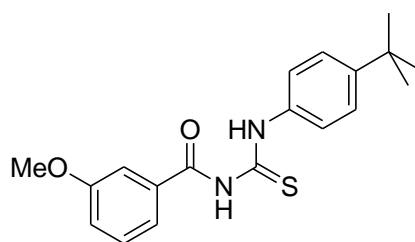
**Figura 295.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **84**.



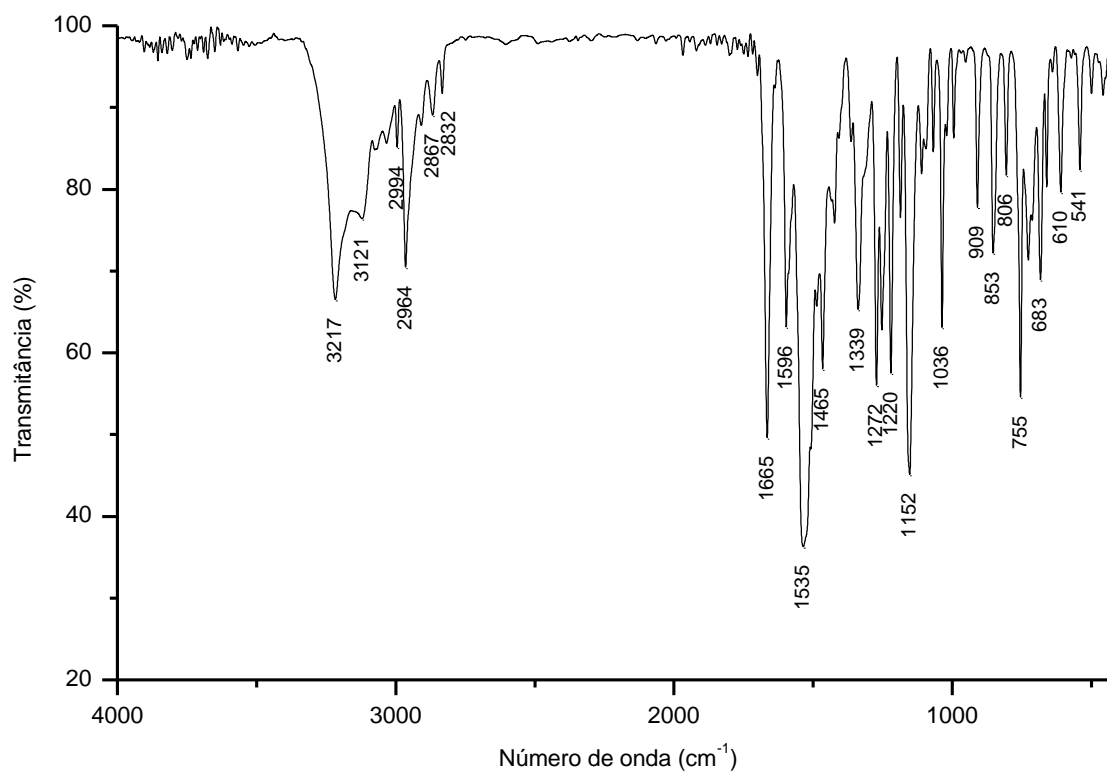
**Figura 296.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **84** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-d}_6$ ).

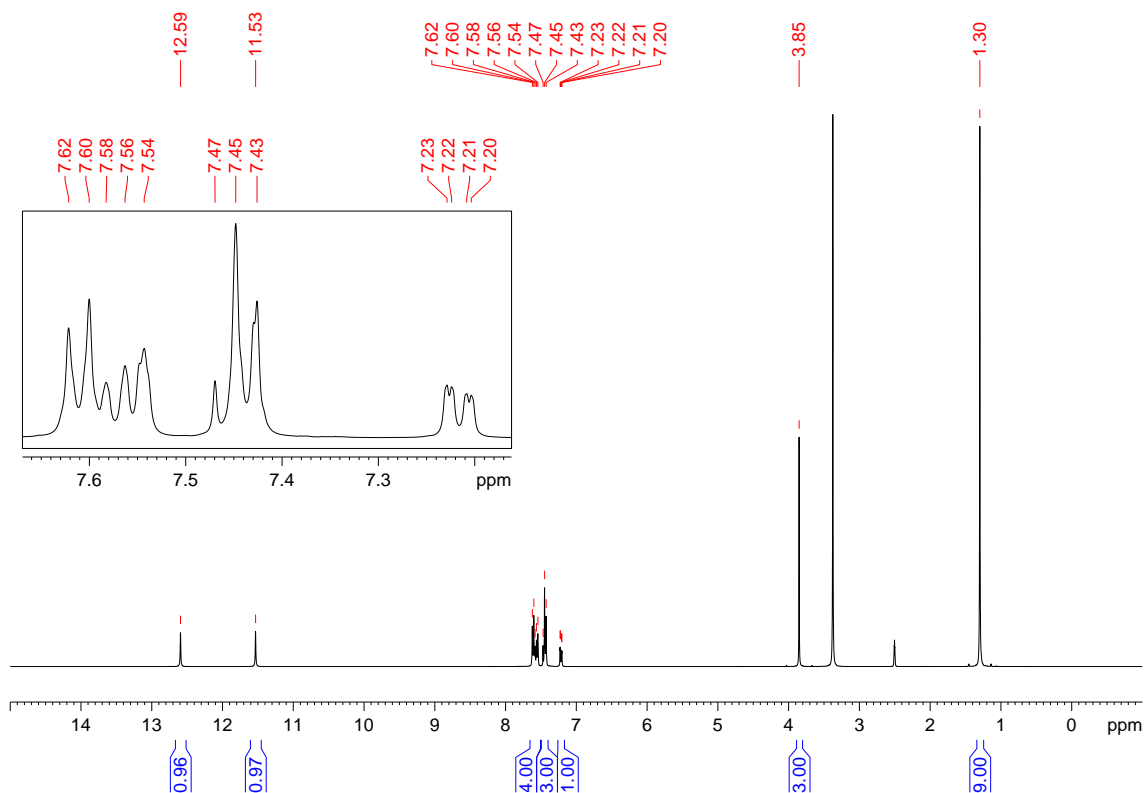


**Figura 297.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **84** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-d}_6$ ).

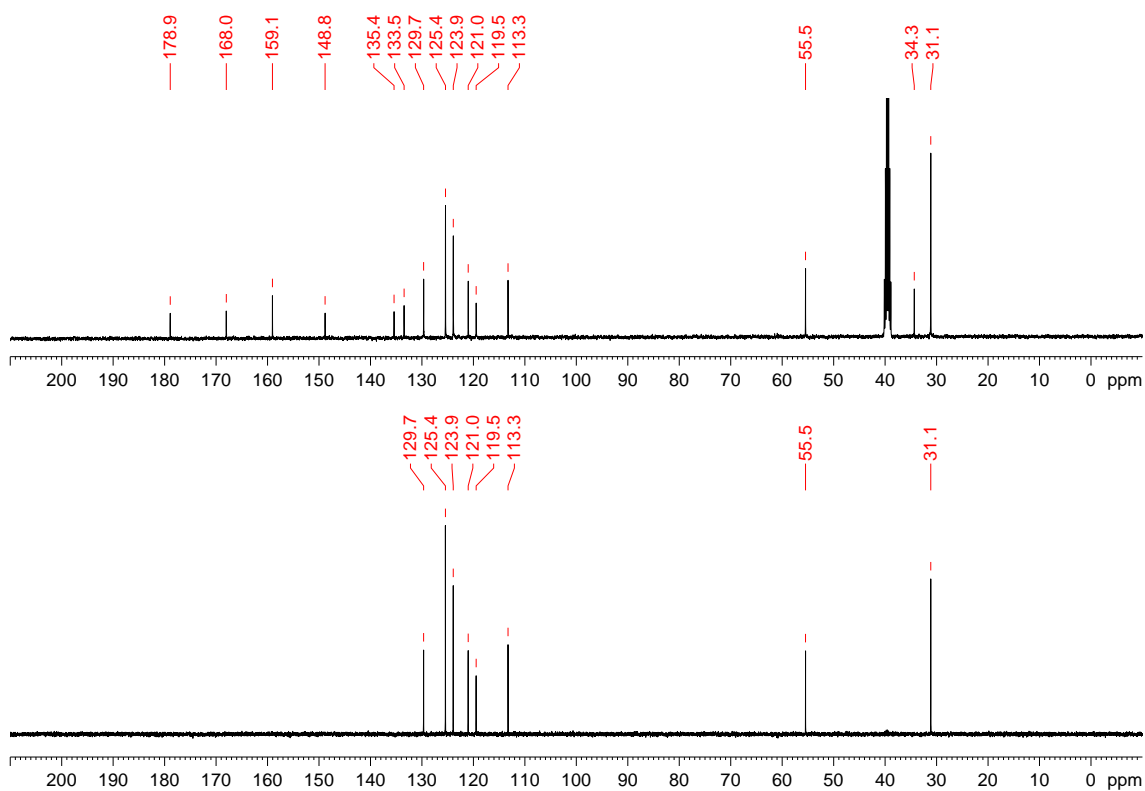
**(85) *N*-(3-metoxibenzoil)-*N'*-(4-tercbutilfenil)-tiourea:****(85)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 70%. PF: 145-146 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3217, 3121, 2964, 2867, 2832, 1665, 1596, 1535, 1465, 1339, 1272, 1220, 1152, 1036, 909, 853, 806, 755, 683, 610, 541. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 1,30 (9H,  $3 \times \text{CH}_3$ ), 3,85 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 7,22 (1H, dd,  $^3J$  8,3 Hz,  $^4J$  2,0 Hz), 7,42-7,47 (3H, m), 7,53-7,63 (4H, m), 11,53 (1H, s,  $\text{CONH}$ ), 12,59 (1H, s,  $\text{CSNH}$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 31,1(+) ( $3 \times \text{CH}_3$ ), 34,3 (C), 55,5(+) ( $\text{OCH}_3$ ), 113,3(+) (CH), 119,5(+) (CH), 121,0(+) (CH), 123,9(+) (CH), 125,4(+) (CH), 129,7(+) (CH), 133,5 (C), 135,4 (C), 148,8 (C), 159,1 (C), 168,0 (C=O), 178,9 (C=S).

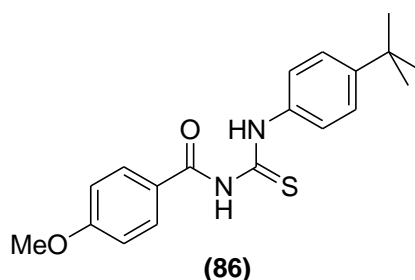
**Figura 298.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **85**.



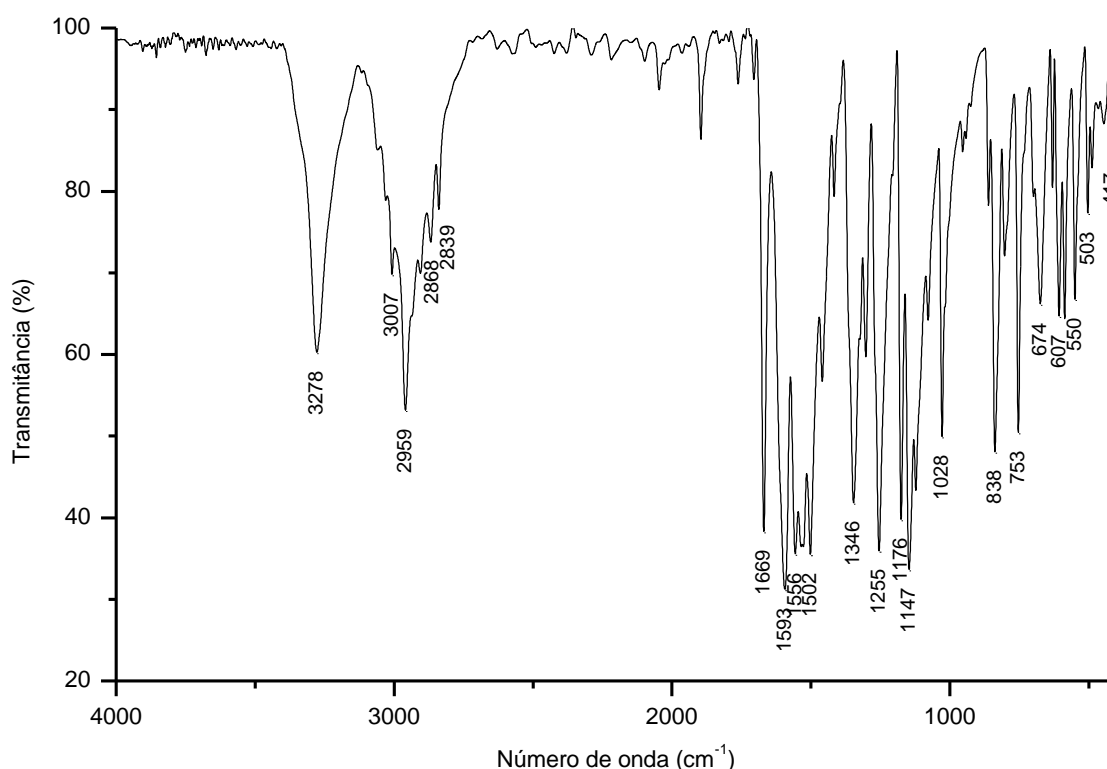
**Figura 299.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **85** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



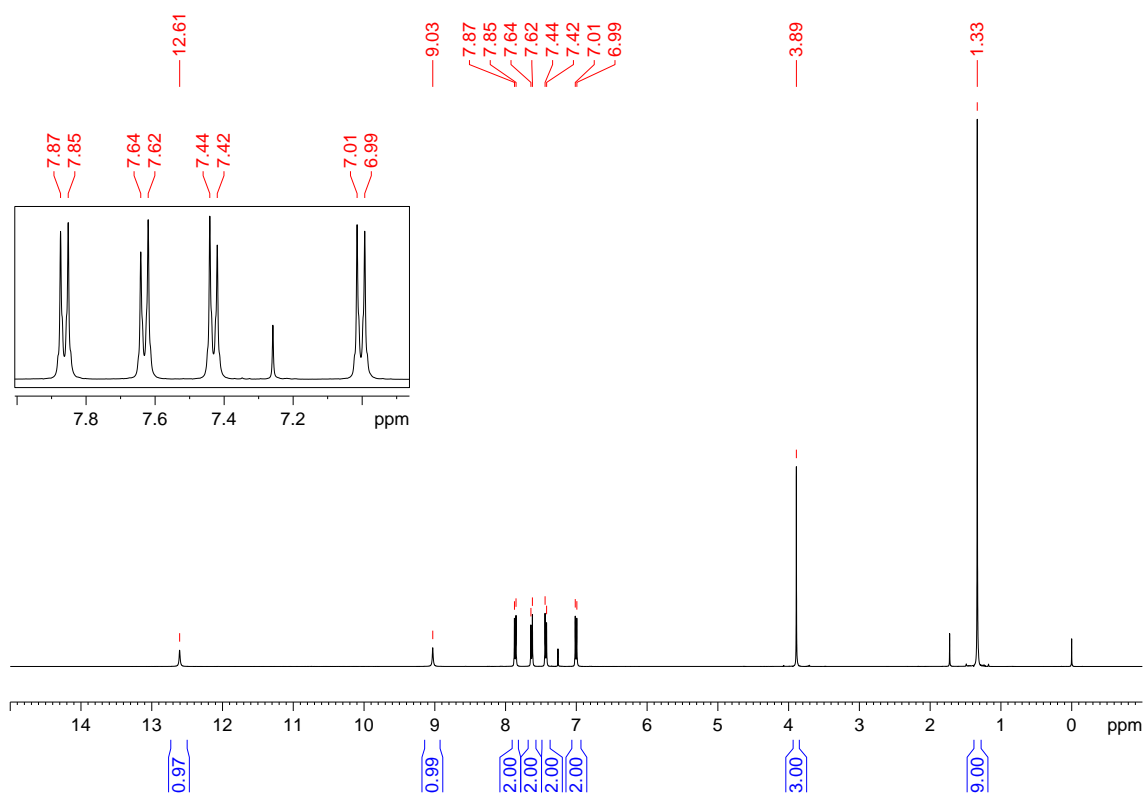
**Figura 300.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **85** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

**(86) *N*-(4-metoxibenzoil)-*N'*-(4-tercbutilfenil)-tiourea:**

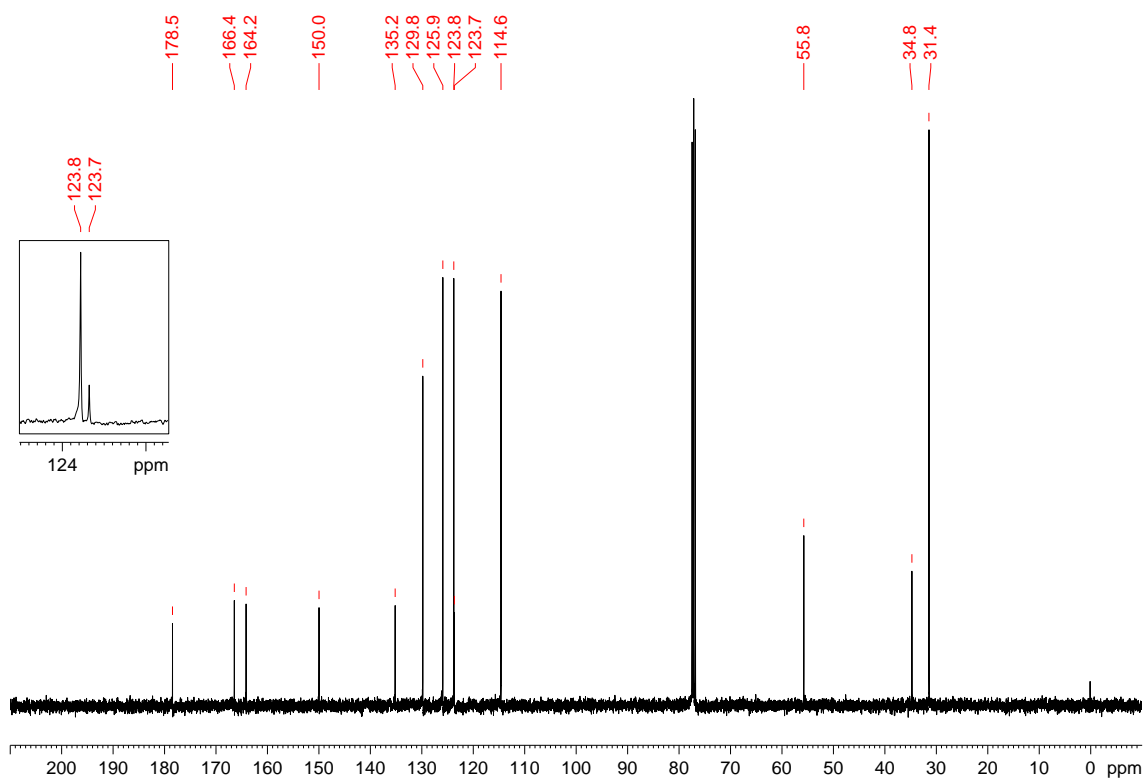
Recristalizado em etanol com rendimento de 63%. PF: 149-151 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3278, 3007, 2959, 2868, 2849, 1669, 1593, 1556, 1502, 1346, 1255, 1176, 1147, 1028, 838, 753, 674, 607, 550, 503, 417. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,33 (9H, s, 3x $\text{CH}_3$ ), 3,89 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 7,00 (2H, d,  $^3J$  8,9 Hz), 7,43 (2H, d,  $^3J$  8,6 Hz), 7,63 (2H, d,  $^3J$  8,6 Hz), 7,86 (2H, d,  $^3J$  8,9 Hz), 9,03 (1H, s, CONH), 12,61 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 31,4 (3x $\text{CH}_3$ ), 34,8, 55,8, 114,6, 123,7, 123,8, 125,9, 128,8, 135,2, 150,0, 164,2, 166,4 (C=O), 178,5 (C=S).



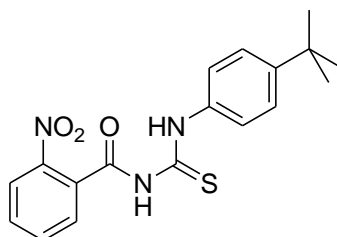
**Figura 301.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **86**.



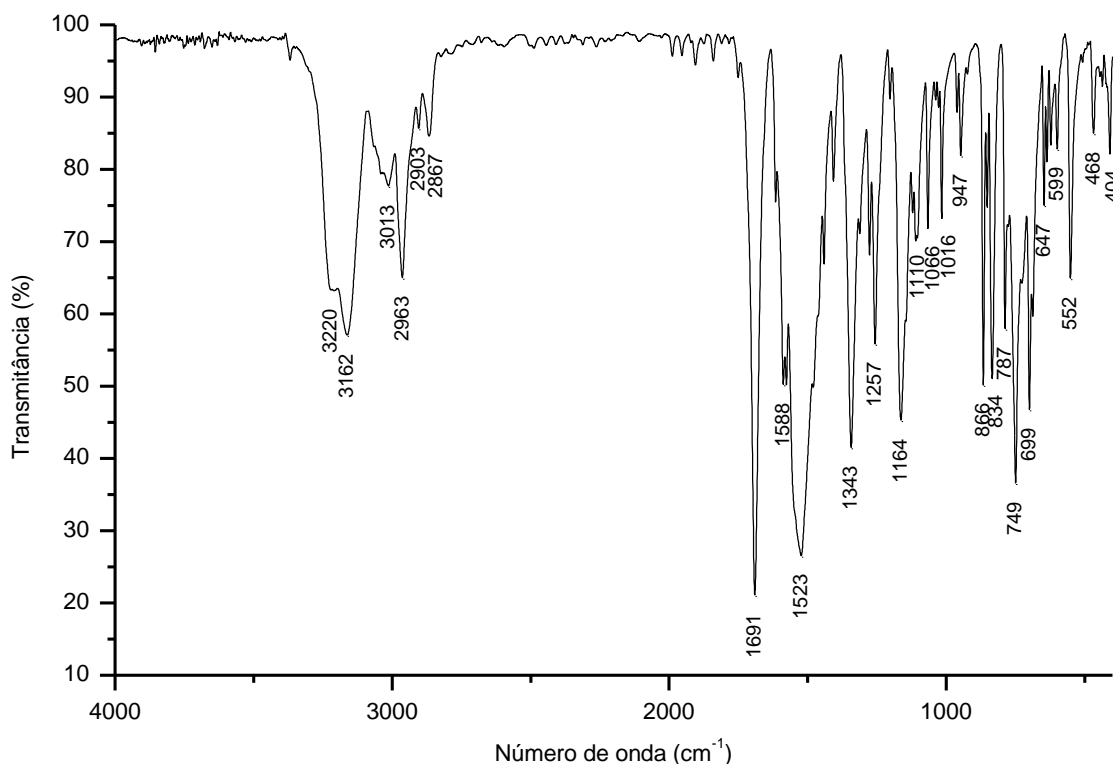
**Figura 302.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **86** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

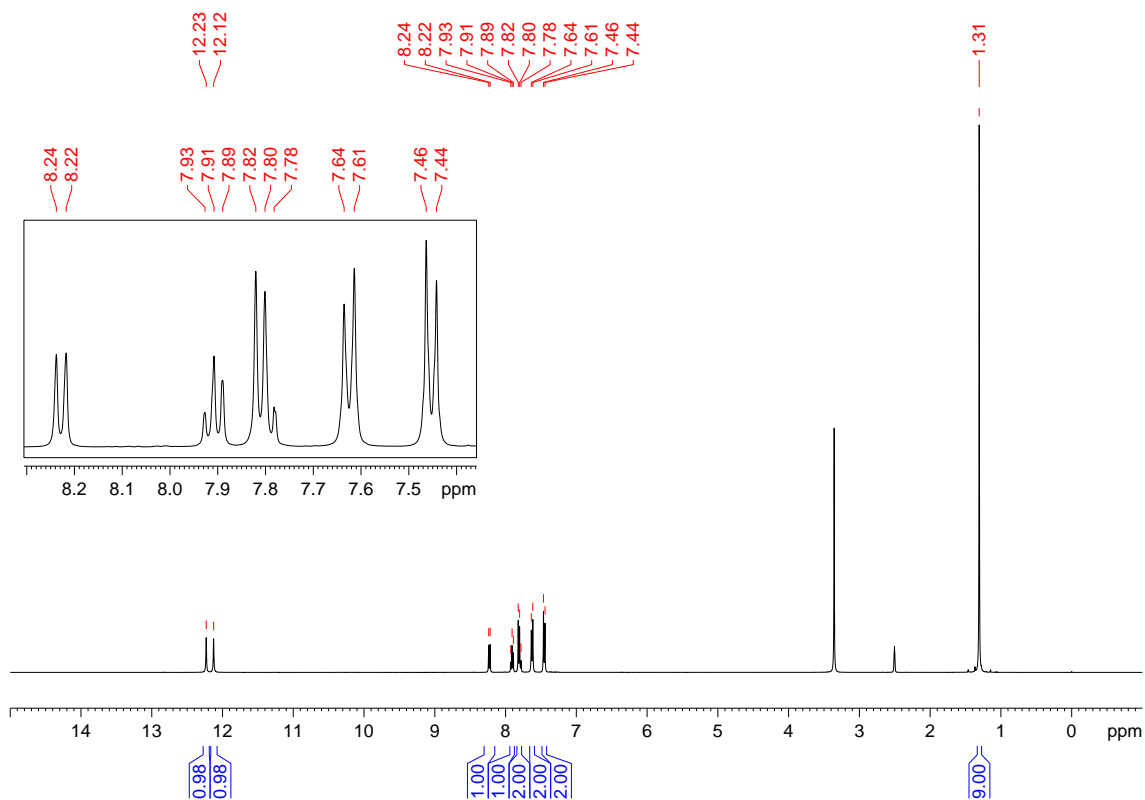


**Figura 303.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  do composto **86** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

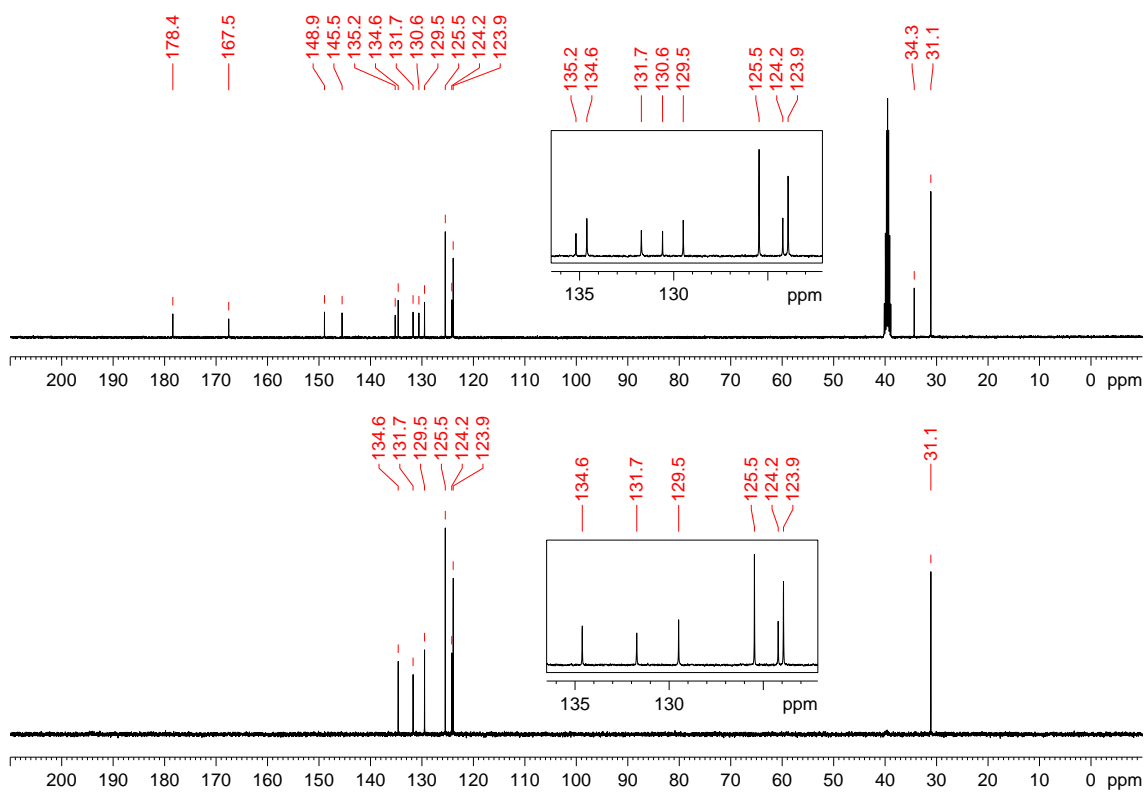
**(87) *N*-(2-nitrobenzoi)-*N'*-(4-tercbutilfenil)-tiourea:****(87)**

Recristalizado em etanol com rendimento de 49%. PF: 190-192 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3220, 3162, 3013, 2963, 2903, 2867, 1691, 1588, 1523, 1343, 1257, 1164, 1110, 1066, 1016, 947, 866, 834, 787, 749, 699, 647, 552, 468, 404. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 1,31 (9H,  $3\times\text{CH}_3$ ), 7,45 (2H, d,  $^3J$  8,7 Hz), 7,62 (2H, d,  $^3J$  8,7 Hz), 7,78-7,82 (2H, m), 7,91 (1H, t,  $^3J$  7,5 Hz), 8,23 (1H, d,  $^3J$  8,1 Hz), 12,12 (1H, s, CONH), 12,23 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 31,1(+)  
( $3\times\text{CH}_3$ ), 34,3 (C), 123,9(+)  
(CH), 124,2(+)  
(CH), 125,5(+)  
(CH), 129,5(+)  
(CH), 130,6  
(C), 131,7(+)  
(CH), 134,6(+)  
(CH), 135,2 (C), 145,5 (C), 148,9 (C), 167,5 (C=O), 178,4 (C=S).

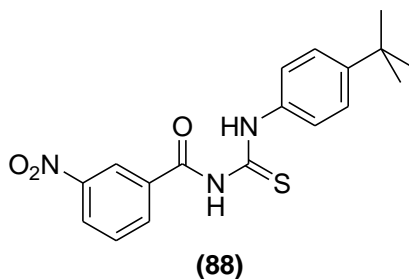
**Figura 304.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **87**.



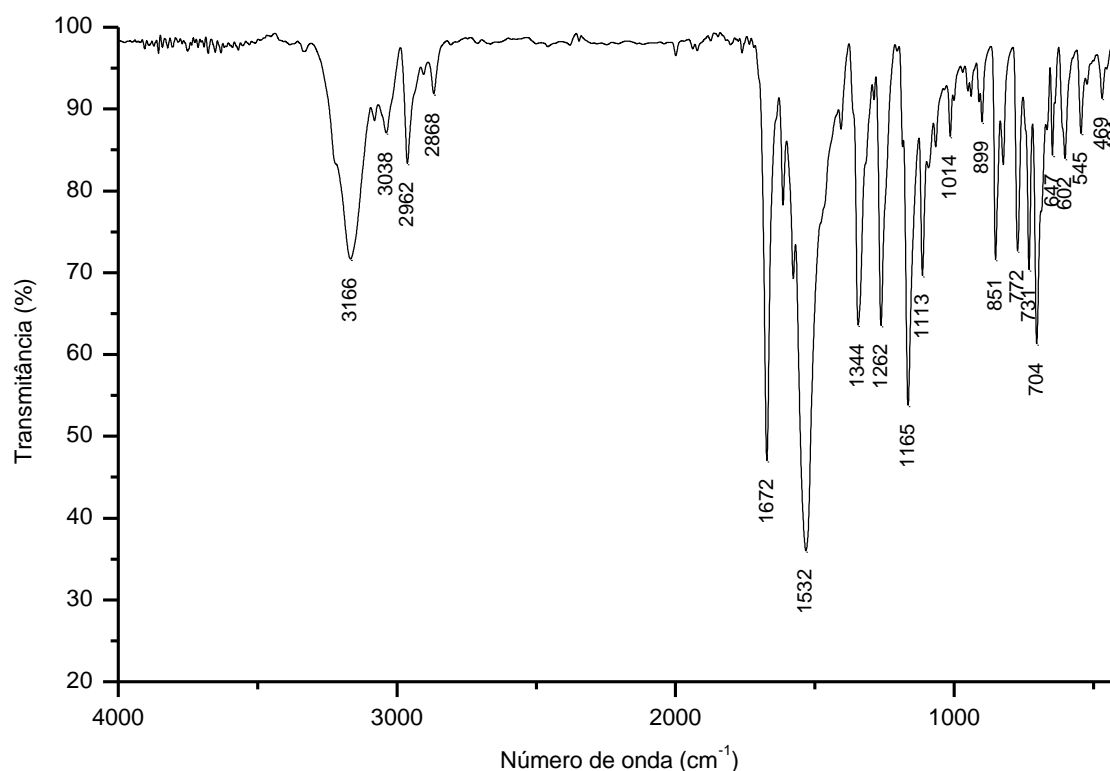
**Figura 305.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **87** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



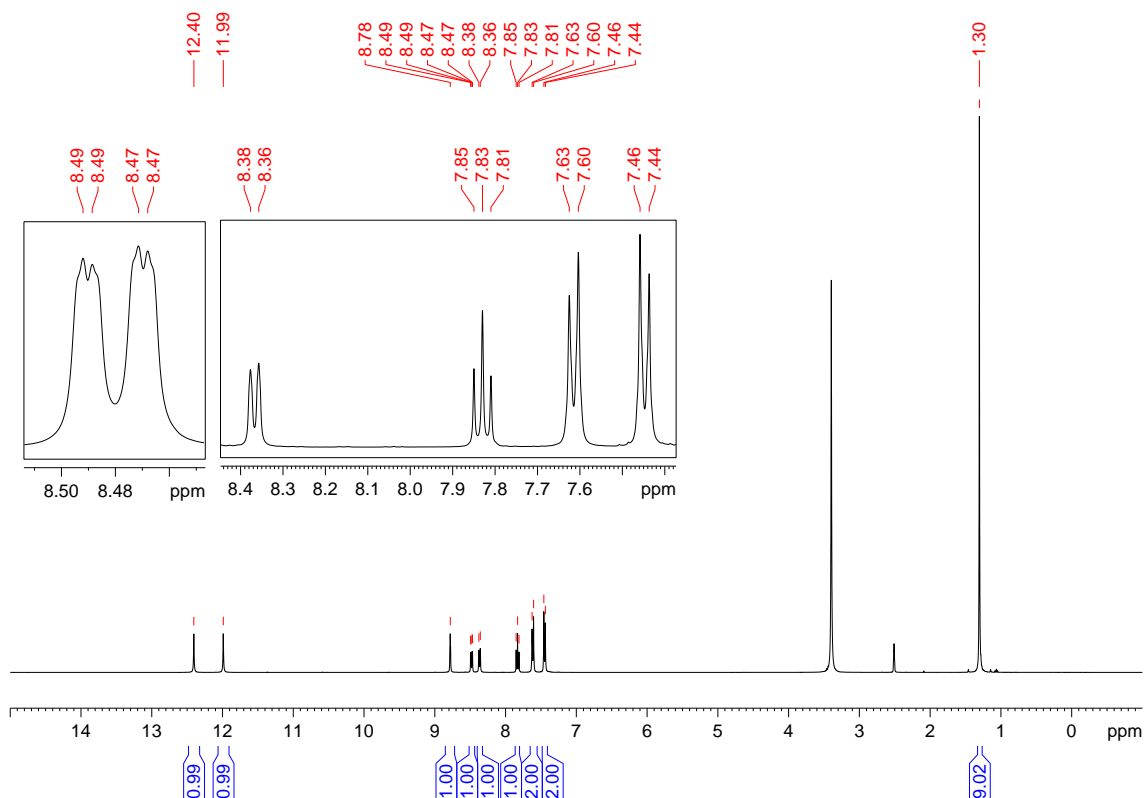
**Figura 306.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **87** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

**(88) *N*-(3-nitrobenzoi)-*N'*-(4-tercbutilfenil)-tiourea:**

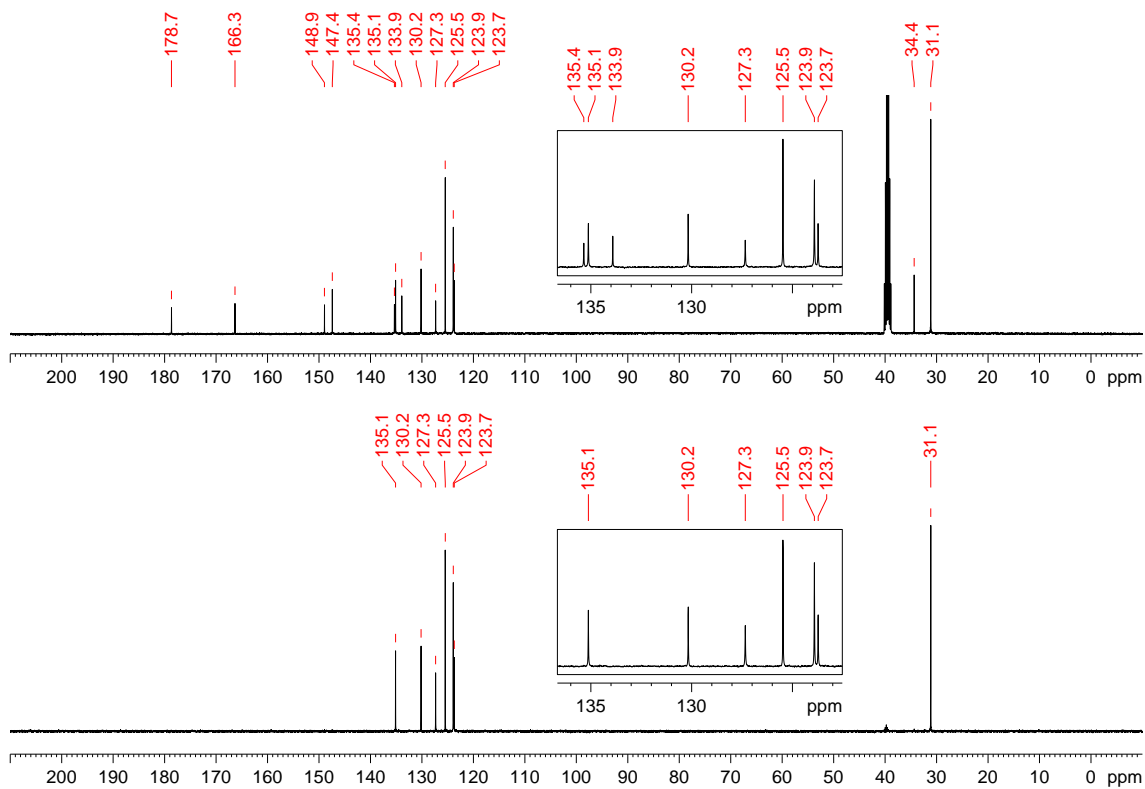
Recristalizado em etanol/acetona com rendimento de 72%. PF: 197-198 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3166, 3038, 2962, 2868, 1672, 1532, 1344, 1262, 1165, 1113, 1014, 899, 851, 772, 731, 704, 647, 602, 545, 469, 421. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 1,30 (9H,  $3\times\text{CH}_3$ ), 7,45 (2H, d,  $^3J$  8,5 Hz), 7,61 (2H, d,  $^3J$  8,5 Hz), 7,83 (1H, t,  $^3J$  8,0 Hz), 8,37 (1H, d,  $^3J$  8,0 Hz), 8,48 (1H, dd,  $^3J$  8,3 Hz,  $^4J$  1,4 Hz), 8,78 (1H, s), 11,99 (1H, s, CONH), 12,40 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 31,1(+) ( $3\times\text{CH}_3$ ), 34,4 (C), 123,7(+) (CH), 123,9(+) (CH), 125,5(+) (CH), 127,3(+) (CH), 130,2(+) (CH), 133,9 (C), 135,1(+) (CH), 135,4 (C), 147,4 (C), 148,9 (C), 166,3 (C=O), 178,7 (C=S).



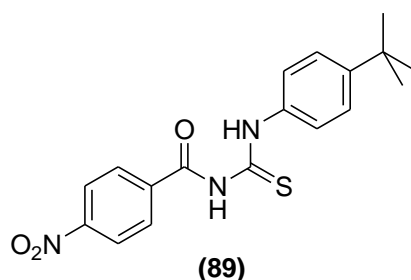
**Figura 307.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **88**.



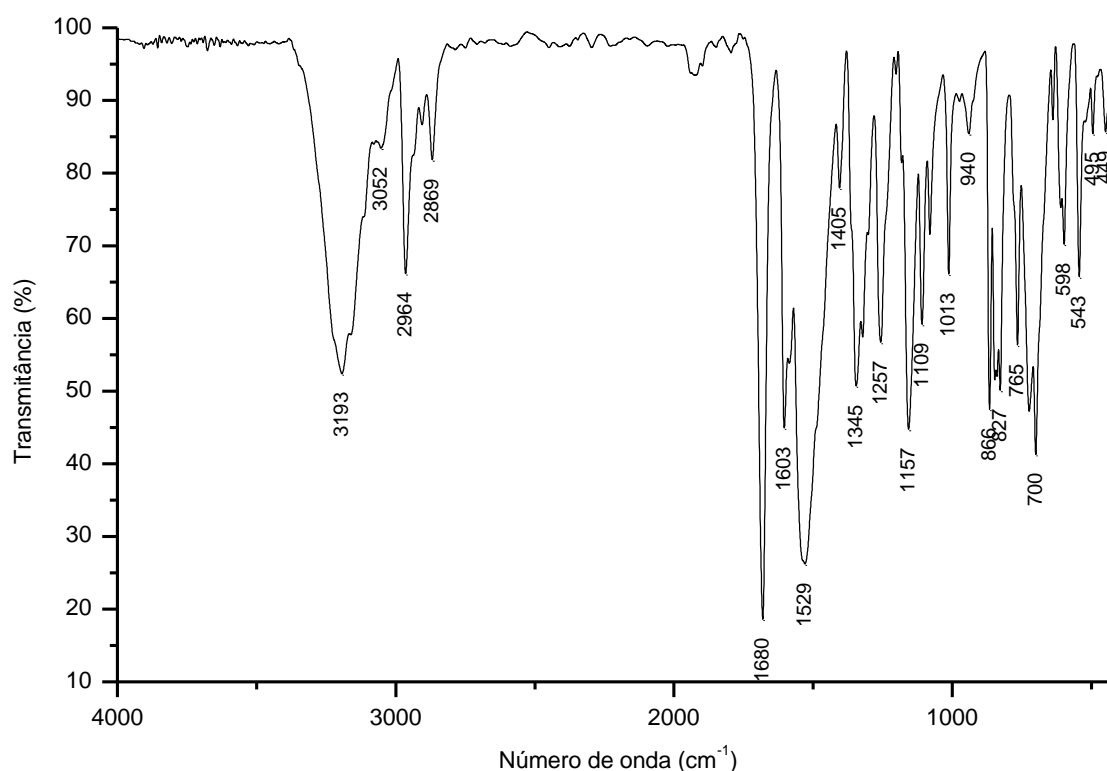
**Figura 308.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **88** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



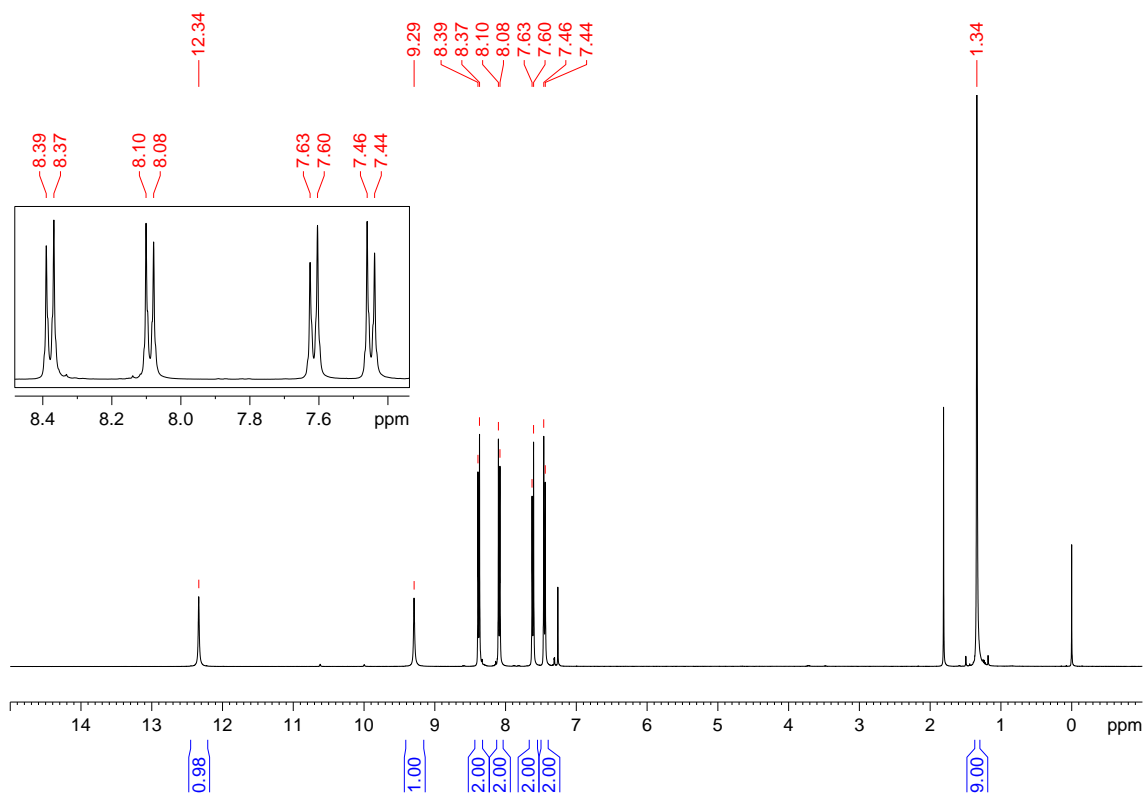
**Figura 309.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 do composto **88** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).

**(89) *N*-(4-nitrobenzoil)-*N'*-(4-tercbutilfenil)-tiourea:**

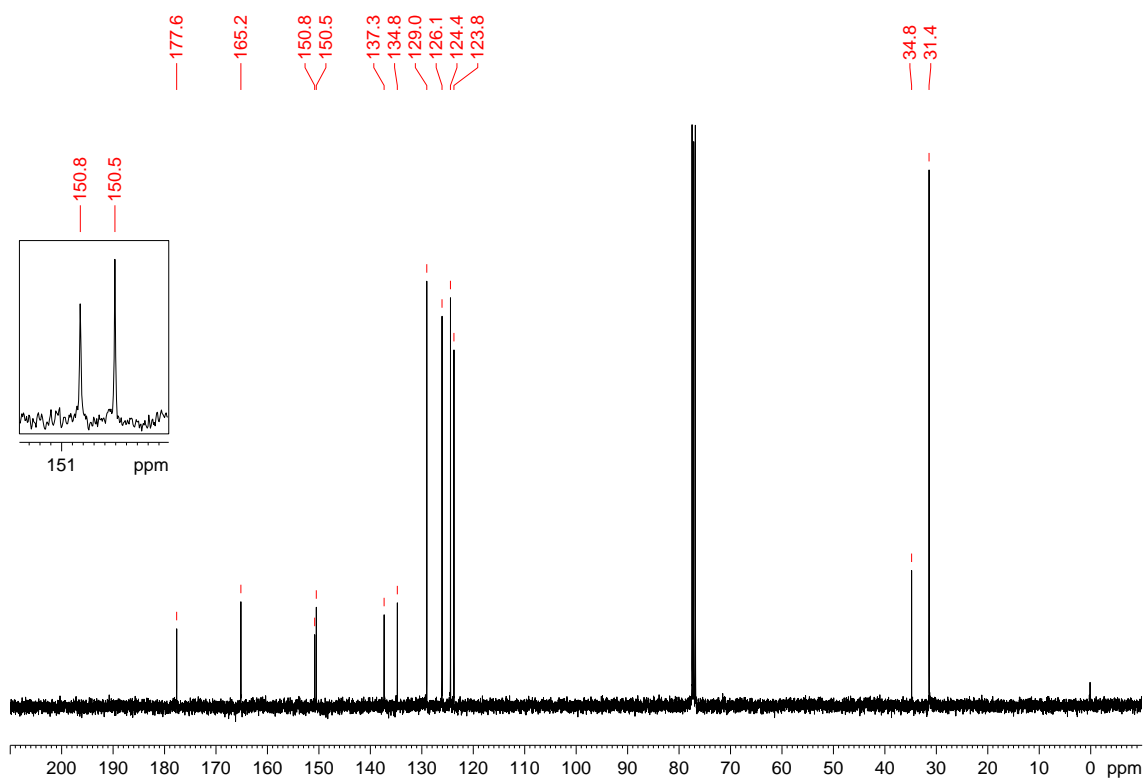
Recristalizado em etanol/acetona com rendimento de 60%. PF: 184-186 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3193, 3052, 2964, 2869, 1680, 1603, 1529, 1405, 1345, 1257, 1157, 1109, 1013, 940, 866, 827, 765, 700, 598, 543, 495, 449. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,34 (9H,  $3\times\text{CH}_3$ ), 7,45 (2H, d,  $^3J$  8,6 Hz), 7,61 (2H, d,  $^3J$  8,6 Hz), 8,09 (2H, d,  $^3J$  8,8 Hz), 8,38 (2H, d,  $^3J$  8,8 Hz), 9,29 (1H, s, CONH), 12,34 (1H, s, CSNH). RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 31,4 ( $3\times\text{CH}_3$ ), 34,8 (C), 123,8, 124,4, 126,1, 129,0, 134,8, 137,3, 150,5, 150,8, 165,2 (C=O), 177,6 (C=S).



**Figura 310.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **89**.



**Figura 311.** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto **89** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 312.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  do composto **89** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).