

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Exatas  
Departamento de Química

Breno Germano de Freitas Oliveira

*Síntese de heterociclos derivados de aminoácidos e anilinas aromáticas  
como inibidores de ureases*

**Belo Horizonte**  
**2022**

UFMG/ICEX/DQ.1.501

T. 685

BRENO GERMANO DE FREITAS OLIVEIRA

*Síntese de heterociclos derivados de aminoácidos e anilinas aromáticas como  
inibidores de ureases*

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências - Química.

Orientador: Ângelo de Fátima

Coorientadora: Luzia Valentina Modolo

**Belo Horizonte**

**2022**

Ficha Catalográfica

0482s Oliveira, Breno Germano de Freitas.  
2022 Síntese de heterociclos derivados de aminoácidos e  
T anilinas aromáticas como inibidores de ureases  
[manuscrito] / Breno Germano de Freitas Oliveira.  
2022.

139 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Ângelo de Fátima.

Coorientadora: Luzia Valentina Modolo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas  
Gerais - Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses. 2. Fertilizantes  
nitrogenados - Teses. 3. Ureia como fertilizante -  
Teses. 4. Urease - Inibidores - Teses. 5. Aminoácidos  
- Teses. 6. Anilina - Teses. I. Fátima, Ângelo de,  
Orientador. II. Modolo, Luzia Valentina,  
Coorientadora. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

## **FOLHA**

### **"Síntese de Heterociclos Derivados de Aminoácidos e Anilinas Aromáticas como Inibidores de Ureases"**

**Breno Germano de Freitas Oliveira**

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Ângelo de  
Fátima - Orientador  
UFMG

Profa. Luzia Valentina  
Modolo - Coorientadora  
UFMG/ICB

Prof. Diogo  
Montes  
Vidal UFMG

Pesquisador Marcelo  
Curitiba Espindula  
EMBRAPA  
RONDÔNIA

Prof. Sergio  
Antonio  
Fernandes  
UFV

Prof. Tiago Antônio  
da Silva Brandão  
UFMG

Belo Horizonte, 24 de junho de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Angelo de Fatima, Professor do Magistério Superior**, em 24/06/2022, às 18:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Diogo Montes Vidal, Professor do Magistério Superior**, em 24/06/2022, às 18:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tiago Antonio da Silva Brandao, Professor do Magistério Superior**, em 24/06/2022, às 18:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sérgio Antônio Fernandes, Usuário Externo**, em 27/06/2022, às 11:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Curitiba Espindula, Usuário Externo**, em 28/06/2022, às 12:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luzia Valentina Modolo, Professora do Magistério Superior**, em 30/06/2022, às 10:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1538697** e o código CRC **A7DF3B4A**.

## **Agradecimentos**

Sou eternamente grato a Deus pelo dom da vida, pelas lições e caminhadas abençoadas agradeço a Nossa Senhora da Conceição por estar sempre ao meu lado. Aos meus pais, Luiz e Beatriz, agradeço o sorriso, a paciência, a compreensão e todo apoio por essa etapa que passou. Meu irmão Bruno, pela amizade e descontrações em momentos tensos. A minha esposa pelo companheirismo e paciência nessa rotina de dedicação exclusiva. A família, sou muito grato por cada incentivo e orientação, pela preocupação para que estivesse sempre andando pelo caminho correto e pela paciência e compreensão nos momentos de minha ausência.

Aos amigos do GEQOB eu agradeço por tudo, das consultorias até a amizade fora do local de trabalho.

Ao professor Ângelo de Fátima, pela atenção e orientação em garantir que eu pudesse explorar ao máximo todo o trabalho desenvolvido estando sempre disposto a disponibilizar tempo para orientação. Além da orientação agradeço a amizade e a preocupação com o futuro de seus “filhos”. A professora Luzia Modolo, agradeço a orientação, o tempo dedicado e os questionamentos. A professora e amiga Rosemeire Brondi por estar ali todo momento.

Aos amigos do Departamento, obrigado por todos os momentos. Obrigado pela paciência, pelo sorriso, pelo abraço, pela mão que sempre se estendia quando eu precisava e principalmente por escutarem todas minhas piadas. Esta caminhada não seria a mesma sem vocês. Tudo que conquistei tem uma boa parcela de mérito seus. Em especial ao Erico pela ajuda no presente trabalho e pela companhia em todo dia de marmitta.

A todos que de alguma maneira contribuíram para o trabalho.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

## Resumo

Ureases são enzimas hidrolíticas dependentes de níquel, que impactam negativamente tanto a produção agrícola quanto a saúde humana e animal. Estas enzimas hidrolisam a ureia - o fertilizante nitrogenado mais utilizado no mundo - levando à formação de amônia e gás carbônico que são gases associados aos efeitos estufa e chuva ácida. Ureia é também utilizada por bactérias ureolíticas como uma estratégia de sobrevivência destes microrganismos em ambientes extremamente hostis - como por exemplo o estômago (pH 1,5-2,0). Nestes contextos, o desenvolvimento de novos inibidores de urease podem eventualmente mitigar a produção de gases nocivos ao ambiente favorecendo a permanência de nitrogênio no solo para a nutrição vegetal, além de combater microrganismos patogênicos para humanos e animais. Este trabalho teve como objetivo a obtenção e avaliação anti-ureolítica de heterocíclicos derivados de aminoácidos e de anilinas aromáticas em testes *in vitro* frente a enzima urease isolada de *Canavalia ensiformis* e a elaboração de um experimento de quantificação da amônia, volatilizada a partir da ureia, em um sistema de fluxo contínuo de ar em câmara fechada. A motivação da escolha dos derivados de aminoácidos sob forma de tioidantoínas, deu-se pela reconhecida atividade antibacteriana desses compostos e a facilidade de obtenção, não exigindo procedimentos complexos de purificação. Foram sintetizadas e avaliadas treze tioidantoínas derivadas da valina (Val), triptofano (Trp) e treonina (Thr), com rendimentos que variaram de 48 a 94%. Em relação à atividade anti-ureolítica, além dos derivados de aminoácidos foram testados os aminoácidos precursores: (i) L-valina, D-valina, L/D-valina (ii) L-triptofano, D-triptofano, L/D-triptofano (iii) L-Treonina. Todos os aminoácidos e sete dos seus derivados apresentaram valores de IC<sub>50</sub> comparáveis ao inibidor de referência, hidroxiiureia (HU, IC<sub>50</sub> = 559 µM), destacando-se as tioidantoínas derivadas da valina que foram significativamente mais potentes (IC<sub>50</sub> = 332, 433, 448 µM). Já a motivação da escolha dos derivados de anilina sob a forma de híbridos benzimidazóis-benzoiltioureias e benzotiazóis-benzoiltioureias deu-se pela reconhecida capacidade de ambas as classes em inibir as enzimas ureases. Foi estabelecido assim, uma rota sintética viável para a síntese do primeiro precursor, 2-aminobenzotiazol, com rendimento de 88%. Dentre os produtos propostos, os híbridos benzotiazol-benzoiltioureias (HBTs) com substituintes na posição *meta* e *para* foram obtidos com rendimentos que variaram de 47 a 78%. A maioria dos compostos sintetizados apresentaram valores de IC<sub>50</sub> comparáveis ao inibidor de referência, HU.

**Palavras chaves:** fertilizantes, tioidantóinas, benzotiazóis, benzoiltioureas, volatilização, agronegócio.



## Abstract

Ureases are nickel-dependent hydrolytic enzymes, which negatively impact both agricultural production and human and animal health. These enzymes hydrolyze urea – the most widely used nitrogen fertilizer in the world – leading to the formation of ammonia and carbon dioxide, which are gases associated with greenhouse effects and acid rain. Urea is also used by ureolytic bacteria as a survival strategy for these microorganisms in extremely hostile environments – such as the stomach (pH 1.5-2.0). In these contexts, the development of new urease inhibitors may eventually mitigate the production of harmful gases to the environment, in addition to combating pathogenic microorganisms for humans and animals. This work aimed to obtain and evaluate anti-ureolytic heterocyclics derived from amino acids and aromatic anilines *in vitro* tests against the urease enzyme isolated from *Canavalia ensiformis*. The motivation for choosing amino acid derivatives in the form of thioamides was due to the recognized antibacterial activity of these compounds and the ease of obtaining them, not requiring complex purification procedures. Thirteen thioamides derived from valine (Val), tryptophan (Trp) and threonine (Thr) were synthesized and evaluated, with yields ranging from 48 to 94%. In relation to anti-ureolytic activity, in addition to amino acid derivatives, precursor amino acids were tested: (i) L-valine, D-valine, L/D-valine (ii) L-tryptophan, D-tryptophan, L/D- tryptophan (iii) L-Threonine. All amino acids and seven of their derivatives showed  $IC_{50}$  values comparable to the reference inhibitor, hydroxyurea (HU,  $IC_{50} = 559 \mu\text{M}$ ), with the valine-derived thioamides being significantly more potent ( $IC_{50} = 332, 433, 448 \mu\text{M}$ ). The motivation for choosing aniline derivatives in the form of benzimidazole-benzoylthioureas and benzothiazol-benzoylthioureas hybrids was given by the recognized ability of both classes to inhibit urease enzymes. Thus, a viable synthetic route for the synthesis of the first precursor, 2-aminobenzothiazole, with 88% yield was established. Among the proposed products, only the benzothiazol-benzoylthioureas (HBTs) hybrids with meta and para substituents were obtained with yields ranging from 47 to 78%. Most of the synthesized compounds had  $IC_{50}$  values comparable to the reference inhibitor, hydroxyurea. This work also aimed to develop an experiment to quantify ammonia, volatilized from urea, in a continuous air flow system in a closed chamber, in which one compound of each class synthesized in this work was evaluated.

**Keywords:** fertilizers, amino acids, thiodantoin, benzothiazoles, benzoylthioureas, volatilization, agribusiness.

## Lista de figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. (A) Estrutura do oligômero $(\alpha\beta\gamma)_3$ da urease de <i>B. pasteurii</i> . (B) Esquema de fita do oligômero $(\alpha\beta\gamma)_3$ da urease de <i>K. aerogenes</i> . (C) Estrutura do oligômero $[(\alpha\beta)_3]_4$ da urease de <i>H. pylori</i> . (D) Estrutura do oligômero $[(\alpha)_3]_2$ da urease de <i>C. ensiformis</i> . Os átomos de Níquel são apresentados como esferas vermelhas. Reproduzido com permissão de Copyright (2014) American Chemical Society <sup>13</sup> ..... | 22 |
| Figura 2. Consumo nacional de fertilizantes nitrogenados no ano de 2017 .....   | 23 |
| Figura 3. (a) Micrografia eletrônica de varredura de <i>H. pylori</i> . (b) Representação esquemática mostrando o canal de entrada da ureia e a produção de amônia, que neutraliza o ambiente ácido, em amarelo, favorecendo o aumento de pH no ambiente ao redor da bactéria (azul claro). Reproduzido com permissão da referência (2001) Nature Reviews Molecular Cell Biology <sup>35</sup> .....  | 26 |
| Figura 4. Representação de estruturas químicas de reconhecidos inibidores de urease .....   | 29 |
| Figura 5. Representação de estruturas químicas dos melhores inibidores de urease até o momento .....  | 31 |
| Figura 6. Representação de estruturas químicas de reconhecidos inibidores de urease derivados do ácido hidroxâmico .....  | 36 |
| Figura 7. Representação de estruturas químicas de reconhecidos inibidores de urease derivados de aminoácidos.....   | 37 |
| Figura 8. Representação do núcleo base para tioidantoínas e hidantoínas.....  | 38 |
| Figura 9. Obtenção de tioidantoína por metodologia proposta por Klason <i>et al.</i> .....  | 38 |
| Figura 10. Obtenção de tioidantoína por metodologia proposta por Komatsu <i>et al.</i> ,.....   | 38 |
| Figura 11. Representação de hidantoínas utilizadas como fármacos .....  | 39 |
| Figura 12. Obtenção de tioidantoína por metodologia proposta por Wang <i>et al.</i> .....   | 39 |
| Figura 13. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) do <b>110ac</b> .....  | 53 |
| Figura 14. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (abaixo; 100 MHz; DMSO- $d_6$ ) e DEPT 135 (acima) do <b>110ac</b> .....  | 54 |
| Figura 15. Espectro na região do IV (em KBr, $\text{cm}^{-1}$ ) do <b>110ac</b> .....   | 55 |
| Figura 16. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) do <b>110</b> .....  | 55 |
| Figura 17. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (abaixo; 100 MHz; DMSO- $d_6$ ) e DEPT 135 (acima) do <b>110</b> .....  | 56 |
| Figura 18. Espectro na região do IV (em KBr, $\text{cm}^{-1}$ ) do <b>110</b> .....   | 57 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 19. Porcentagem de inibição da enzima urease, a uma concentração de 500 $\mu\text{M}$ dos inibidores e seus respectivos aminoácidos precursores.....   | 58 |
| Figura 20. Filtro de linha utilizados para purificar ar comprimido .....  | 61 |
| Figura 21. Vacuômetro e manômetro utilizados na montagem do experimento.....  | 61 |
| Figura 22. Montagem das unidades experimentais, câmara de incubação e unidade coletora .....  | 62 |
| Figura 23. Esqueleto do sistema de volatilização com as respectivas câmaras, conexões e unidades coletoras .....  | 62 |
| Figura 24. Sistema de volatilização completo. a. conjunto de filtros, b. recipiente que mantém a pressão constante, c. válvulas de fluxo pré sistema, d. câmaras de incubação, e. unidades coletoras, f. fluxímetro. .... | 64 |
| Figura 25. Ilustração representativa da coloração da mistura reagente em função da variação do valor de pH .....  | 65 |
| Figura 26. Taxa da perda de nitrogênio volatilizado por nitrogênio aplicado.....  | 66 |
| Figura 27. Perda de nitrogênio sob a forma de amônia de 24 a 48h.....   | 67 |
| Figura 28. Perda acumulada de nitrogênio por tempo a partir da ureia .....  | 67 |
| Figura 29. Representação de estruturas químicas de reconhecidos inibidores de urease derivados de benzoimidazóis e benzoitiazóis.....   | 70 |
| Figura 30. Representação de estruturas químicas de reconhecidos inibidores de urease derivados de tioureia .....  | 71 |
| Figura 31. Representação de benzoiltioureias sintetizadas por Khan <i>et al.</i> <sup>98</sup> .....  | 71 |
| Figura 32. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do 2-aminobenzotiazol ...  | 87 |
| Figura 33. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (abaixo; 100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$ ) e DEPT 135 (acima) do 2-aminobenzotiazol .....  | 88 |
| Figura 34. Espectro na região do IV (em $\text{KBr}$ , $\text{cm}^{-1}$ ) do 2-aminobenzotiazol.....  | 89 |
| Figura 35. Representação das propriedades eletrostáticas do 2-aminobenzotiazol (ABZT) e sua forma protonada <sup>112</sup> .....  | 90 |
| Figura 36. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol (HBT-Bz) .....  | 92 |
| Figura 37. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (abaixo; 100 MHz; $\text{CDCl}_3$ e DEPT 135 (acima) do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol (HBT-Bz).....   | 93 |
| Figura 38. Seções expandidas do mapa de contornos HSQC do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol (HBT-Bz) .....  | 94 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 39. Seções expandidas do mapa de contornos HMBC do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol.....   | 95  |
| Figura 40. Espectro na região do IV (em KBr, $\text{cm}^{-1}$ ) do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol.....  | 97  |
| Figura 41. Porcentagem de inibição da enzima urease, a uma concentração de 100 $\mu\text{M}$ dos inibidores e hidroxiiureia como inibidor de referência..... | 101 |
| Figura 42. Taxa da perda de nitrogênio volatilizado por nitrogênio aplicado.....   | 103 |
| Figura 43. Perda de nitrogênio sob a forma de amônia de 24 a 48h.....  | 104 |
| Figura 44. Perda acumulada de nitrogênio por tempo a partir da ureia.....  | 104 |
| Figura 45. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do <b>110ac</b> .....   | 111 |
| Figura 46. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (abaixo; 100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$ ) e DEPT 135 (acima) do <b>110ac</b> .....                                 | 111 |
| Figura 47. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do <b>106ac</b> .....   | 112 |
| Figura 48. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (abaixo; 100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$ ) e subespectro DEPT 135 (acima) do <b>106ac</b> .....                     | 112 |
| Figura 49. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do <b>116</b> .....   | 113 |
| Figura 50. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (abaixo; 100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$ ) e DEPT 135 (acima) do <b>116</b> .....                                   | 113 |
| Figura 51. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do <b>110</b> .....   | 114 |
| Figura 52. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (abaixo; 100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$ ) e DEPT 135 (acima) do <b>110</b> .....                                   | 114 |
| Figura 53. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do <b>106</b> .....   | 115 |
| Figura 54. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (abaixo; 100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$ ) e DEPT 135 (acima) do <b>106</b> .....                                   | 115 |
| Figura 55. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do <b>IABZT</b> .....   | 116 |
| Figura 56. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (abaixo; 100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$ ) e DEPT 135 (acima) do <b>IABZT</b> .....                                 | 116 |
| Figura 57. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do subproduto.....  | 117 |
| Figura 58. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (abaixo; 100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$ ) e DEPT 135 (acima) do subproduto.....                                    | 117 |
| Figura 59. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do bruto de reação entrada 4.....   | 117 |
| Figura 60. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do bruto de reação entrada 5.....   | 118 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 61. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol ( <b>HBT-2-OMe*</b> ).....            | 119 |
| Figura 62. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (abaixo; 100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$ ) do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol ( <b>HBT-2-OMe*</b> )..... | 119 |
| Figura 63. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol ( <b>HBT-3-OMe</b> ) .....            | 120 |
| Figura 64. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol ( <b>HBT-4-OMe</b> ) .....            | 120 |
| Figura 65. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol ( <b>HBT-2-Cl*</b> ).....             | 121 |
| Figura 66. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) o híbrido benzoiltioureia-benzotiazol ( <b>HBT-3-Cl</b> ) .....              | 121 |
| Figura 67. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) o híbrido benzoiltioureia-benzotiazol ( <b>HBT-4-Cl</b> ) .....              | 122 |
| Figura 68. Espectro na região do IV (em KBr, $\text{cm}^{-1}$ ) das acetil-tioidantoínas derivadas de D,L,L/D-valina.....                             | 122 |
| Figura 69. Espectro na região do IV (em KBr, $\text{cm}^{-1}$ ) das acetil-tioidantoínas derivadas de D,L,L/D-triptofano. ....                        | 123 |
| Figura 70. Espectro na região do IV (em KBr, $\text{cm}^{-1}$ ) da tioidantoína derivada de treonina. ....  | 123 |
| Figura 71. Espectro na região do IV (em KBr, $\text{cm}^{-1}$ ) das tioidantoínas derivadas de D,L,L/D-valina.....                                    | 124 |
| Figura 72. Espectro na região do IV (em KBr, $\text{cm}^{-1}$ ) das tioidantoínas derivadas de D,L,L/D-triptofano. ....                               | 124 |
| Figura 73. Espectro na região do IV (em KBr, $\text{cm}^{-1}$ ) do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol ( <b>HBT-2-OMe*</b> ).....                     | 125 |
| Figura 74. Espectro na região do IV (em KBr, $\text{cm}^{-1}$ ) do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol ( <b>HBT-3-OMe</b> ) .....                     | 125 |
| Figura 75. Espectro na região do IV (em KBr, $\text{cm}^{-1}$ ) do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol ( <b>HBT-4-OMe</b> ) .....                     | 126 |
| Figura 76. Espectro na região do IV (em KBr, $\text{cm}^{-1}$ ) do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol ( <b>HBT-2-Cl*</b> ).....                      | 126 |
| Figura 77. Espectro na região do IV (em KBr, $\text{cm}^{-1}$ ) do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol ( <b>HBT-3-Cl</b> ) .....                      | 127 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 78. Espectro na região do IV (em KBr, cm <sup>-1</sup> ) do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol ( <b>HBT-4-Cl</b> ) ..... | 127 |
| Figura 79. ESI(+)-MS do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol ( <b>HBT-2-OMe</b> ) .....   | 128 |
| Figura 80. ESI(+)-MS do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol ( <b>HBT-4-OMe</b> ) .....   | 129 |
| Figura 81. ESI(+)-MS do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol ( <b>HBT-2-Cl</b> ).....   | 130 |

### Lista de esquemas

|   |    |
|---|----|
| Esquema 1. Representação das estruturas de ressonância da molécula de ureia .....                                     | 20 |
| Esquema 2. Equações envolvidas na degradação da ureia.....  | 21 |
| Esquema 3. Mecanismo proposto para obtenção das acetil-tioidantoínas <b>106</b> à <b>110</b> .....                    | 48 |
| Esquema 4. Mecanismo proposto para obtenção da tioidantoína <b>116</b> .....  | 49 |
| Esquema 5. Mecanismo proposto para desacetilação das aceti-tioidantoínas <b>106</b> à <b>110</b> .....                | 50 |
| Esquema 6. Mecanismo proposto para obtenção das tioidantoínas 106 e 110 partindo-se da tioureia.....                  | 51 |
| Esquema 7. Equação química para formação do indofenol .....   | 57 |
| Esquema 8. Esquema de síntese de 2-aminobenzotiazol proposto por Bandyopadhyay <i>et al.</i> ....                     | 85 |
| Esquema 9. Mecanismo proposto para obtenção (a) da feniltioureia, (b) do subproduto e (c) do 2-aminobenzotiazol ..... | 86 |
| Esquema 10. Mecanismo proposto para obtenção do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol .....                             | 91 |
| Esquema 11. Ilustração esquemática dos dois produtos de adição obtidos na síntese de <b>HBT-3-Cl</b> .....            | 98 |
| Esquema 12. Mecanismo proposto para obtenção da benzamida ( <b>HBT-3-Cl</b> *).....                                   | 99 |

## Lista de tabelas

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1. Sinais observados no espectro de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ da tioidantofina sintetizada ( <b>110ac</b> ) e os descritos na literatura .....     | 41 |
| Tabela 2. Sinais observados no espectro de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ da tioidantofina sintetizada ( <b>106ac</b> ) e os descritos na literatura .....     | 42 |
| Tabela 3. Sinais observados no espectro de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ da tioidantofina sintetizada ( <b>116</b> ) e descritos na literatura.....           | 43 |
| Tabela 4. Sinais observados no espectro de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ da tioidantofina sintetizada ( <b>110</b> ) e os descritos na literatura.....        | 45 |
| Tabela 5. Sinais observados no espectro de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ da tioidantofina sintetizada ( <b>106</b> ) e os descritos na literatura.....        | 46 |
| Tabela 6. Rendimento das sínteses das acetil-tioidantofinas e do produto 116 pela metodologia de Reyes e Burgess <sup>87</sup> .....                                     | 47 |
| Tabela 7. Rendimento para síntese das tioidantofinas pela metodologia adaptada de Wang <sup>86</sup> .....   | 51 |
| Tabela 8. Representação estrutural das tioidantofinas obtidas.....   | 52 |
| Tabela 9. Valores de $\text{IC}_{50}$ (mM) dos inibidores e seus respectivos aminoácidos precursores* .....  | 59 |
| Tabela 10. Sinais observados no espectro de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da feniltiourea sintetizada ( <b>IABZT</b> ).....                                      | 74 |
| Tabela 11. Sinais observados no espectro de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ do 2-aminobenzotiazol sintetizado ( <b>ABZT</b> ) e os descritos na literatura..... | 75 |
| Tabela 12. Sinais observados no espectro de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ do híbrido sintetizado ( <b>HBT-Bz</b> ) e os descritos na literatura .....         | 77 |
| Tabela 13. Sinais observados no espectro de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ do híbrido sintetizado ( <b>HBT-2-OMe</b> ) e os descritos na literatura .....      | 78 |
| Tabela 14. Sinais observados no espectro de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ do híbrido sintetizado ( <b>HBT-3-OMe</b> ) e os descritos na literatura .....      | 79 |
| Tabela 15. Sinais observados no espectro de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ do híbrido sintetizado ( <b>HBT-4-CI</b> ) e os descritos na literatura.....        | 80 |
| Tabela 16. Sinais observados no espectro de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ do híbrido sintetizado ( <b>HBT-2-CI*</b> ) e os descritos na literatura .....      | 81 |
| Tabela 17. Sinais observados no espectro de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ do híbrido sintetizado ( <b>HBT-3-CI</b> ) e os descritos na literatura.....        | 82 |



|   |    |
|---|----|
| Tabela 18. Sinais observados no espectro de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ do híbrido sintetizado ( <b>HBT-4-CI</b> ) e os descritos na literatura..... | 83 |
| Tabela 19. Rendimentos para síntese da feniltiourea .....   | 84 |
| Tabela 20. Metodologias empregadas na tentativa de obtenção do híbrido imina .....  | 89 |
| Tabela 21. Sinais observados no espectro de RMN de $^1\text{H}$ para os dois produtos provenientes de síntese do híbrido ( <b>HBT-3-CI</b> ).....                 | 97 |

## Siglas, abreviaturas, acrônimos e símbolos

---

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| <b>106</b>                       | Tioidantoína derivada de triptofano                        |
| <b>110</b>                       | Tioidantoína derivada de valina                            |
| <b>116</b>                       | Tioidantoína derivada de treonina                          |
| <b>106ac</b>                     | Acetil tioidantoína derivada de triptofano                 |
| <b>110ac</b>                     | Acetil tioidantoína derivada de valina                     |
| <b>ABZI</b>                      | 2-Aminobenzoimidazol                                       |
| <b>ABZT</b>                      | 2-Aminobenzotiazol   |
| <b>Ala</b>                       | Alanina  |
| <b>HBT-Bz</b>                    | Híbrido benzotiazol-benzoiltioureia                        |
| <b>CCD</b>                       | Cromatografia em camada delgada                            |
| <b><i>d</i></b>                  | Dupleto  |
| <b><math>\delta</math></b>       | Deslocamento químico                                       |
| <b>DA</b>                        | Derivados de aminoácidos                                   |
| <b>DAac</b>                      | Derivados de aminoácidos acetilados                        |
| <b>DAP</b>                       | Diamidofosfato   |
| <b><i>dd</i></b>                 | Dupleto duplo  |
| <b>DEPT</b>                      | <i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i> |
| <b>DMSO-<i>d</i><sub>6</sub></b> | Dimetilsulfóxido deuterado                                 |
| <b>GEQOB</b>                     | Grupo de Estudo em Química Orgânica e Biológica            |
| <b>His</b>                       | Histidina  |
| <b>HU</b>                        | Hidroxiureia   |
| <b>IABZT</b>                     | Intermediário do 2-aminobenzotiazol                        |
| <b>IBP</b>                       | Inibidor de bomba de prótons                               |
| <b>IV</b>                        | Infravermelho  |

---

---

|              |  |
|--------------|--|
| <b>J</b>     | constante de acoplamento escalar                   |
| <b>Lit.</b>  | Literatura   |
| <b>m</b>     | Multiplete   |
| <b>Map</b>   | Fosfato de monoamônio                              |
| <b>MW</b>    | <i>Microwave</i>                                   |
| <b>v</b>     | Frequência   |
| <b>NBPT</b>  | <i>N</i> -( <i>n</i> -butil) tiofosfórico triamida |
| <b>POP's</b> | Procedimentos operacionais padrões                 |
| <b>PPD</b>   | Fenil-fosforodiamidato                             |
| <b>ppm</b>   | Parte por milhão                                   |
| <b>q</b>     | Quarteto   |
| <b>RMN</b>   | Ressonância Magnética Nuclear                      |
| <b>s</b>     | Simpleto   |
| <b>sl</b>    | Sinal largo  |
| <b>t</b>     | Triplete   |
| <b>t.a.</b>  | Temperatura ambiente                               |
| <b>T.f.</b>  | Temperatura de fusão                               |
| <b>ta</b>    | Triplete aparente                                  |
| <b>TG</b>    | Termogravimetria                                   |
| <b>Treo</b>  | Treonina   |
| <b>Trp</b>   | Triptofano   |
| <b>UFMG</b>  | Universidade Federal de Minas Gerais               |
| <b>Val</b>   | Valina   |

---

## Sumário

|   |    |
|---|----|
| 1. Introdução Geral .....   | 20 |
| 1.1 Urease.....   | 20 |
| 1.2 Urease na agricultura .....   | 23 |
| 1.3 Urease em sistemas biológicos.....  | 25 |
| 1.4 Inibidores de ureases .....   | 28 |
| 2. Objetivos Gerais.....  | 31 |
| 3. Materiais e Métodos .....  | 31 |
| 3.1 Generalidades metodológicas .....   | 32 |
| 3.2 Temperaturas de fusão .....   | 32 |
| 3.3 Infravermelho .....   | 32 |
| 3.4 Espectrometria de massas.....   | 32 |
| 3.5 Ressonância magnética .....   | 32 |
| 3.6 Testes <i>in vitro</i> dos compostos sintetizados e de seus respectivos aminoácidos<br>precursores frente a enzima purificada de <i>C. ensiformis</i> ..... | 33 |
| 3.7 Ensaio de volatilização de NH <sub>3</sub> pelo método de fluxo contínuo de ar em<br>câmara fechada .....   | 34 |
| Capítulo 1 – Síntese e Avaliação Anti-ureolítica de Derivados de Aminoácido .....   | 36 |
| 1. Introdução .....   | 36 |
| 2. Objetivos específicos .....  | 40 |
| Procedimentos experimentais .....   | 40 |
| 2.1 Síntese das acetil-tioidantoínas .....  | 40 |
| 2.2 Síntese das tioidantoínas .....   | 44 |
| 3. Resultados e Discussões .....  | 47 |
| 3.1 Síntese das acetil-tioidantoínas e tioidantoínas .....  | 47 |
| 3.2 Testes <i>in vitro</i> dos compostos sintetizados e de seus respectivos aminoácidos<br>precursores frente a enzima purificada de <i>C. ensiformes</i> ..... | 57 |

|  |   |     |
|--|---|-----|
| 3.3  | Ensaio de quantificação de NH <sub>3</sub> volatilizada pelo método de fluxo contínuo de ar em câmara fechada ..... | 60  |
| 3.3.1  | Elaboração e implementação do projeto técnico .....   | 60  |
| 3.3.2  | Volatilização de amônia .....   | 64  |
| 4.   | Conclusão e Perspectivas .....  | 68  |
| Capítulo 2 – Síntese e Avaliação Anti-ureolítica de Derivados Benzotiazóis ..... |   | 69  |
| 1.   | Introdução .....  | 69  |
| 2.   | Objetivos específicos .....   | 72  |
| 3.   | Procedimentos experimentais .....   | 73  |
| 3.1  | Síntese do 2-aminobenzotiazol .....   | 73  |
| 3.2  | Síntese dos híbridos benzoiltioureia-benzotiazóis .....   | 75  |
| 4.   | Resultados e Discussões .....   | 84  |
| 4.1  | Síntese do 2-aminobenzotiazol (ABZT).....   | 84  |
| 4.2  | Síntese dos híbridos benzotiazóis-benzoiltiureias.....  | 90  |
| 4.3  | Testes <i>in vitro</i> dos compostos sintetizados frente a enzima purificada de <i>C. ensiformes</i> . .....        | 100 |
| 4.4  | Ensaio de volatilização de NH <sub>3</sub> pelo método de fluxo contínuo de ar em câmara fechada .....              | 102 |
| 5.   | Conclusão e Perspectivas .....  | 105 |
| 6.   | Conclusão Geral e Perspectivas .....  | 106 |
| Referências .....  |   | 107 |
| Anexos .....   |   | 111 |
| Anexo 1 – Espectros.....   |   | 111 |
| Anexo 2 – Publicações .....  |   | 131 |
| Anexo 4 – Licenças .....   |   | 136 |

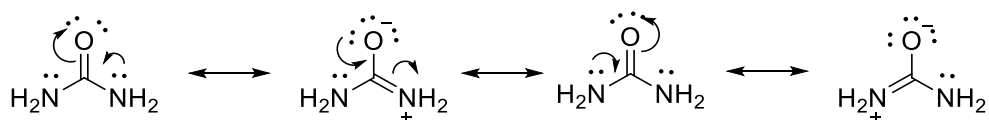
# 1. Introdução Geral

## 1.1 Urease

O estudo das ureases curiosamente está envolvido em pelo menos três fatos históricos que contribuíram de forma imensurável para o avanço da ciência. A ureia, principal substrato da urease, foi descoberta na urina humana por Hillaire M. Rouelle (1773) e foi sintetizada por Wohler (1828) se destacando como a primeira molécula orgânica obtida a partir de compostos inorgânicos.<sup>1-3</sup> A urease foi a primeira enzima obtida sob a forma de cristal (1926) por James B. Summer, em um estudo que comprovou a natureza proteica das enzimas e, mais tarde, em 1946, rendeu ao pesquisador um dos prêmios mais cobiçados pela comunidade científica, o prêmio Nobel em química.<sup>4</sup> Em 1975, o grupo do professor Australiano Zerner, dando continuidade ao trabalho de Summer contribuiu para o início da elucidação estrutural da enzima urease isolada de *Canavalia ensiformes* (Jack Bean) ao descobrir a presença de dois átomos de níquel na estrutura enzimática, sendo o primeiro registro desse metal como cofator de enzimas.<sup>5</sup>

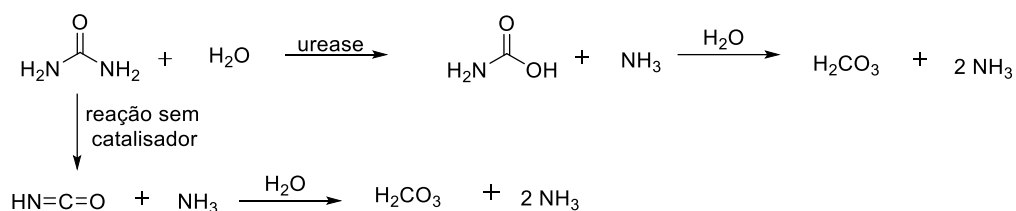
A ureia é um composto altamente estável em soluções aquosas apresentando um tempo de meia-vida de aproximadamente 40 anos a 25 °C na ausência de ureases.<sup>6,7</sup> Essa estabilidade é decorrente das estruturas de ressonância envolvendo os pares de elétrons livres dos átomos de nitrogênio e da ligação  $\pi$  da carbonila. Esta ressonância diminui a eletrofilia do carbono carbonílico, tornando a molécula menos propensa a ataques nucleofílicos (Esquema 1).<sup>8</sup>

Esquema 1. Representação das estruturas de ressonância da molécula de ureia



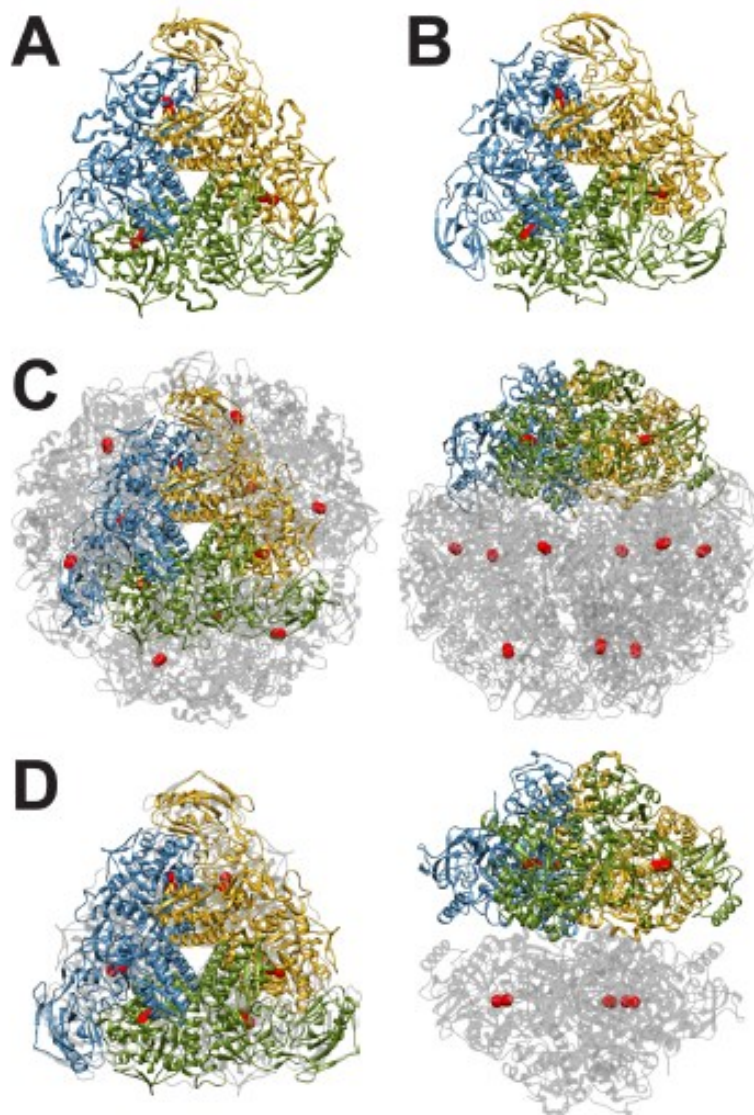
Mesmo com essa estabilidade, em meio aquoso, pode ocorrer a eliminação de amônia da ureia, resultando na formação de isocianato que, em uma etapa de hidrólise, fornece amônia e ácido carbônico que se decompõem espontaneamente em  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . Na presença da enzima urease, a reação é cerca de  $10^{14}$  vezes mais rápida e gera como intermediários carbamato e amônia que, após hidrólise, forma ácido carbônico e amônia (Esquema 2).<sup>3</sup>

Esquema 2. Equações envolvidas na degradação da ureia



O avanço nas elucidações das estruturas tridimensionais completas das enzimas ureases isoladas de *Klebsiella aerogenes*<sup>9</sup>, *Bacillus pasteurii*<sup>10</sup> e *Helicobacter pylori*<sup>11</sup> e a melhor compreensão do sítio ativo das respectivas enzimas, contribuíram para formulações de diferentes propostas do mecanismo destas enzimas.<sup>8,12,13</sup> As ureases pertencem ao grupo das amido-hidrolases (enzimas que auxiliam na clivagem de ligações amídicas pela molécula de água) e são encontradas em plantas, bactérias, fungos, algas e invertebrados.<sup>2,3</sup> Cerca de 43 estruturas cristalinas de ureases foram isoladas.<sup>13</sup> A maioria das ureases bacterianas existem sob a forma de trímeros de três subunidades ( $\alpha\beta\gamma$ )<sub>3</sub> com exceção da enzima urease isolada de *H. pylori*, que é composta por duas subunidades. Ureases de plantas e fungos são geralmente compostas por apenas uma subunidade estruturalmente sob a forma de trímeros do tipo ( $\alpha$ )<sub>3</sub> (Figura 1, pg. 22).<sup>13</sup>

Figura 1. (A) Estrutura do oligômero  $(\alpha\beta\gamma)_3$  da urease de *B. pasteurii*. (B) Esquema de fita do oligômero  $(\alpha\beta\gamma)_3$  da urease de *K. aerogenes*. (C) Estrutura do oligômero  $[(\alpha\beta)_3]_4$  da urease de *H. pylori*. (D) Estrutura do oligômero  $[(\alpha)_3]_2$  da urease de *C. ensiformis*. Os átomos de Níquel são apresentados como esferas vermelhas. Reproduzido com permissão de Copyright (2014) American Chemical Society<sup>13</sup>



Apesar da variação na estrutura quaternária das enzimas ureases, cerca de 55% da identidade em suas sequências primárias estabelecem a relação evolutiva entre elas, sendo assim, o mecanismo da atividade enzima/substrato pode ser extrapolado para as demais ureases uma vez que as disposições do sítio ativo das enzimas são semelhantes.<sup>8,9</sup>

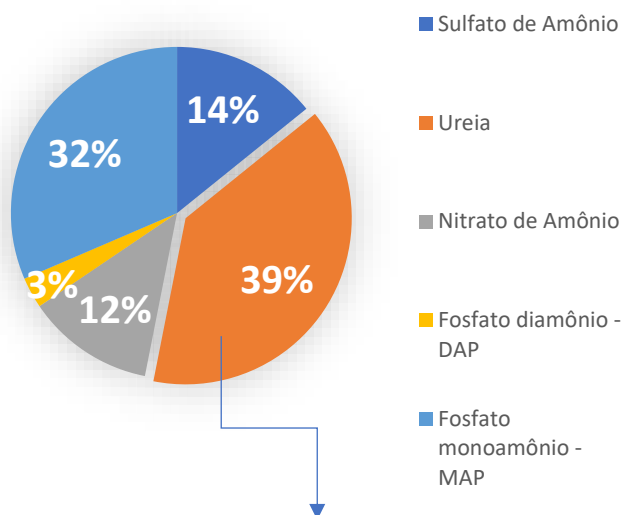


## 1.2 Urease na agricultura

Na agricultura, a urease está envolvida no ciclo do nitrogênio. A urease é fundamental na etapa de transformação de nitrogênio “orgânico” em nitrogênio “inorgânico”, para assimilação de nitrogênio pelas plantas.<sup>14,15</sup>

É crescente a necessidade de utilização de fertilizantes na produção alimentícia pois os nutrientes disponíveis no solo não são suficientes para a atual demanda de produção.<sup>16</sup> Dentre os fertilizantes nitrogenados, a ureia é o mais utilizado, representando cerca de 56% do consumo mundial.<sup>17,18</sup> O Brasil ocupa a terceira posição no *ranking* dos maiores consumidores desta classe de fertilizantes. No ano de 2017, o Brasil teve um consumo aparente de 5,6 milhões de toneladas de ureia, dos quais 85% são provenientes de importação (Figura 2) sendo em grande maioria proveniente da Argélia, Rússia e Catar. A elevada utilização da ureia frente aos demais fertilizantes deve-se ao baixo custo por unidade de nitrogênio, estabilidade química, alta solubilidade em água, biocompatibilidade com outros fertilizantes e a facilidade de fabricação e transporte.<sup>3,19,20</sup>

Figura 2. Consumo nacional de fertilizantes nitrogenados no ano de 2017



**85% provem de importação**

Como as plantas não são capazes de assimilar o nitrogênio orgânico, o principal papel da urease na agricultura é permitir que os organismos usem a ureia como fonte de nitrogênio, sendo responsável em acelerar a transformação do nitrogênio orgânico da ureia em nitrogênio inorgânico sob a forma de amônia.<sup>21</sup> Nesse sentido, a urease presente no solo é essencial para o uso da ureia como fertilizante nitrogenado. Além disso, esta enzima é uma das hidrolases mais eficientes, sendo capaz de acelerar a velocidade de hidrólise da ureia por um fator de  $10^{14}$  (cem trilhões) em relação à decomposição da ureia na ausência desta enzima (Esquema 2, pg. 21).<sup>22</sup>

A reação de hidrólise catalisada pela urease produz amônia e cerca de 40-70% é volatilizada para a atmosfera, tornando-se portanto, uma massa de nitrogênio improdutiva, pois não será assimilada pelas plantas.<sup>18,23</sup> Além disso, essa perda de amônia pode aumentar o pH do solo prejudicando a assimilação de alguns nutrientes e, conseqüentemente, levando a perdas no cultivo.<sup>18</sup> Além do prejuízo econômico, uma vez que grande parte do nitrogênio aplicado está sendo perdido, tem-se ainda o impacto ambiental correspondente a elevada emissão do gás amônia para a atmosfera.

Em 1989, Newbould abordou a necessidade da utilização de fertilizantes nitrogenados na produção de alimentos e, sob o ponto de vista ambientalista, advogou sobre a proibição do uso desta classe de fertilizantes por contribuírem para formação de gases responsáveis pela chuva ácida<sup>16</sup> e de derivados de nitrogênio ( $\text{NO}_x$ ), os quais estão associados ao agravamento do efeito estufa e eutrofização de lagos.<sup>24,25</sup>

Como a mitigação do uso de fertilizantes nitrogenados não é uma opção viável para os agricultores, estratégias que visam um melhor aproveitamento desses fertilizantes nitrogenados são largamente estudadas a fim de se obter boas práticas agrícolas e sustentabilidade ambiental. Melhores práticas de manejo abordam a maneira de se aplicar os fertilizantes, como no caso da incorporação da ureia no solo (5 cm) a fim reduzir em até 90% a perda de nitrogênio. No entanto, esses processos possuem elevado custo operacional uma vez que necessitam de um manejo do solo e existem culturas que impossibilitam tal incorporação, como por exemplo em culturas perenes, plantas com ciclo de vida mais longos que não precisam ser replantadas após término do ciclo produtivo. Outras alternativas, além da utilização de diferentes fontes nitrogenadas, são o uso de ureia revestida para liberação lenta, o uso de supergrânulos de ureia e a adição de inibidores de urease, têm se mostrado o método mais eficiente e largamente utilizado no mercado global.<sup>14,20</sup>

### 1.3 Urease em sistemas biológicos

Os estudos envolvendo ureases em sistemas biológicos tiveram um expressivo aumento no século XX, decorrente da descoberta da *H. pylori* e o seu papel no desenvolvimento de inflamações gástricas.<sup>26</sup> Em 2005, essa descoberta resultou no laureamento do prêmio Nobel de Medicina para os pesquisadores Warren e Marshall. Existe uma ampla variedade de enzimas ureolíticas que, apesar das diversificadas origens, possuem a mesma capacidade de catalisar a hidrólise da ureia para produzir amônia e carbamato, que se decompõe espontaneamente para produzir uma segunda molécula de amônia e ácido carbônico (Esquema 2, pg. 21). Os efeitos decorrentes da amônia produzida colocam a urease como um fator de virulência para uma variedade de patógenos humanos.<sup>2,27</sup>

A ureia é o principal produto nitrogenado proveniente da síntese de catabólicos que contenham nitrogênio em animais vertebrados, sendo que um humano saudável pode produzir cerca de 10 Kg de ureia por ano.<sup>13,28</sup> Produzida no fígado, a ureia é transportada na corrente sanguínea até os rins onde é excretada através da urina.<sup>27</sup> A concentração da ureia no sangue (concentração sérica) é de 1 à 10 mM, já na urina pode-se exceder 0,5 M.<sup>29</sup> Apesar do sistema digestivo não estar envolvido no percurso de excreção, a concentração da ureia no estômago é de 1,7 a 3,4 mM.<sup>3</sup> Isto se deve ao fato de a ureia estar presente nas secreções das glândulas exócrinas em concentrações de 3 a 10 mM, sendo a saliva a maior representante dessas secreções com, em média, um litro por dia, justificando assim, a presença da ureia no sistema digestivo.<sup>27,30</sup>

Como a ureia é o substrato da enzima urease, todo local do organismo que tenha a passagem ou presença desta, está sujeito a ação da enzima urease caso haja “contaminação” por bactérias ureolíticas. A infecção do trato urinário é uma das principais patogêneses relacionada à enzima urease e as espécies ureolíticas mais comuns isoladas no trato urinário são, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus saprophyticus*.<sup>2,27</sup> Com a liberação de amônia resultante da hidrólise da ureia, tem-se o aumento no valor do pH da urina, tipicamente neutra ou ligeiramente ácida. O meio alcalino provoca a precipitação de complexos anteriormente solúveis, resultando assim na formação de cálculos urinários, sendo a estruvita ( $Mg(NH_4)PO_4 \cdot 6H_2O$ ) e carbonato de apatita [ $Ca_{10}(PO_4)_6CO_3$ ] os mais comuns.<sup>2,3,31</sup>

Além da contribuição na formação de cálculos urinários, as ureases também podem estar associadas à formação de pielonefrite aguda, infecção grave associada

a capacidade de incorporação de outras bactérias patogênicas nos cálculos formados.<sup>32</sup> Algumas alternativas para controlar a formação dos cálculos urinários baseiam-se em restrições alimentares, dietas, maior consumo de líquidos e até mesmo o consumo de alimentos ácidos a fim de alterar o pH da urina.<sup>31</sup> Estudos estão sendo desenvolvidos para compreender a interação entre as bactérias com o sistema urinário e possíveis formas de combate às mesmas.<sup>31,32</sup>

O interesse científico por ureases microbianas está relacionado com a descoberta da *H. pylori* e, conseqüentemente, à necessidade de compreensão do mecanismo de interação da bactéria, pois as doenças relacionadas à *H. pylori* representaram elevado gasto financeiro com saúde pública por diversos países no final do século XX.<sup>33,34</sup> Durante anos, acreditava-se que o estômago não poderia ser ocupado por microrganismos devido ao baixo valor de pH, 1-2, que impossibilitaria a manutenção e o crescimento microbiano.<sup>27</sup> No entanto, na presença da ureia a ação das enzimas ureases colaboram para o aumento do pH no microambiente das bactérias (Figura 3, pg. 26) contribuindo para o seu crescimento. Em 2001 Montecucco e Rappuoli abordaram, em um artigo de revisão, como a *H. pylori* sobrevive nas condições hostis do estômago.<sup>35</sup>

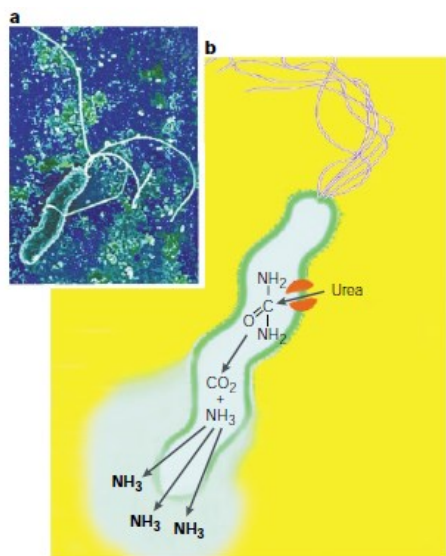


Figura 3. (a) Micrografia eletrônica de varredura de *H. pylori*. (b) Representação esquemática mostrando o canal de entrada da ureia e a produção de amônia, que neutraliza o ambiente ácido, em amarelo, favorecendo o aumento de pH no ambiente ao redor da bactéria (azul claro). Reproduzido com permissão da referência (2001) Nature Reviews Molecular Cell Biology<sup>35</sup>

A *H. pylori* é a principal bactéria ureolítica que infecta o trato gastrointestinal. Não há certeza sobre quando ocorreu a primeira infecção por esse microrganismo, mas os primeiros relatos de dores estomacais ocorreram por médicos gregos em 1586.<sup>35</sup> A infecção por *H. pylori* é considerada uma infecção crônica e, mesmo que o contato com o microrganismo ocorra nos primeiros anos de vida, as conseqüências podem

ser assintomáticas ou capazes de gerar moderadas infecções gástricas.<sup>35,36</sup> Estima-se que 50% da população mundial está infectada com *H. pylori* e que 15 à 20% desse montante sofrem por doenças mais graves associadas a esse microrganismo.<sup>35,37</sup>

As patologias associadas a *H. pylori*, tais como gastrite, úlcera peptídica, úlceras gastroduodenais, entre outras, não se limitando à colonização bacteriana mas também aos efeitos citotóxicos provenientes da amônia gerada pela urease no meio e a resposta imunológica do organismos frente à infecção.<sup>35</sup> A amônia pode reagir com mediadores formados pelo sistema imunológico, gerando monocloroamina que está relacionada com a indução de danos mutagênicos ao DNA, contribuindo para o desenvolvimento do câncer de estômago.<sup>3</sup> Como resposta, os estudos envolvendo o combate a *H. pylori* vem sendo desenvolvidos, uma vez que os tratamentos disponíveis atualmente são dispendiosos, demorados e passíveis de elevada possibilidade de ocorrer reinfecção.<sup>27</sup>

Ultimamente, a terapia de primeira linha recomendada para a erradicação da *H. pylori* consiste em uma associação de medicamentos com dois antibióticos (claritromicina e amoxicilina) e um inibidor de bomba de prótons (IBP, omeprazol),<sup>37</sup> porém o efeito de resistência da *H. pylori* aos antibióticos está bem documentado.<sup>38-40</sup> Entretanto, a terapia sequencial tem mostrado resultados promissores. Ela consiste em um programa de 10 dias, em duas etapas, consistindo na administração de um IBP com amoxicilina durante os primeiros 5 dias, seguido por terapia tripla por mais 5 dias. Dentre os tratamentos citados, nenhum apresenta uma eficácia de 100% na erradicação do *H. pylori*, além de serem passíveis de resistência e efeitos adversos.<sup>40</sup>

No entanto, no que concerne às resistências aos múltiplos fármacos tem-se o crescente empenho no estudo de novas estratégias para combate a esse microrganismo.<sup>37</sup> Dentre essas estratégias enquadra-se o desenvolvimento de vacinas com o uso de subunidades recombinantes isoladas de diferentes ureases. As vacinas têm apresentado respostas imunológicas e baixos efeitos adversos e já estão sendo testadas em humanos.<sup>27,41</sup> Outra alternativa é utilização de compostos químicos que agem com a finalidade de inibir a urease presente na bactéria combatendo assim, indiretamente, o crescimento do microrganismo. Os estudos que abordam essa última alternativa serão apresentados na seção 1.4, pg. 28 desse trabalho.

A geração de amônia não traz apenas malefícios. Existem duas principais vertentes em que as ureases apresentam pontos positivos.<sup>42</sup> A primeira é associada

à cavidade bucal onde, na presença de bactérias ureolíticas como a *Streptococcus salivarius*, tem-se o aumento do pH proveniente da ureia secretada na saliva, 3 à 10 mM. O aumento do pH contribui para a manutenção dos biofilmes dentários prevenindo a formação de cáries dentárias uma vez que assim dificulta o crescimento de bactérias que vivem em baixos valores de pH.<sup>30</sup>

A segunda associação é a presença das bactérias ureolíticas no rúmen de bovinos e ovinos. Atualmente, a ureia tem sido utilizada como fonte nitrogenada pois apresenta um menor custo se comparada às proteínas, na alimentação de ruminantes. Apesar de já validada para tal aplicação, estudos evidenciam danos associados à utilização de ureia na alimentação de bovinos pois a taxa de formação de amônia é superior ao seu consumo, causando toxicidade por amônia e prejudicando a saúde do animal.<sup>43-45</sup>

#### **1.4 Inibidores de ureases**

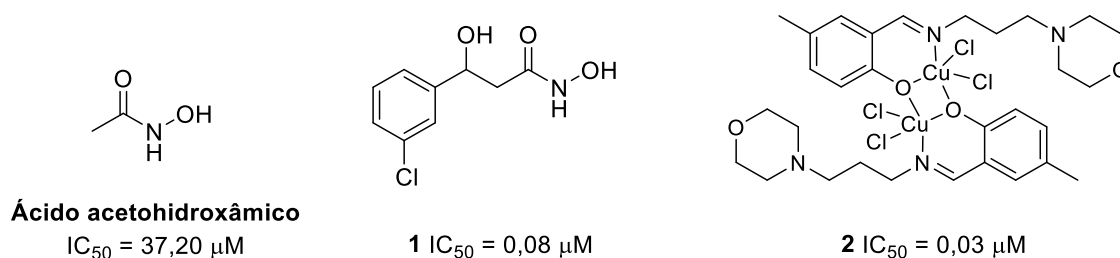
Decorrente da necessidade de controlar doenças que envolvam enzimas ureolíticas e prejuízos ambientais e econômicos associados na agricultura, há um grande interesse na pesquisa e obtenção de inibidores de urease. Estes inibidores tem como objetivo se ligarem à enzima urease, seja no sítio ativo (inibição competitiva) ou em um sítio alostérico (inibição não competitiva) contribuindo, assim, para permanência da ureia no meio.<sup>46</sup> Ao contrário da aplicação medicinal, na agricultura a inibição não pode ser total, uma vez que o nitrogênio é absorvido pela planta sob a forma de amônio.<sup>17</sup>

Após a descoberta da primeira estrutura cristalina da ureia (1926), e anterior às elucidções estruturais das ureases (1995), já haviam vários estudos envolvendo inibidores de urease.<sup>4,9</sup> Um dos primeiros artigos, publicado em 1944 por Turner *et al.* abordou evidências experimentais que sugerem a possível inibição da enzima urease pela penicilina.<sup>47</sup> No entanto, os próprios autores descrevem a necessidade da melhoria tecnológica nos testes e uma certa dificuldade na interpretação dos resultados alcançados. Compostos de flúor, enxofre e fosfatos também foram estudados entre 1943 e 1949 e os tipos de inibição por competição já eram discutidos para os compostos fostatados.<sup>43,48,49</sup>

O estudo de compostos com semelhança estrutural à ureia é uma alternativa na busca por novas substâncias com atividade inibitória e um exemplo disso é o ácido hidroxâmico (Figura 4, pg. 29) e seus derivados, desenvolvidos desde 1962 por

Kobashi *et al.*<sup>50</sup> e Amtul *et al.*<sup>46</sup> Esses pesquisadores descreveram um compilado de diferentes propostas mecanísticas frente à inibição de ureases isoladas de diversas bactérias e os melhores inibidores derivados do ácido hidroxâmico até o ano de 2002.<sup>46</sup> Essa classe de compostos é sintetizada até o presente momento, destacando-se o composto **1** (Figura 4) obtido por Xiao *et al.*, no ano de 2013 com a concentração necessária para inibir 50% da enzima ( $IC_{50}$ , do inglês *half maximal inhibitory concentration*) de 0,083  $\mu\text{M}$  frente a enzima urease isolada de *H. pylori*.<sup>51</sup> Shaw provou que os grupos sulfidrilas dos resíduos de cistinas presentes no sítio ativo da enzima interagem com íons metálicos por meio da formação de sulfetos metálicos inativando a enzima. Desse modo, determinou uma ordem crescente de inibição da enzima urease a partir de íons metálicos:  $\text{Mn}^{2+} < \text{Be}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Cd}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Hg}^{2+} \sim \text{Ag}^+$ .<sup>52</sup> Em 2018, nosso grupo de pesquisa publicou um artigo de revisão abordando o uso de bases de Schiff aplicadas como inibidores de urease podendo-se destacar o composto **2** (Figura 4) sintetizado por You *et al.*, que apresentou um  $IC_{50}$  de 0,03  $\mu\text{M}$  para a urease isolada de *H. pylori* tendo o ácido aceto hidroxâmico (37,2  $\mu\text{M}$ ) como controle positivo.<sup>53,54</sup> A utilização de metais e complexos metálicos para tal finalidade é bastante expressiva sendo que em 2019, Habala *et al.*, publicaram um artigo de revisão abordando exatamente essa temática.<sup>55</sup>

Figura 4. Representação de estruturas químicas de reconhecidos inibidores de urease



A busca por novas substâncias que atuam como inibidores da enzima urease se intensificou por volta do ano 2000.<sup>56–59</sup> Diversos compostos orgânicos e inorgânicos já foram investigados como inibidores da atividade ureolítica de ureases, a citar: i) análogos estruturais da ureia (ácidos acilhidroxâmicos, amidas, ésteres de ácidos fosfóricos, tioureias, benzoiltioureias, adutos de Biginelli, derivados do ácido barbitúrico etc); ii) inibidores não relacionados à estrutura da ureia (triazóis, iminas, oximas, cumarinas, benzoimidazóis, benzotiazóis, tióis, ácido bórico etc); iii) produtos

naturais (flavonoides, cumarinas, terpenoides, quinonas, saponinas, alcaloides etc).<sup>3,60-63</sup>

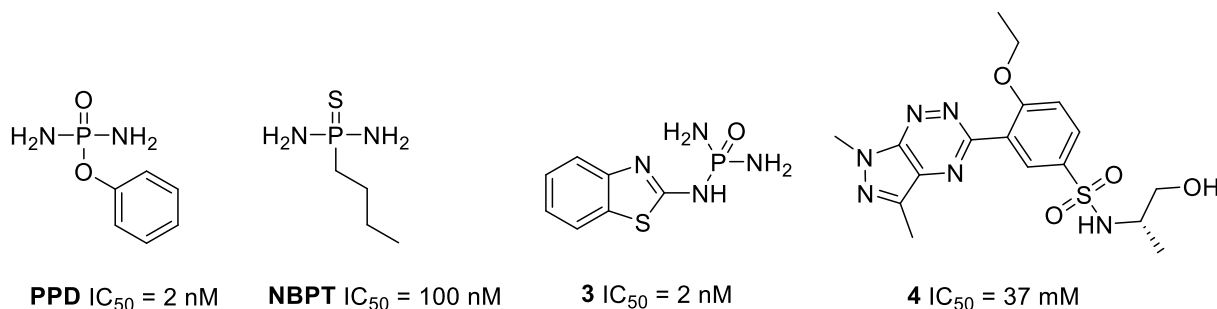
Na aplicação agrícola, os fosforoamidatos merecem atenção como inibidores de urease, pois o aditivo agrícola mais utilizado no mundo para tal finalidade pertence a essa classe. O tiofosfato de *N*-(butil)triamida (NBPT; Figura 5, pg. 31) possui eficiência comprovada em solos com plantações de milho, arroz, cana-de-açúcar etc, sendo o único inibidor de urease comercial presente no mercado.<sup>56-58,64,65</sup> No entanto, Zanin *et al.*, (2015 e 2016) apresentaram algumas desvantagens associadas a absorção de nitrogênio com o uso do NBPT<sup>66,67</sup> e alguns países limitam o seu uso.<sup>46</sup> Anterior ao NBPT, o fenil-fosforodiamidato (PPD; Figura 5, pg. 31) foi o composto que mais chamou atenção da comunidade científica, uma vez que apresenta IC<sub>50</sub> de 2 nM frente a enzima isolada de *Canavalia ensiformis* além de bons resultados em solo.<sup>68</sup> Estudos de cristalografia por raios X constataram que o PPD se liga ao sítio ativo da enzima de uma maneira semelhante à ureia, no entanto, antes da interação, o PPD sofre hidrólise e o seu produto diamidofosfato (DAP) é o responsável pela inibição.<sup>3</sup> Outro produto proveniente da hidrólise do PPD é o fenol, o que compromete a utilização do inibidor devido a sua elevada toxicidade.<sup>69</sup>

Os inibidores de ureases mais eficientes até o presente momento foram obtidos por Domínguez *et al.* em 2008, que sintetizaram 8 compostos representantes das classes dos fosforoamidatos com IC<sub>50</sub> ≤ 10 nM, frente a enzima isolada de *C. ensiformis*, destacando-se o composto **3** (Figura 5, pg. 31) com IC<sub>50</sub> de 2 nM enquanto o composto de referência (NBPT) apresentou IC<sub>50</sub> de 100 nM.<sup>68</sup>

Para a aplicação medicinal, os tratamentos comumente adotados não envolvem o mecanismo proposto para os inibidores de urease, apesar do omeprazol e seus análogos apresentarem resposta quanto a inibição da enzima em modelos *in vitro*.<sup>70,71</sup> No entanto, dentre os milhares de compostos estudados para erradicar a *H. pylori*, Mojzych *et al.* sintetizaram 10 híbridos pirazoltriazinesulfonamidas quirais com valores de IC<sub>50</sub> variando de 0,037-0,084 μM frente a enzima isolada de *C. ensiformis* e tioureia como inibidor de referência (20,7 μM). Os estudos para o melhor composto, **4**, (Figura 5, pg. 31) mostram que ele é um inibidor competitivo; porém os testes toxicológicos e *in vivo* encontram-se como espectativas.<sup>72</sup>



Figura 5. Representação de estruturas químicas dos melhores inibidores de urease até o momento



## 2. Objetivos Gerais

- Síntese e caracterização de possíveis inibidores de urease;
- Avaliação da capacidade dos compostos sintetizados em inibir a atividade ureolítica em modelos *in vitro* (frente a enzima purificada de *C. ensiformes*);
- Elaboração e implementação de um novo projeto técnico voltado para quantificação de amônia volatilizada por fluxo contínuo de ar em câmara fechada;
- Avaliação dos melhores inibidores no ensaio de volatilização de amônia;

## 3. Materiais e Métodos

Para as sínteses dos compostos descritos neste trabalho foram utilizados reagentes de grau analítico. Quando necessário, foram realizadas purificações seguindo as metodologias descritas por Armarego e Perrin.<sup>73</sup>

O solo utilizado nesse trabalho é proveniente da Universidade Federal de Viçosa (UFV) sendo caracterizado como argissolo vermelho-amarelo coletada na camada de 0 a 5 cm em área cultivada em sistema de plantio direto, com 580, 60 e 360 g kg<sup>-1</sup> de areia, silte e argila, respectivamente. O solo apresentou valor de pH 5,79 e 5,3 mg dm<sup>-3</sup> de P e 198 mg dm<sup>-3</sup> de K (ambos em Mehlich), 3,42 cmol kg<sup>-1</sup> de Ca<sup>2+</sup> e 1,89 cmol kg<sup>-1</sup> de Mg<sup>2+</sup> (extraídos em KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>), e 64,0 g kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica (Walkley-Black).

### 3.1 Generalidades metodológicas

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando placas POLYGRAM-UV2540, 20 mm MACHEREY-NAGEL. As placas de CCD foram observadas sob lâmpada de ultravioleta ( $\lambda = 254$  nm) e posteriormente reveladas com o auxílio de solução ninidrina.<sup>73</sup>

### 3.2 Temperaturas de fusão

As temperaturas de fusão foram determinadas utilizando um aparelho GEHAKA-PF1500. Os valores observados no equipamento não foram corrigidos.

### 3.3 Infravermelho

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram realizados em um espectrofotômetro SpectroOnePerkin Elmer (Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química - UFMG) utilizando pastilha de KBr na região de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.4 Espectrometria de massas

Os espectros de massas, utilizando a ionização por electrospray (ESI) foram obtidos em um espectrômetro de massas Thermo LCQ-Fleet (Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química - UFMG). As condições para ESI foram: temperatura do bloco: 250 °C; voltagem do capilar: (+) 5,0 kV; fluxo de gás: 30 a.u. As soluções foram injetadas por infusão direta.

### 3.5 Ressonância magnética

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ , 400 MHz) e de carbono (RMN de  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz) foram obtidos em um espectrômetro Bruker AVANCE-III 400 e Bruker Avance Neo 600 (Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução – LAREMAR - multiusuário da UFMG). Utilizou-se clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e dimetilsulfóxido deuterado ( $\text{DMSO}-d_6$ ) para o preparo das amostras. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) sendo referenciados pelos sinais dos respectivos solventes ou padrão interno tetrametilsilano (TMS).

### 3.6 Testes *in vitro* dos compostos sintetizados e de seus respectivos aminoácidos precursores frente a enzima purificada de *C. ensiformis*.

O potencial dos compostos em inibir a enzima urease foi avaliado seguindo o método do indofenol.<sup>74</sup> Cada composto foi testado em quatro concentrações e incubado em uma reação de meio tamponado com fosfato 20 mM (pH 7,4) e suplementado com EDTA 1 mM, ureia 10 mM e 12,5 mU de urease isolada de *C. ensiformis* (Sigma). As reações foram mantidas a 25 °C durante 10 min, seguido pela adição de um volume de 0,5 mL de 1% m/v de fenol em 5 ppm de nitroprussiato de sódio e um volume de 0,7 mL de 0,5% m/v de NaOH em 0,1% v/v de hipoclorito de sódio para interromper a atividade da enzima. Após incubação dos sistemas, a 50 °C por 5 min, foi obtido a absorbância a 630 nm para determinação da quantidade de amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) formado no meio. Sistemas de reação desprovidos de enzima foram usados como branco e a hidroxiiureia (HU) foi empregada como um inibidor de urease referência. A inibição da atividade urease foi determinada em termos percentuais, tendo como referência a produção de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em reações na ausência do inibidor de urease.

Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços utilizando o substrato ureia na concentração final de 10 mM. Para os derivados de aminoácidos foram testadas quatro concentrações dos inibidores variando de 125 até 1000 µM, com exceção aos compostos **106ac** e **110ac** em que as concentrações variaram de 500 até 2000 µM. Já, as benzoiltioureias foram testadas em concentrações finais de 100, 175 e 250 µM.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software* PRISMA. Os experimentos foram realizados em quadruplicata e quatro blocos experimentais providos de diferentes pesagens, sendo assim considerados indivíduos independentes que serão analisados estatisticamente.

Inicialmente todos os resultados foram avaliados pelo *software* com a finalidade de remover possíveis *outliers*, em seguida, foram realizados os testes de ANOVA One-way com pós-teste de Tukey para verificar se as médias dos grupos diferem significativamente entre si. Para os derivados de aminoácidos em que foram determinados os valores de IC<sub>50</sub>, foram verificados se os dados são homocedásticos (se a variância do eixo y permite a utilização de uma equação linear). As curvas obtidas para cada tratamento foram submetidas à análise de significância (para

verificar se os tratamentos de diferentes blocos podem ser relacionados entre si), e caso um tratamento não fosse significativo o experimento foi reproduzido novamente. Para os derivados de aminoácidos além do valor de IC<sub>50</sub> foram apresentados os valores de porcentagem de inibição a uma concentração de 500 µM do inibidor. Para os híbridos benzotiazóis benzoiltioureias os resultados foram descritos por porcentagem de inibição a 100 µM.

### **3.7 Ensaio de volatilização de NH<sub>3</sub> pelo método de fluxo contínuo de ar em câmara fechada**

A volatilização de amônia a partir dos inibidores sintetizados foi avaliada em laboratório utilizando uma metodologia adaptada de Paiva *et al.*<sup>75</sup> que consiste em um sistema fechado com fluxo contínuo de ar. O sistema é formado por câmaras de incubação (recipientes de vidro com volume de 0,34 dm<sup>3</sup>) conectadas a unidades coletoras de amônia (erlenmeyers com 40 mL de solução de ácido bórico 20 g L<sup>-1</sup>). Em cada câmara de incubação foi adicionada uma amostra de 100 g de solo do tipo Argissolo Vermelho-Amarelo, previamente seco ao ar e peneirado (malha 2 mm). A 24 h antecedentes ao início do experimento, o solo foi transferido para as câmaras de incubação e a umidade do solo elevada para 80% do equivalente de umidade com água destilada. As câmaras foram mantidas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Em seguida, foram adicionadas as câmaras 1 mL de etanol contendo os compostos que foram avaliados e para o controle positivo, 1 mL de etanol puro. Foram adicionadas as câmaras 1 mL de solução de ureia (3,57 M) recém preparada suficiente para suprir 100 mg de nitrogênio, após a adição do fertilizante, as câmaras foram imediatamente vedadas iniciando o fluxo de ar. As unidades coletoras foram, então, substituídas periodicamente (24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h) para fins de avaliação da quantidade de amônia volatilizada a partir da ureia. A amônia coletada foi quantificada por titulação potenciométrica com ácido clorídrico (0,05 mol L<sup>-1</sup>) tendo-se como ponto final de titulação o valor de pH da solução de ácido bórico inicialmente empregada (pH ≅ 4,9). Nessa etapa foi utilizado um titulador automático Tritino Plus 840- Metrohm. Os resultados foram expressos em miligrama de nitrogênio volatilizado (NH<sub>3</sub>) por grama de nitrogênio aplicado e porcentagem de nitrogênio perdido, avaliado nos respectivos tempos. O experimento foi realizado em quatro replicatas e o delineamento experimental foi em blocos ao acaso. Além das câmaras descritas, foram adicionadas

ao sistema, replicatas contendo apenas solo com água e etanol, para as medições em que o solo apresentou uma pequena variação no valor de pH, foram realizadas uma correção no valor de quantificação de amônia subtraindo a média referente ao nitrogênio presente no solo utilizado.

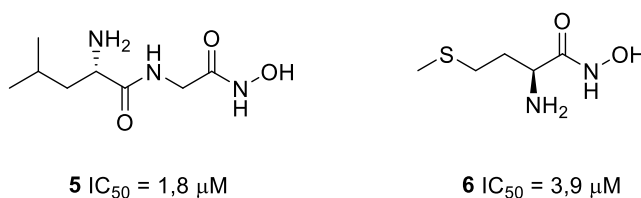
Os resultados estatísticos foram representados como média  $\pm$  desvio padrão da média. A avaliação da normalidade foi realizada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste de ROUT (Q = 10 %) foi utilizado para a remoção de outliers. Para a análise dos tratamentos, o teste de ANOVA One-way com pós-teste de Tukey foi utilizado para verificar se as médias dos grupos diferem significativamente entre si em cada tempo avaliado. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. As análises foram feitas utilizando-se o software GraphPad Prism® 9.

## Capítulo 1 – Síntese e Avaliação Anti-ureolítica de Derivados de Aminoácido

### 1. Introdução

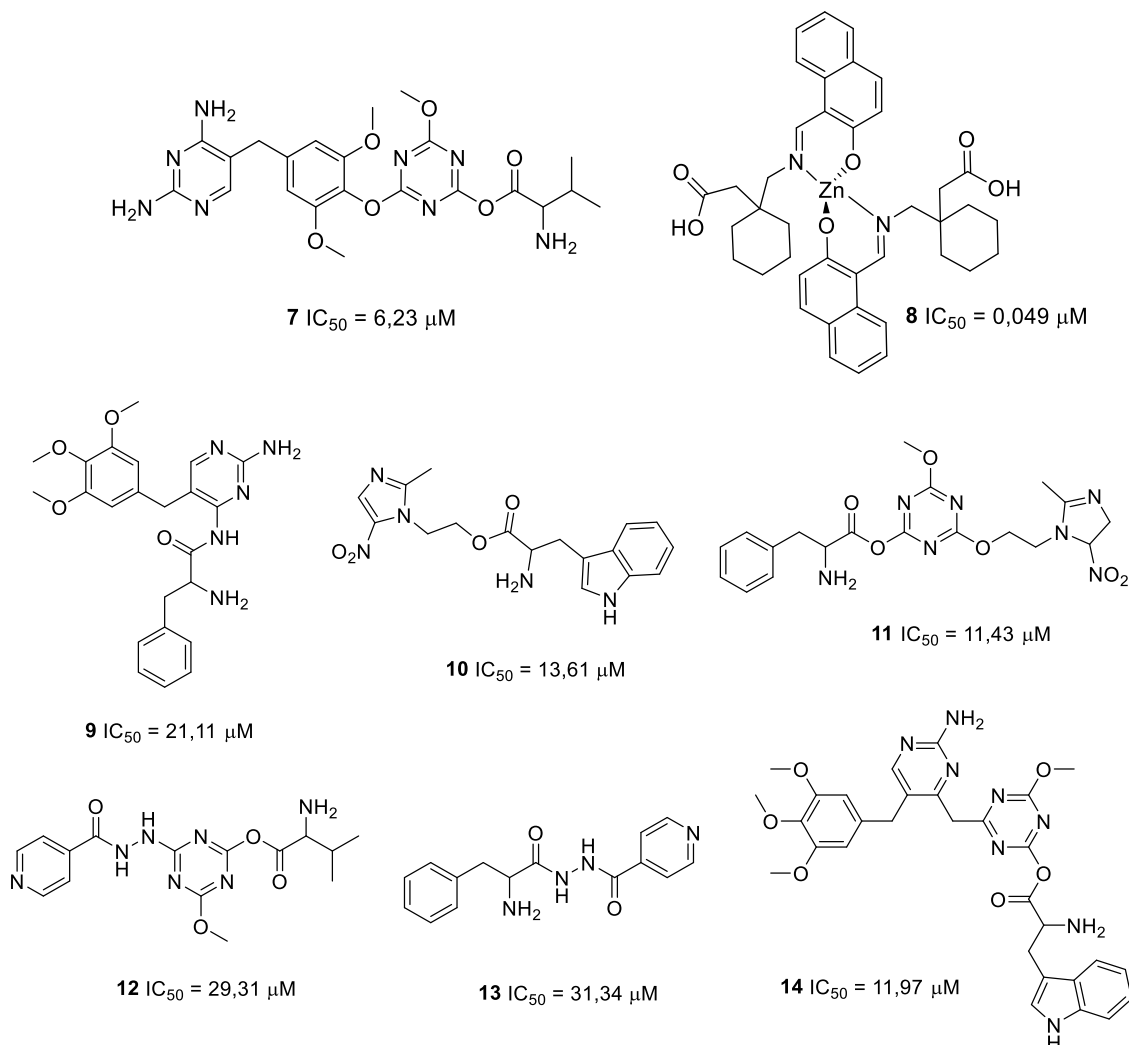
Decorrente dos estudos de novos inibidores de urease cujas estruturas continham o núcleo base do ácido hidroxâmico, em 1992 Otake *et al.*, sintetizaram diferentes derivados variando 18 aminoácidos associados sob a forma de mono ou dipeptídeo com glicina. A atividade antiureolítica desses compostos foi testada para a enzima purificada de *C. ensiformes* com os valores de IC<sub>50</sub> variando de 1,8 à 35 mM, sendo os mais ativos de cada classe, mono e dipeptídeo, apresentadas na Figura 6.<sup>76</sup>

Figura 6. Representação de estruturas químicas de reconhecidos inibidores de urease derivados do ácido hidroxâmico



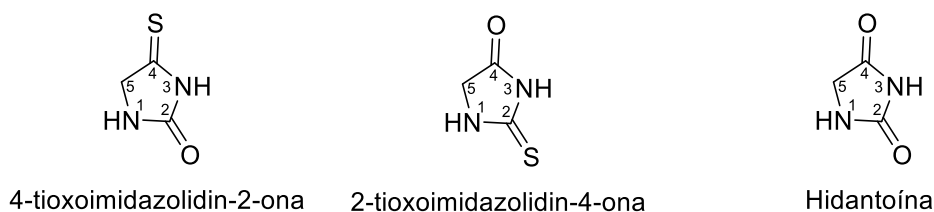
Mais recentemente Ullah *et al.* sintetizaram 21 compostos divididos em 7 híbridos distintos contendo valina, triptofano e fenilalanina como aminoácidos precursores. A inibição da atividade ureolítica foi estudada frente a enzima isolada de *Bacillus pasteurii* e a tioureia foi usada como inibidor de referência (IC<sub>50</sub> = 21 μM). Na Figura 7 (pg. 37) estão representados os inibidores mais ativos para cada classe dos híbridos visto que, o valor de IC<sub>50</sub> variou de 6,23 à 52,41 μM.<sup>77</sup> Alguns derivados de aminoácidos também foram utilizados como ligantes na obtenção de complexos que possuem atividades promissoras frente a enzima urease como os complexos sintetizados por Ikram *et al.* em que o complexo de zinco foi o mais ativo entre os compostos sintetizados.<sup>78</sup>

Figura 7. Representação de estruturas químicas de reconhecidos inibidores de urease derivados de aminoácidos



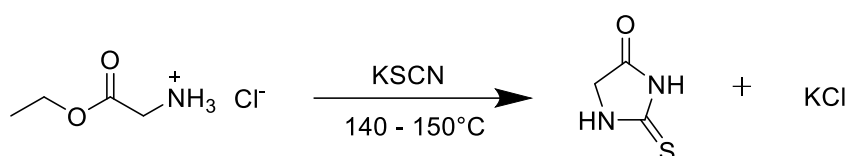
A utilização de aminoácidos como reagentes de partida na síntese de novas moléculas de interesse biológico é uma estratégia eficiente quando se deseja inserir um centro estereogênico no produto final. Além disso, a partir dos aminoácidos é possível obter heterociclos, por exemplo tioidantoinas que são caracterizados por possuírem um anel de cinco membros do tipo 2-tioxi-imidazolidinonas em que a carbonila está localizada na posição 2 ou 4 do anel (Figura 8, pg. 38).<sup>79</sup>

Figura 8. Representação do núcleo base para tioidantoínas e hidantoínas



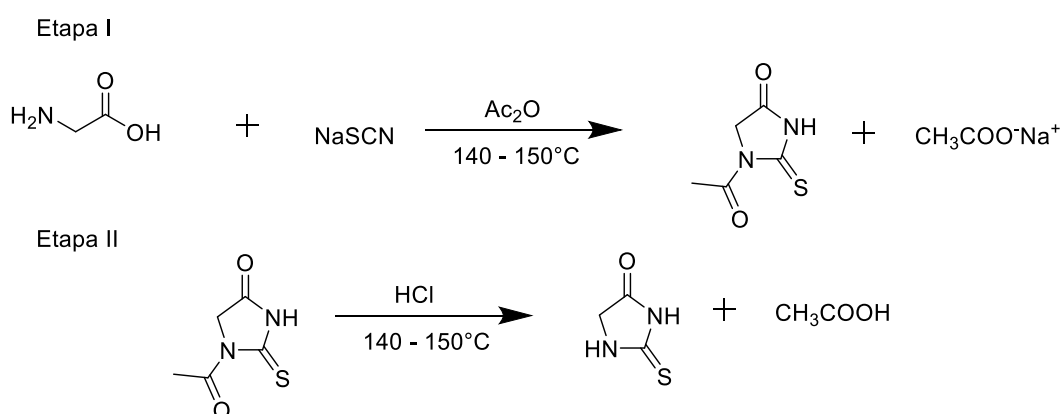
A síntese das tioidantoínas foi descrita em 1890 quando Klason reagiu hidrocloreto de etil-aminoacetato com tiocianato de potássio (Figura 9).<sup>79</sup>

Figura 9. Obtenção de tioidantoína por metodologia proposta por Klason *et al.*



Após 21 anos, as tioidantoínas foram obtidas pela primeira vez a partir de aminoácidos, por Komatsu *et al.* Estes pesquisadores reagiram glicina com tiocianato de sódio na presença de anidrido acético obtendo como produto a tioidantoína sob forma acetilada que em condições ácidas resultou no produto deacetilado de interesse (Figura 10).<sup>80</sup>

Figura 10. Obtenção de tioidantoína por metodologia proposta por Komatsu *et al.*,

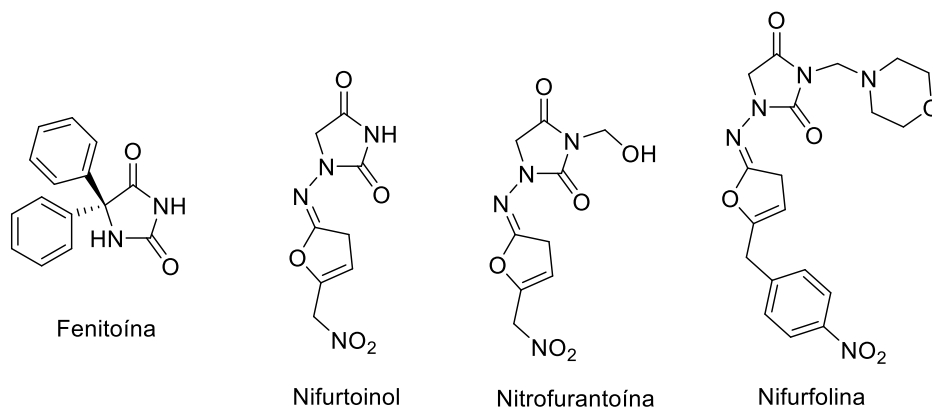


O estudo dos derivados de tioidantoínas está associado às suas atividades biológicas, a saber: antimicrobiana,<sup>81</sup> anticonvulsivante<sup>82</sup> e antiparasitária,<sup>83</sup> além da facilidade de conversão nos compostos oxigenados correspondentes, hidantoínas (Figura 8).<sup>84</sup> Derivados de hidantoína apresentam diversas aplicações biológicas sendo encontrados em fármacos, como, por exemplo, fenitoína, nifurtinol,



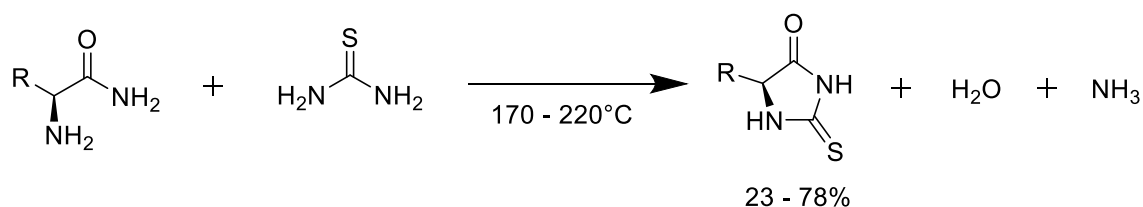
nitrofurantóina e nifurfolina (Figura 11), com exceção do primeiro que apresenta propriedade anticonvulsivante e é empregado no tratamento de crises epilépticas, os demais possuem propriedades antibacteriana e antisséptica.<sup>79,85</sup>

Figura 11. Representação de hidantoínas utilizadas como fármacos



Em 2006, Wang *et al.* desenvolveram uma metodologia para obtenção de tioidantoinicos a partir de diferentes aminoácidos em uma única etapa na ausência de solventes (Figura 12).<sup>86</sup>

Figura 12. Obtenção de tioidantoina por metodologia proposta por Wang *et al.*



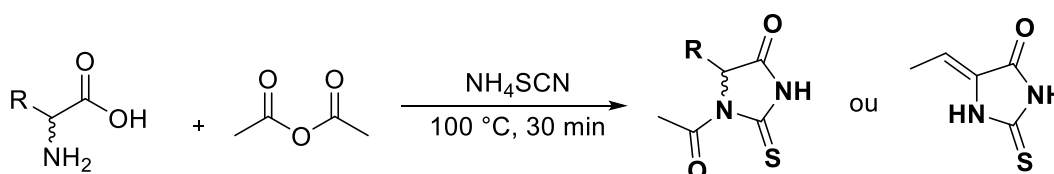
Decorrente da já relatada atividade anti-ureolítica de derivados de aminoácidos e a facilidade de modificação estrutural dos mesmos propõe-se neste trabalho, a obtenção de tioidandoinas derivadas de aminoácidos que apresentem a capacidade de reduzir a volatilização de amônia no uso de ureia como fertilizante e que possam ser empregados na erradicação da bactéria *H. pylori*.

## 2. Objetivos específicos

- Síntese e caracterização de acetil-tioidantóinas derivadas da valina, triptofano e treonina (DAac);
- Síntese e caracterização de tioidantóinas derivadas da valina, triptofano e treonina (DA);
- Avaliação da atividade antibacteriana dos compostos sintetizados e dos aminoácidos frente a *C. ensiformis*.
- Avaliação do derivado de aminoácido mais eficiente em teste de volatilização de amônia.

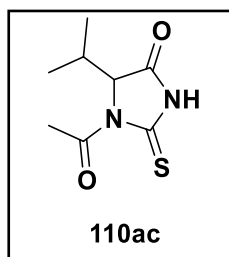
## Procedimentos experimentais

### 2.1 Síntese das acetil-tioidantóinas



R = *i*-Pr ou  $\text{CH}_3$ -3-indol

As acetil-tioidantóinas foram preparadas por meio da metodologia descrita por Reyes e Burgess (2006).<sup>87</sup> Desta forma, 13,3 mmol do aminoácido e 13,3 mmol do tiocianato de amônio ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ ) foram adicionados a um balão de fundo redondo de 50 mL juntamente com 7,5 mL (79,3 mmol) de anidrido acético. A mistura foi mantida sob agitação a  $100\text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 min e após confirmação do término da reação por CCD, foram adicionados, aproximadamente, 20 mL de água/gelo ao sistema, que foi mantido em geladeira por 24 horas. Após este tempo os cristais formados foram filtrados, lavados com água gelada e secos sob vácuo durante 24 horas.



Fórmula Molecular: C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S

Aspecto: sólido amarelo claro

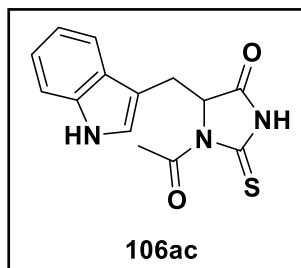
Rendimento: 49 - 54%

Temperatura de Fusão: 104,5 – 109,3 °C (Lit. 107-110 °C)<sup>85</sup>

IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3130, 1770, 1676, 1470, 1286, 1216, 1078, 1378, 1358, 1346, 826.

Tabela 1. Sinais observados no espectro de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C da tioidantofina sintetizada (**110ac**) e os descritos na literatura

| <b>RMN de <sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub></b>  |           |          |              | <b>RMN de <sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub><br/>(Carvalho et al., 2018)<sup>85</sup></b>  |           |          |               |
|---|-----------|----------|--------------|--|-----------|----------|---------------|
| <b>δ(ppm)</b>   | <b>M</b>  | <b>I</b> | <b>J(Hz)</b> | <b>δ(ppm)</b>  | <b>M</b>  | <b>I</b> | <b>J (Hz)</b> |
| 0,75  | <i>d</i>  | 3        | 7,0          | 0,76   | <i>d</i>  | 3        | 6,9           |
| 1,05  | <i>d</i>  | 3        | 7,0          | 1,08   | <i>d</i>  | 3        | 7,0           |
| 2,39-2,46   | <i>m</i>  | 1        | -            | 2,39-2,42  | <i>m</i>  | 1        | -             |
| 2,72  | <i>s</i>  | 3        | -            | 2,73   | <i>s</i>  | 3        | -             |
| 4,57  | <i>d</i>  | 1        | 3,4          | 4,58   | <i>d</i>  | 1        | 3,4           |
| 12,60   | <i>sl</i> | 1        | -            | 12,63  | <i>sl</i> | 1        | -             |
| <b>RMN de <sup>13</sup>C, 100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub></b> |           |          |              | <b>RMN de <sup>13</sup>C, 100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub><br/>(Carvalho et al., 2018)<sup>85</sup></b> |           |          |               |
| δ: 15,4; 17,4; 27,3; 28,9; 66,7; 169,7; 172,1; 182,8.     |           |          |              | δ: 15,8; 17,9; 27,8; 29,4; 67,2; 170,2; 172,7; 183,3.  |           |          |               |



Fórmula Molecular: C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S

Aspecto: sólido marrom claro

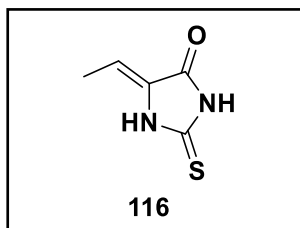
Rendimento: 82-94%

Temperatura de Fusão: 152,0 – 154,3 °C (Lit. 163 – 165 °C)<sup>85</sup>

IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3394, 3124, 1758, 1676, 1336, 1230, 750.

Tabela 2. Sinais observados no espectro de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C da thiohidantoina sintetizada (**106ac**) e os descritos na literatura

| <b>RMN de <sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub></b>  |          |          |               | <b>RMN de <sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub></b><br>(Carvalho et al., 2018) <sup>85</sup>  |          |          |               |
|---|----------|----------|---------------|--|----------|----------|---------------|
| <b>δ (ppm)</b>  | <b>M</b> | <b>I</b> | <b>J (Hz)</b> | <b>δ (ppm)</b>   | <b>M</b> | <b>I</b> | <b>J (Hz)</b> |
| 2,67  | s        | 3        | -             | 2,68   | s        | 3        | -             |
| 3,28  | dd       | 1        | 2,4; 14,8     | 3,33   | dd       | 1        | 2,5; 14,8     |
| 3,52  | dd       | 1        | 5,5; 14,8     | 3,55   | dd       | 1        | 5,6; 14,8     |
| 4,97  | dd       | 1        | 2,4; 5,5      | 4,99   | dd       | 1        | 2,5; 5,5      |
| 6,94-6,98   | m        | 2        | -             | 6,95-7,08  | m        | 3        | -             |
| 7,03-7,06   | m        | 1        | -             |  |          |          | -             |
| 7,33  | dd       | 2        | 8,0; 16,6     | 7,35   | dd       | 2        | 7,67; 16,3    |
| 10,94   | s        | 1        | -             | 10,97  | s        | 1        | -             |
| 12,28   | s        | 1        | -             | 12,30  | s        | 1        | -             |
| <b>RMN de <sup>13</sup>C, 100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub></b>   |          |          |               | <b>RMN de <sup>13</sup>C, 100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub></b><br>(Carvalho et al., 2018) <sup>85</sup> |          |          |               |
| δ: 24,7; 27,4; 63,6; 106,3; 111,4; 118,0; 118,6; 121,0; 124,1; 127,3; 135,8; 170,1; 173,2; 182,4. |          |          |               | δ: 25,1; 27,9; 64,1; 106,8; 111,9; 118,5; 119,1; 121,5; 124,6; 127,8; 136,3; 170,54; 173,7; 182,9. |          |          |               |



Fórmula Molecular: C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>OS

Aspecto: sólido amarelo claro

Rendimento: 48-52%

Temperatura de Fusão\*: 244,7 – 249,7 °C (Lit. 252 – 255 °C)<sup>85</sup>

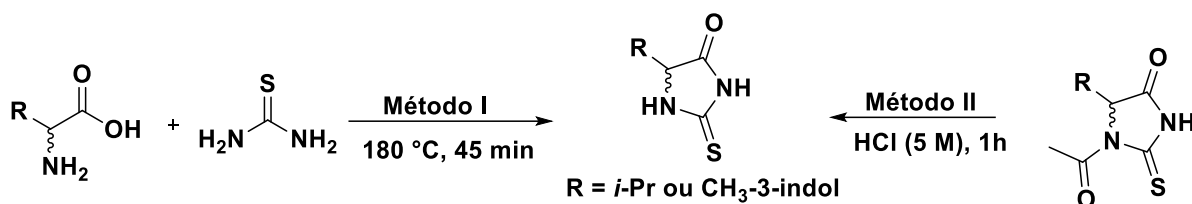
IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3236, 3138, 1724, 1674, 1516, 1374, 1332, 1256, 1186, 1144, 752.

\* Apesar de coincidir com a literatura, na medição, aparentemente, houve decomposição da amostra sendo necessários estudos via técnica termogravimétrica.

Tabela 3. Sinais observados no espectro de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C da tioidantoína sintetizada (**116**) e descritos na literatura

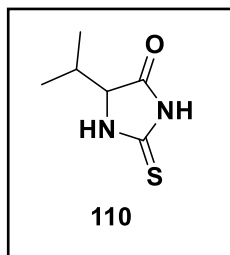
| <b>RMN de <sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub></b> |          |          |               | <b>RMN de <sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub></b><br>(Carvalho <i>et al.</i> , 2018) <sup>85</sup> |          |          |               |
|--|----------|----------|---------------|---|----------|----------|---------------|
| <b>δ (ppm)</b>   | <b>M</b> | <b>I</b> | <b>J (Hz)</b> | <b>δ (ppm)</b>  | <b>M</b> | <b>I</b> | <b>J (Hz)</b> |
| 1,84   | <i>d</i> | 3        | 7,6           | 1,86  | <i>d</i> | 3        | -             |
| 5,70   | <i>q</i> | 1        | 7,6           | 5,71  | <i>q</i> | 1        | 7,68          |
| 11,90  | <i>s</i> | 1        | -             | 11,92   | <i>s</i> | 1        | -             |
| 12,04  | <i>s</i> | 1        | -             | 12,06   | <i>s</i> | 1        | -             |
| <b>RMN de <sup>13</sup>C, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub></b>  |          |          |               | <b>RMN de <sup>13</sup>C, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub></b><br>(Carvalho <i>et al.</i> , 2018) <sup>85</sup>  |          |          |               |
| δ: 12,6; 111,7; 131,8; 164,2; 178,0.                     |          |          |               | δ: 13,01; 112,18; 132,23; 164,62; 178,45.   |          |          |               |

## 2.2 Síntese das tioidantoínas



As tioidantoínas foram preparadas por duas metodologias distintas. A partir da otimização das condições propostas por Wang *et al.*, método I do esquema acima, uma mistura de 10 mmol do aminoácido e 30 mmol de tiourea foi adicionada a um balão de 50 mL de fundo redondo e mantida sob agitação e aquecimento a 180 °C.<sup>86</sup> Após completa solubilização do aminoácido na tiourea fundida (Tf 175 – 178 °C), o sistema foi mantido a 180 °C por 45 minutos e o fim da reação foi confirmado por CCD. Em seguida, enquanto o balão resfriava até a temperatura ambiente foram adicionados 12,5 mL de água destilada, quando houve a formação de precipitado, o sistema foi aquecido até completa solubilização, aguardou-se o resfriamento e o balão foi mantido em geladeira por 24 h. Os cristais obtidos foram filtrados com o auxílio de uma bomba a vácuo e lavados com água gelada e em seguida secos sob vácuo.

A segunda metodologia, método II do esquema acima, para obtenção das tioidantoínas foi realizada uma reação de desacetilação com 1 mmol de acetil-tioidantoínas obtidas anteriormente e 15 mL de uma solução 5M de ácido clorídrico, mantidas sob agitação e aquecimento a 100 °C por 60 minutos. Em seguida, o sistema foi resfriado até a temperatura ambiente ( $\cong$  25 °C) e a fase orgânica extraída três vezes com 20 mL de acetato de etila. Após remoção de água com sulfato de magnésio anidro (MgSO<sub>4</sub>), o produto de interesse foi obtido pela remoção de voláteis à pressão reduzida.



Fórmula Molecular: C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>OS

Aspecto: sólido amarelo claro

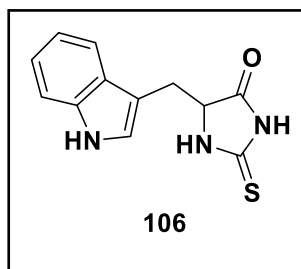
Rendimento: 65-68%

Temperatura de Fusão: 135,2 – 139,5 °C (Lit. 134 – 136 °C)<sup>85</sup>

IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3272, 3184, 1728, 1698, 1522, 1382, 1164, 1332, 1322, 736.

Tabela 4. Sinais observados no espectro de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C da tioindolína sintetizada (**110**) e os descritos na literatura

| <b>RMN de <sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub></b>  |           |          |               | <b>RMN de <sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub><br/>(Carvalho et al. 2018)<sup>85</sup></b>  |          |          |               |
|---|-----------|----------|---------------|---|----------|----------|---------------|
| <b>δ (ppm)</b>  | <b>M</b>  | <b>I</b> | <b>J (Hz)</b> | <b>δ (ppm)</b>  | <b>M</b> | <b>I</b> | <b>J (Hz)</b> |
| 0,80  | <i>d</i>  | 3        | 6,8           | 0,81  | <i>d</i> | 3        | 6,8           |
| 0,95  | <i>d</i>  | 3        | 7,0           | 0,95  | <i>d</i> | 3        | 6,8           |
| 2,00-2,07   | <i>m</i>  | 1        | -             | 2,00-2,07   | <i>m</i> | 1        | -             |
| 4,10  | <i>dd</i> | 1        | 0,90; 3,5     | 4,10  | <i>d</i> | 1        | 3,7           |
| 10,02   | <i>s</i>  | 1        | -             | 10,10   | <i>s</i> | 1        | -             |
| 11,62   | <i>sl</i> | 1        | -             | -   | -        | -        | -             |
| <b>RMN de <sup>13</sup>C, 100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub></b> |           |          |               | <b>RMN de <sup>13</sup>C, 100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub><br/>(Carvalho et al. 2018)<sup>85</sup></b> |          |          |               |
| δ: 16,1; 18,2; 29,9; 65,5; 175,9; 182,9.                  |           |          |               | δ: 16,5; 18,7; 30,4; 66,2; 176,4; 183,4.  |          |          |               |



Fórmula Molecular: C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>OS

Aspecto: sólido marrom claro

Rendimento: 71-76%

Temperatura de Fusão: 166,0 – 163,3 °C (Lit. 196,2 – 204,8 °C)<sup>85</sup>

IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3372, 3166, 1748, 1532, 1292, 1158, 746.

Tabela 5. Sinais observados no espectro de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C da tioindantoina sintetizada (**106**) e os descritos na literatura

| <b>RMN de <sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub></b>                                |          |          |               | <b>RMN de <sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub></b><br>(Carvalho et al. 2018) <sup>85</sup>  |           |          |               |
|---|----------|----------|---------------|---|-----------|----------|---------------|
| <b>δ (ppm)</b>  | <b>M</b> | <b>I</b> | <b>J (Hz)</b> | <b>δ (ppm)</b>  | <b>M</b>  | <b>I</b> | <b>J (Hz)</b> |
| 3,07-3,18   | <i>m</i> | 2        | -             | 3,08-3,19   | <i>m</i>  | 2        | -             |
| 4,51-4,53   | <i>m</i> | 1        | -             | 4,53  | <i>dd</i> | 1        | 4,24; 4,9     |
| 6,94-6,99   | <i>m</i> | 1        | -             | 6,95-7,00   | <i>m</i>  | 1        | -             |
| 7,03-7,07   | <i>m</i> | 1        | -             | 7,04-7,08   | <i>m</i>  | 1        | -             |
| 7,10  | <i>d</i> | 1        | 2,3           | 7,11  | <i>d</i>  | 1        | 2,4           |
| 7,30-7,32   | <i>m</i> | 1        | -             | 7,31-7,33   | <i>m</i>  | 1        | -             |
| 7,54  | <i>d</i> | 1        | 7,9           | 7,55  | <i>d</i>  | 1        | 7,9           |
| 10,04   | <i>s</i> | 1        | -             | 10,06   | <i>s</i>  | 1        | -             |
| 10,90   | <i>s</i> | 1        | -             | 10,91   | <i>s</i>  | 1        | -             |
| 11,35   | <i>s</i> | 1        | -             | 11,37   | <i>s</i>  | 1        | -             |
| <b>RMN de <sup>13</sup>C, 100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub></b>                               |          |          |               | <b>RMN de <sup>13</sup>C, 100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub></b><br>(Carvalho et al. 2018) <sup>85</sup> |           |          |               |
| δ: 25,7; 61,3; 107,4; 111,2; 118,4; 118,5;<br>120,9; 124,1; 127,3; 135,8; 176,2; 182,4. |          |          |               | δ: 26,1; 61,8; 107,8; 111,7; 118,8; 121,3;<br>124,6; 127,8; 136,3; 176,7; 182,8.                  |           |          |               |

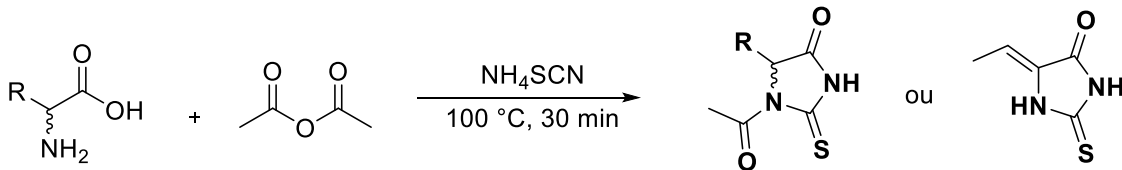


### 3. Resultados e Discussões

#### 3.1 Síntese das acetil-tioidantoínas e tioidantoínas

Derivados de aminoácidos sob a forma de tioidantoínas e suas respectivas estruturas acetiladas são compostos que vem sendo estudados em nosso grupo de pesquisa para diferentes aplicações, como por exemplo, avaliação da atividade antibacteriana.<sup>85</sup> As acetil-tioidantoínas provenientes dos enantiômeros e do racemato do triptofano e valina foram obtidas com rendimentos moderados, porém condizentes com a literatura.<sup>85</sup> A tioidantoína derivada da treonina obtida da desidratação catalisada pelo ácido gerado no meio, obtido com rendimento moderado (Tabela 6).

Tabela 6. Rendimento das sínteses das acetil-tioidantoínas e do produto 116 pela metodologia de Reyes e Burgess<sup>87</sup>

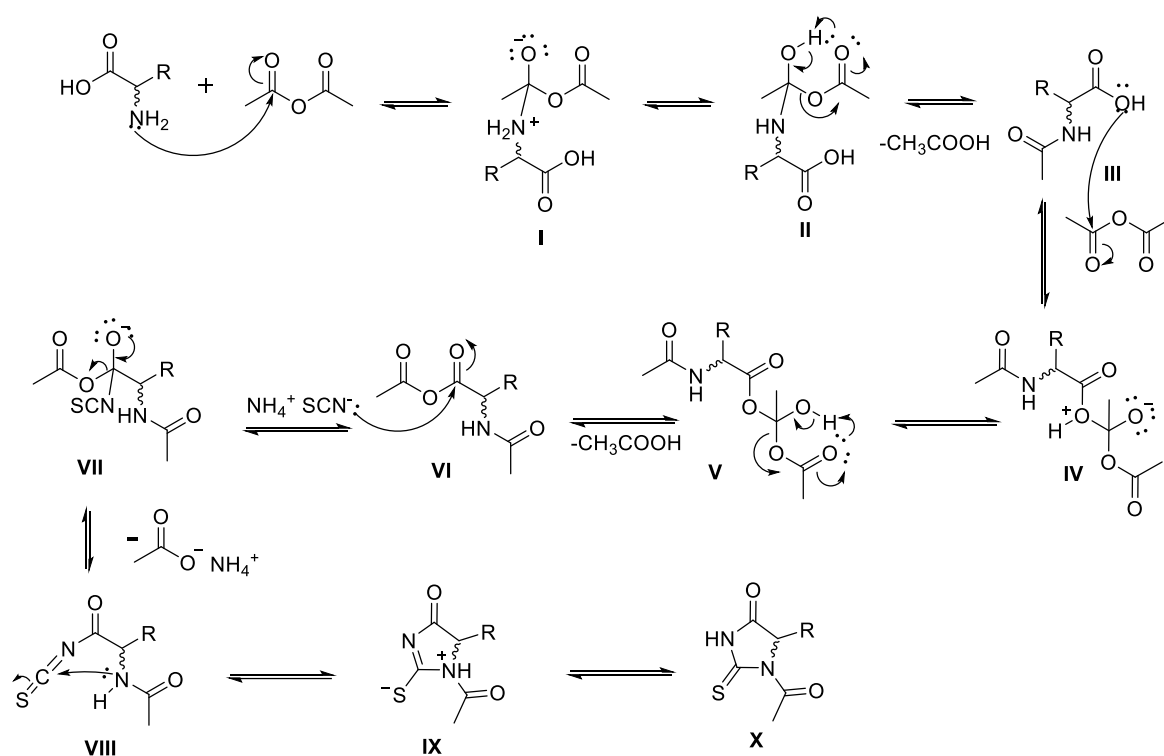


| Produto          | Aminoácido     | R                        | Rendimento |
|------------------|----------------|--------------------------|------------|
| <b>110ac-L</b>   | L-Valina       | <i>i</i> -Pr             | 49 %       |
| <b>110ac-D</b>   | D-Valina       | <i>i</i> -Pr             | 48 %       |
| <b>110ac-L/D</b> | L/D-Valina     | <i>i</i> -Pr             | 54 %       |
| <b>106ac-L</b>   | L-Triptofano   | CH <sub>2</sub> -3-indol | 92%        |
| <b>106ac-D</b>   | D-Triptofano   | CH <sub>2</sub> -3-indol | 79%        |
| <b>106ac-L/D</b> | L/D-Triptofano | CH <sub>2</sub> -3-indol | 54 %       |
| <b>116</b>       | L-Treonina     | CHOHCH <sub>3</sub>      | 50%        |

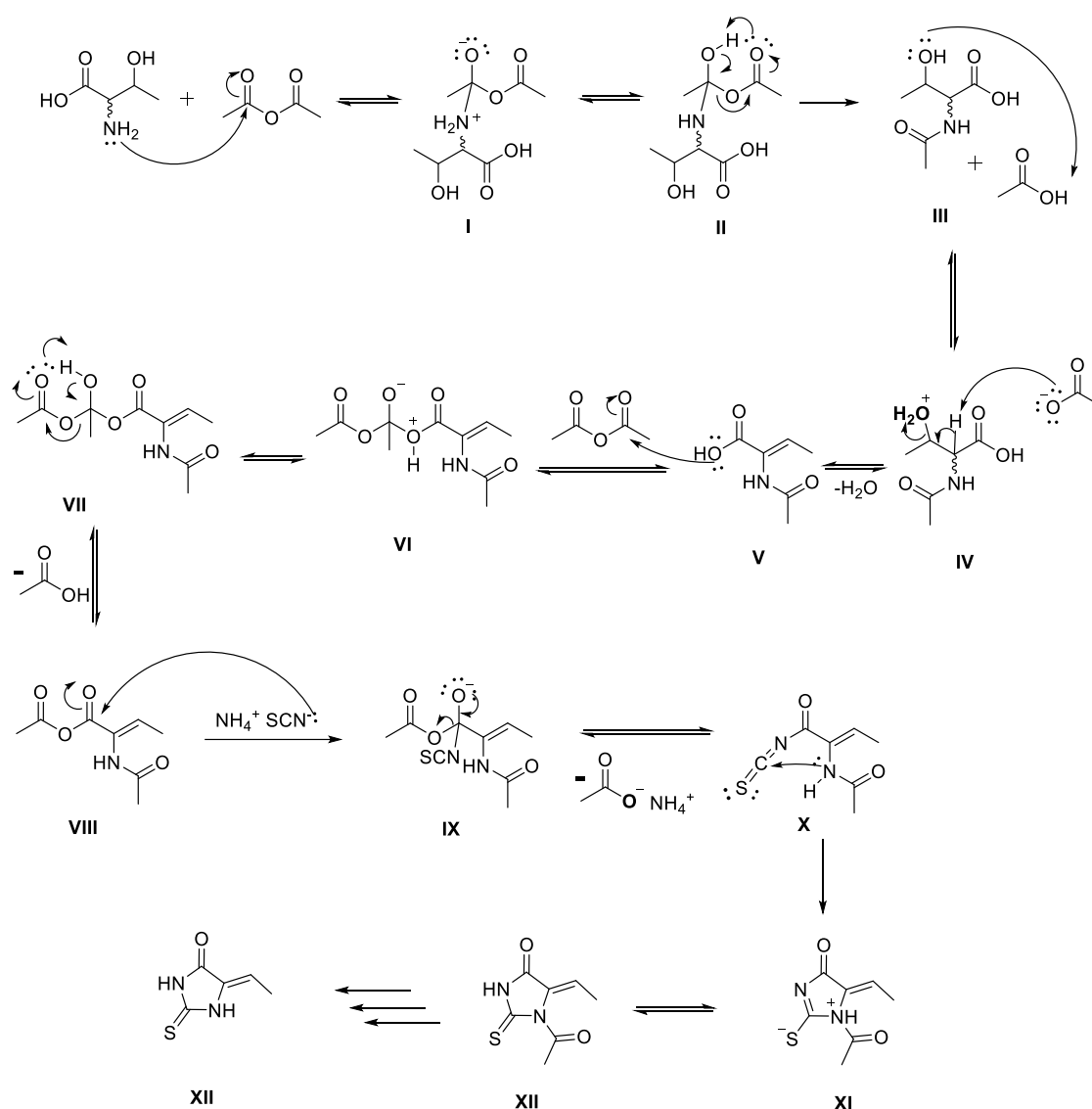
O mecanismo proposto para essa reação (Esquema 3, pg. 48) baseia-se no ataque do grupo amino do aminoácido à carbonila do anidrido acético resultando na formação do intermediário **I**. Após a transferência de próton, o par de elétrons do oxigênio assiste a saída de uma molécula de ácido acético formando o respectivo aminoácido acetilado. Em seguida, a hidroxila do aminoácido acetilado ataca outra molécula de anidrido acético dando origem ao intermediário **IV** que após transferência de próton, perde uma molécula de ácido acético formando o intermediário **VI**. O nitrogênio do tiocianato ataca a carbonila mais deficiente em carga do intermediário **VI**, a fim de se restabelecer a neutralidade da molécula, o par de elétrons do oxigênio

assiste a saída do acetato que provavelmente será estabilizado pelo contra íon amônio. Por fim, tem-se a etapa de ciclização em que o nitrogênio proveniente do aminoácido ataca o carbono do isotiocianato resultando no intermediário **IX** que após etapa ácido-base forma o produto de interesse.

Esquema 3. Mecanismo proposto para obtenção das acetil-tioidantoínas **106** à **110**



A formação da tioidantoína proveniente da treonina não passa pelo mecanismo proposto acima. Como discutido por Carvalho *et al.*, a treonina apresenta uma hidroxila  $\beta$  à carbonila, propensa a sofrer eliminação favorecida pelo fato da reação se proceder em meio ácido. Sendo assim, o mecanismo seguido para obtenção da tioidantoína derivada da treonina segue o proposto, Esquema 4, pg. 49.

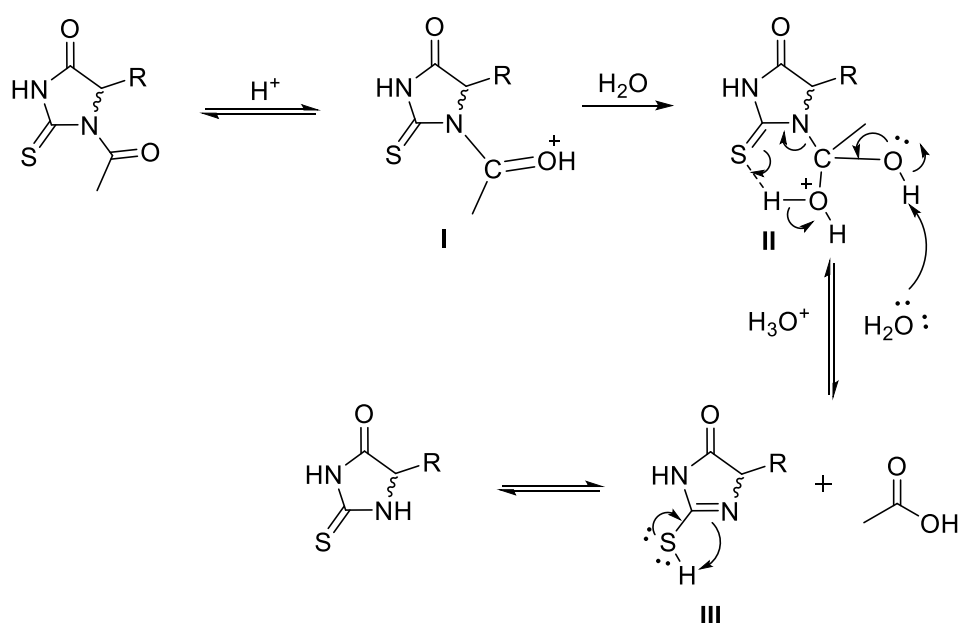
Esquema 4. Mecanismo proposto para obtenção da tioidantoína **116**

A principal modificação no mecanismo é a protonação da hidroxila  $\beta$  à carbonila que é protonada pelo ácido acético proveniente do anidrido, intermediário **IV**, resultando na eliminação da molécula de água e consequente formação da ligação  $\pi$  carbono-carbono, intermediário **V**, dando fim ao centro estereogênico tetraédrico no átomo de carbono. Vale ressaltar que no próprio meio tem-se a desacetilação formando a tioidantoína **XII** (**116**).

As tioidantoínas também foram obtidas por diferentes metodologias, a partir da desacetilação das acetil-tioidantoínas. O mecanismo desta reação foi estudado e proposto por Congdon e Edwar (Esquema 5, pg. 50).<sup>88</sup> Em meio ácido, a acetil-tioidantoína encontra-se protonada, essa carga está distribuída sobre os átomos de nitrogênio, carbono e oxigênio. Como o meio de reação é composto por uma solução

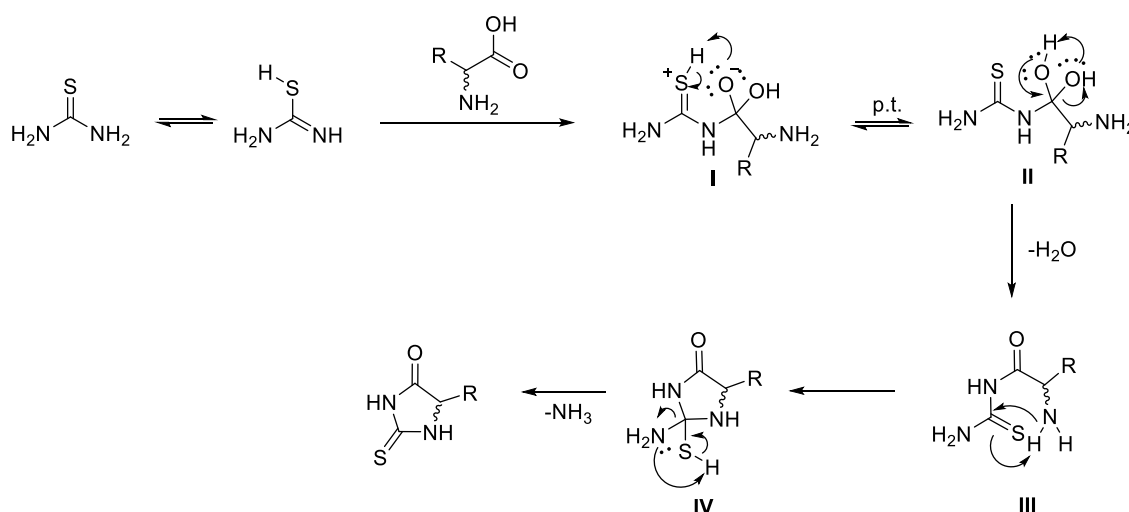
de ácido forte, HCl, tem-se também a presença de moléculas de água que contribuem para estabilização da tioidantoína protonada (II). O par de elétrons do oxigênio do acetil migra para ligação carbono-oxigênio, simultaneamente tem-se a quebra da ligação carbono-nitrogênio e abstração do hidrogênio proveniente da molécula de água pelo átomo de enxofre favorecendo a saída do ácido acético formando a tioidantoína correspondente.

Esquema 5. Mecanismo proposto para desacetilação das aceti-tioidantoínas **106** à **110**



Com a finalidade de aplicar alguns conceitos da química “verde”, reduzindo o número de etapas e consequentemente a quantidade de reagentes e resíduos/subprodutos, as tioidantoínas também foram obtidas pela metodologia proposta por Wang *et al.*<sup>86</sup> O mecanismo proposto pelos autores consiste no ataque do par de elétrons de um dos nitrogênios da tioureia à carbonila do aminoácido (Esquema 6, pg. 51). Após a etapa de prototropismo, a saída de uma molécula de água dá origem à formação da ligação amida (III), em seguida, tem-se a etapa de ciclização em que o par de elétrons do grupo  $\alpha$ -amino a carbonila ataca a tiocarbonila dando origem ao intermediário IV que ao perder uma molécula de amônia forma o produto de interesse.

Esquema 6. Mecanismo proposto para obtenção das tioidantoínas 106 e 110 partindo-se da tiourea.



As tioidantoínas foram obtidas com diferentes rendimentos em função da metodologia empregada (Tabela 7).

Tabela 7. Rendimento para síntese das tioidantoínas pela metodologia adaptada de Wang<sup>86</sup>

| Produto        | Aminoácido     | R                        | Rendimento          |                      |
|----------------|----------------|--------------------------|---------------------|----------------------|
|                |                |                          | Met. I <sup>a</sup> | Met. II <sup>a</sup> |
| <b>110-L</b>   | L-Valina       | <i>i</i> -Pr             | 93%                 | 48%                  |
| <b>110-D</b>   | D-Valina       | <i>i</i> -Pr             | 23%                 | <sup>b</sup>         |
| <b>110-L/D</b> | L/D-Valina     | <i>i</i> -Pr             | 56%                 | <sup>b</sup>         |
| <b>106-L</b>   | L-Triptofano   | CH <sub>2</sub> -3-indol | 75%                 | 50%                  |
| <b>106-D</b>   | D-Triptofano   | CH <sub>2</sub> -3-indol | 68%                 | <sup>b</sup>         |
| <b>106-L/D</b> | L/D-Triptofano | CH <sub>2</sub> -3-indol | 71%                 | <sup>b</sup>         |
| <b>116</b>     | L-Treonina     | COHHCH <sub>3</sub>      |                     | -                    |

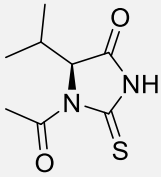
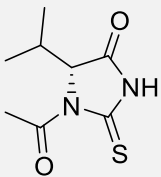
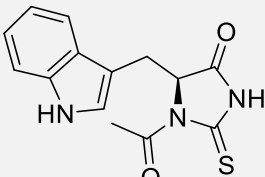
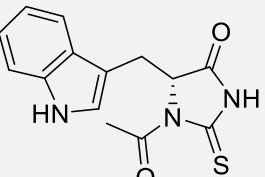
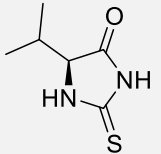
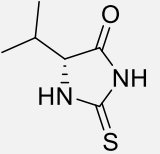
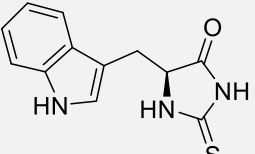
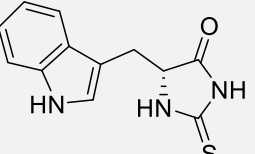
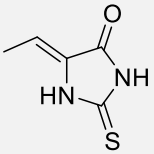
<sup>a</sup> rendimento global considerando a síntese da acetil-tioidantoína e a respectiva desacetilação <sup>b</sup> não foi sintetizado por essa metodologia.

De um modo geral, notou-se que para a L-valina, o método I foi o mais eficiente, além disso os cristais foram obtidos com elevada pureza sendo dispensável qualquer

outro processo de purificação. Por esse motivo, o método II não foi testado. Apesar do método I apresentar as suas vantagens, a síntese partindo do triptofano por esse método teve complicações nas etapas de elaboração. Quando foi adicionada água ao fim da reação, houve formação de um óleo de alta viscosidade e pegajoso sendo necessária várias etapas de purificação envolvendo solubilização a quente, com auxílio de um banho ultrassônico, seguido de resfriamento e filtração. Já a síntese pelo método II, apesar de envolver duas etapas e maior consumo de reagentes/solventes, resultou em uma elaboração mais eficiente uma vez que o sólido é obtido após remoção de solvente utilizando um evaporador rotatório.

Na Tabela 8 estão representadas as estruturas de todos compostos sintetizados com exceção do racemato (L/D) que corresponde ao produto obtido partindo da mistura racêmica do aminoácido correspondente.

Tabela 8. Representação estrutural das tioidantoínas obtidas

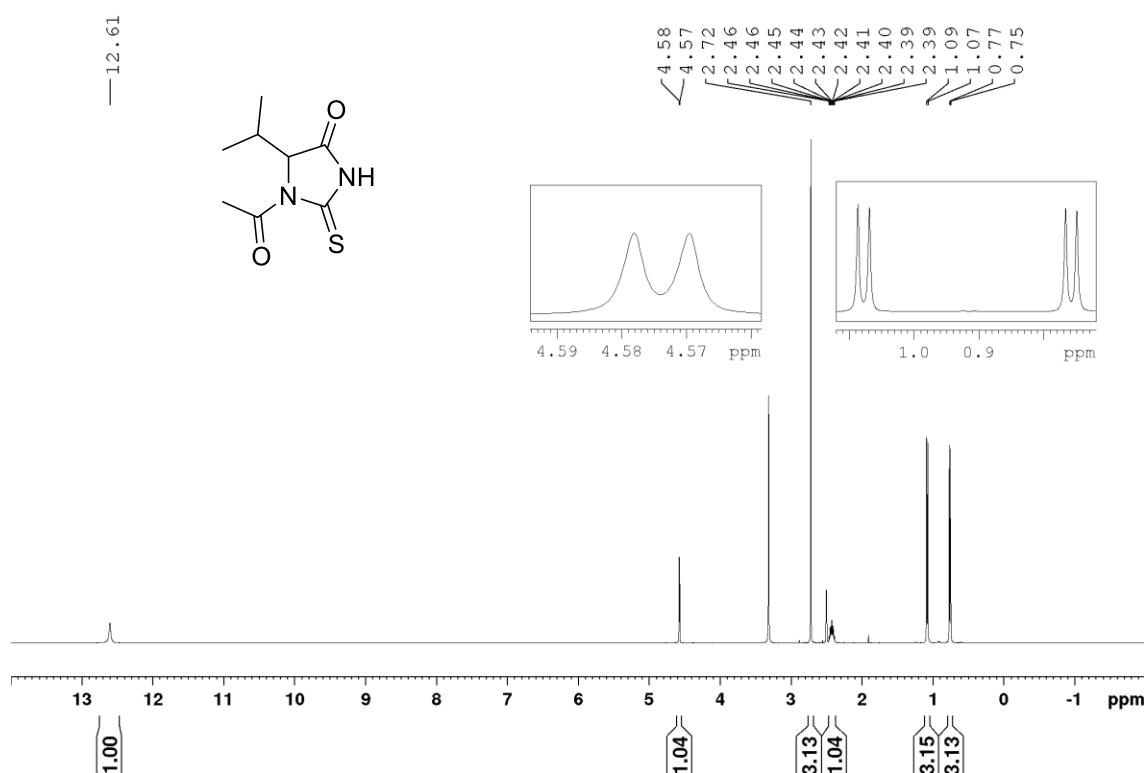
| Acetil-tioidantoínas  |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|
| 110ac-L   | 110ac-D   | 106ac-L   | 106ac-D   |   |
|  |  |  |  |   |
| Tioidantoínas   |   |   |   |   |
| 110-L   | 110-D   | 106-L   | 106-D   | 116   |
|  |  |  |   |  |

A caracterização estrutural das acetil-tioidantoínas e tioidantoínas foi realizada mediante a obtenção dos espectros de absorção na região do infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN). Para fins de ilustração, serão discutidos no texto as atribuições dos sinais referentes aos compostos provenientes da valina.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o composto **110ac** (tendo  $\text{DMSO-}d_6$  como solvente, Figura 13, pg. 53) foram observados dois dupletos em 0,76 ( $J = 6,9$  Hz) e

1,08 ( $J = 7,0$  Hz) ppm que correspondem aos hidrogênios das metilas do grupo isopropila.<sup>89</sup> Entre 2,39 e 2,42 ppm foi observado um sinal sob forma de multipletto atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono terciário do grupo isopropila, o sinal referente a esse hidrogênio tem uma multiplicidade característica devido às metilas vizinhas e ao hidrogênio ligado ao carbono estereogênico. No entanto, a multiplicidade desse sinal foi comprometida devido à sobreposição desses com o sinal residual do solvente DMSO- $d_6$ . O simpleto em 2,72 ppm integrado para três hidrogênios corresponde à metila do grupo acetila e o hidrogênio  $\alpha$ -carbonila foi observado sob a forma de um dupletto (4,57 ppm) apresentando uma constante de acoplamento igual a 3,4 Hz, condizendo com o valor relatado na literatura.<sup>85</sup> Por fim, na região menos blindada do espectro foi observado o sinal referente ao hidrogênio da amida em 12,61 ppm.

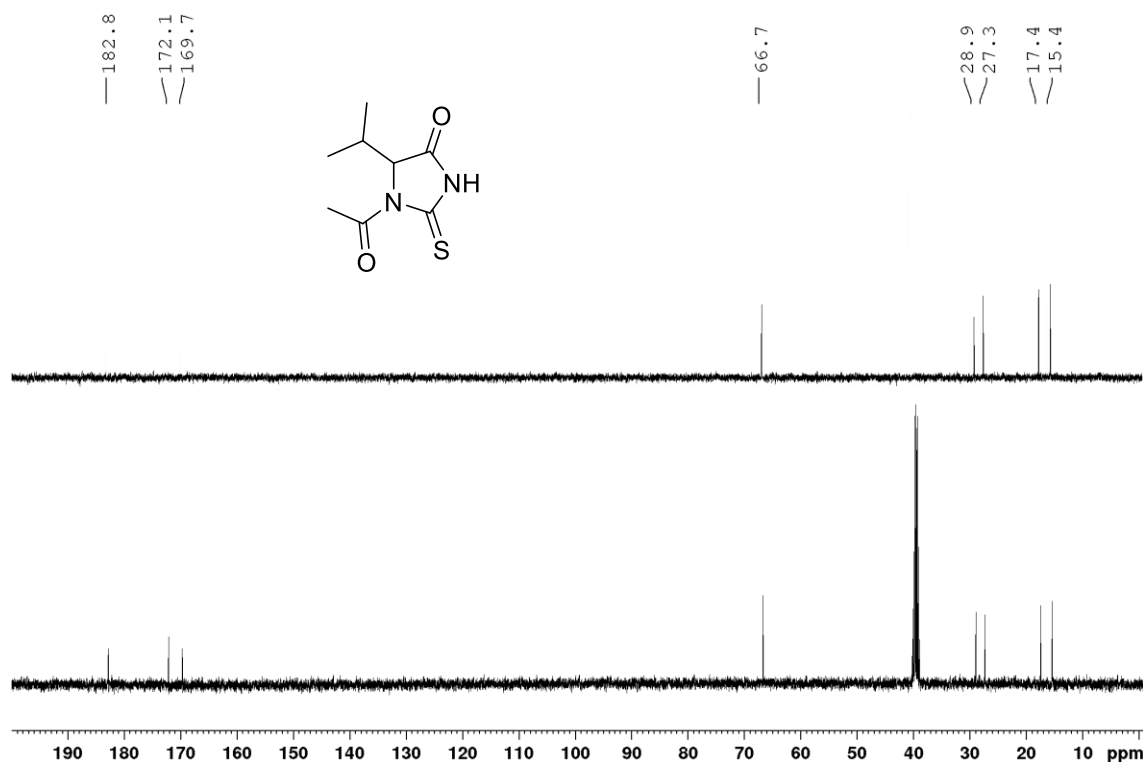
Figura 13. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) do **110ac**



No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 obtidos para o derivado **110ac** (Figura 14, pg.54) são observados os sinais referentes aos carbonos metilênicos em 15,4; 17,4 e 27,3 ppm, e em 28,9 ppm foi observado o carbono terciário do grupamento isopropila. O sinal de deslocamento químico (66,7 ppm) foi atribuído ao carbono

metínico do anel e os demais sinais foram atribuídos segundo Pretsch *et al.*, sendo: (i) o sinal em maior deslocamento químico, 169,7 ppm, referente ao carbono carbonílico do grupo acetila, (ii) o sinal em 172,1 ppm referente à carbonila proveniente do aminoácido e (iii) o sinal em maior deslocamento químico, 182,8 ppm, correspondente ao carbono do grupamento tiocarbonila.

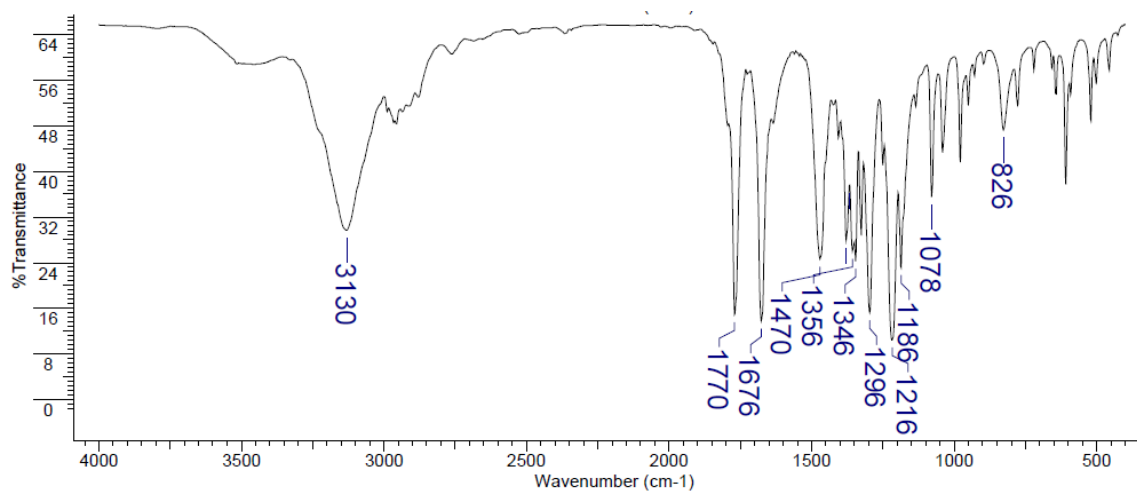
Figura 14. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (abaixo; 100 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ) e DEPT 135 (acima) do **110ac**



No espectro na região do infravermelho obtido para o composto **110ac** (Figura 15, pg. 55) foi observado em  $3130\text{ cm}^{-1}$  uma banda característica de estiramento N-H que, conseqüentemente, resulta no aparecimento das bandas atribuídas a deformação angular da respectiva ligação N-H, em  $1470$ ,  $1186$ ,  $1078\text{ cm}^{-1}$ . Com elevada intensidade, foram observadas as bandas que correspondem ao estiramento das ligações C=O das carbonilas, sendo a banda em  $1770\text{ cm}^{-1}$  atribuída à carbonila da tioidantóina e a banda em  $1676\text{ cm}^{-1}$  a carbonila da “amida”. As bandas referentes a deformação angular do grupo isopropila foram observadas em  $1356$ ,  $1346$  e  $826\text{ cm}^{-1}$ . Além das bandas referentes aos estiramentos dos grupos alquila ( $2880$ - $2988\text{ cm}^{-1}$ ) e estiramentos das ligações C-N ( $1296$ ,  $1378\text{ cm}^{-1}$ ), a banda característica que confirmou a formação do produto foi observada com maior intensidade em  $1216\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento C=S da tioureia.

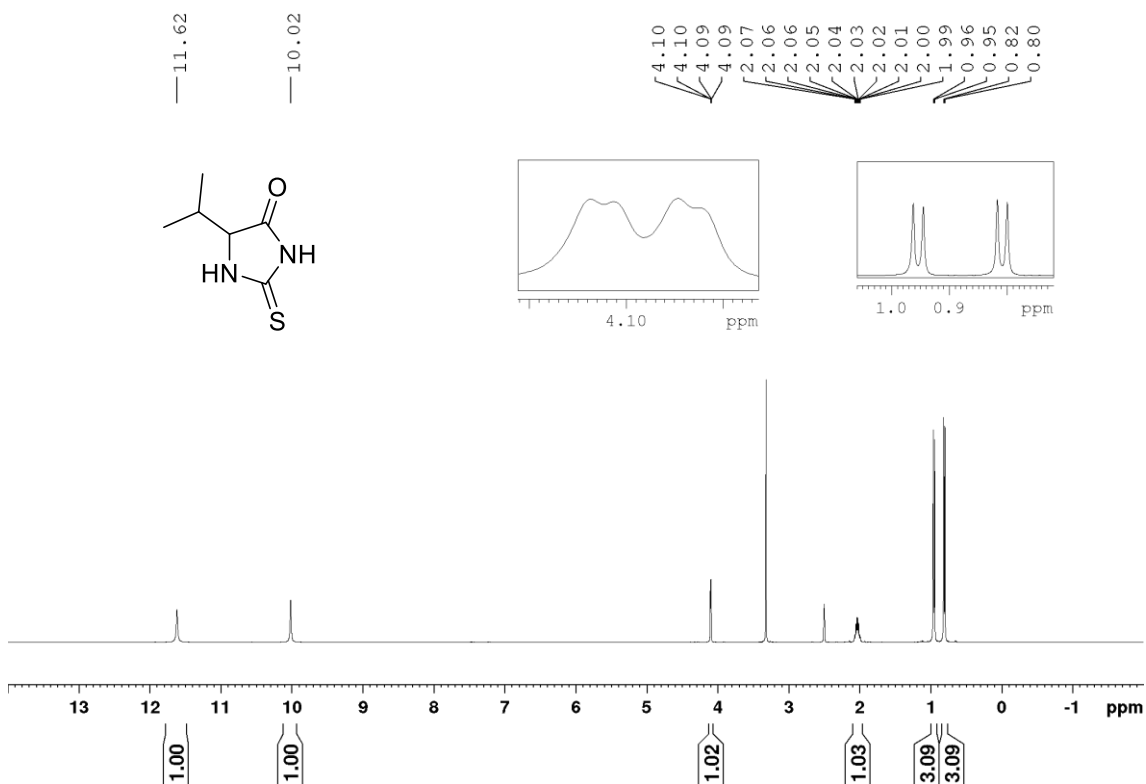


Figura 15. Espectro na região do IV (em KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) do **110ac**



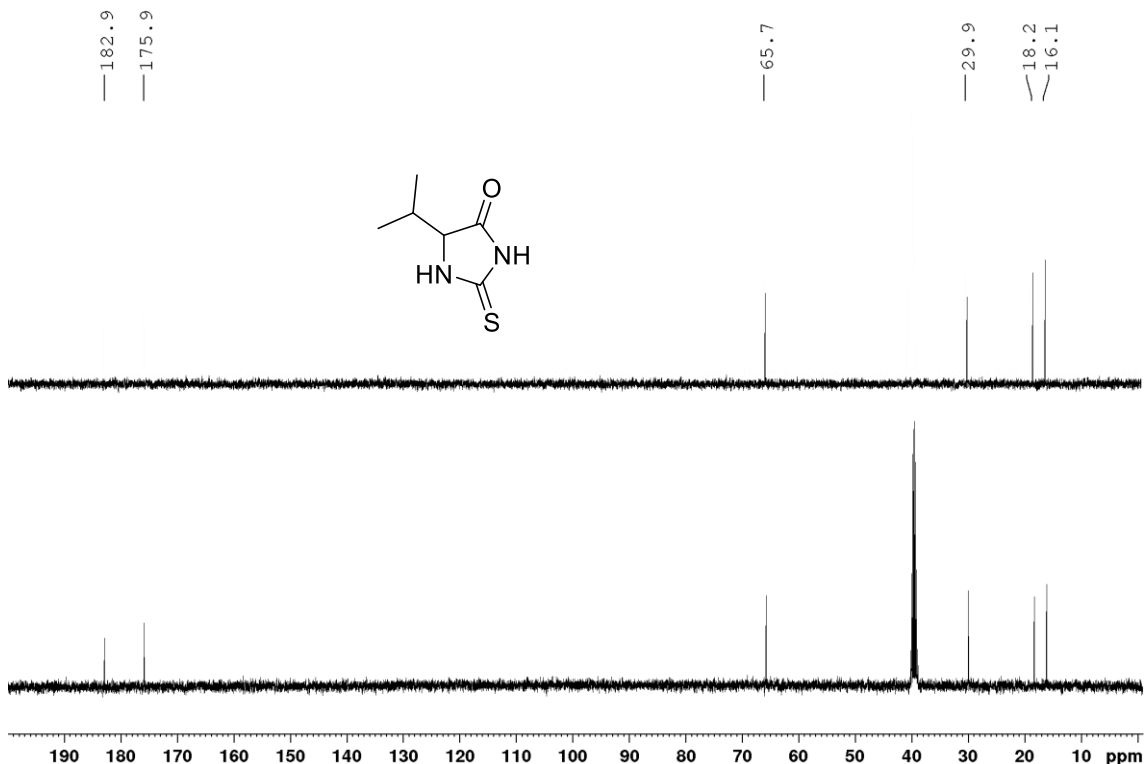
A desacetilação de **110ac** foi evidenciada no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  pela presença do simpleto em 10,02 ppm que corresponde ao átomo de hidrogênio adicional em comparação a estrutura acetilada. Além disso, em comparação ao espectro de RMN- $^1\text{H}$  para **110ac** (Figura 13, pg. 53), não se observou no RMN de  $^1\text{H}$  de **110** (Figura 16) o sinal da metila, característico do grupo acetila.

Figura 16. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do **110**

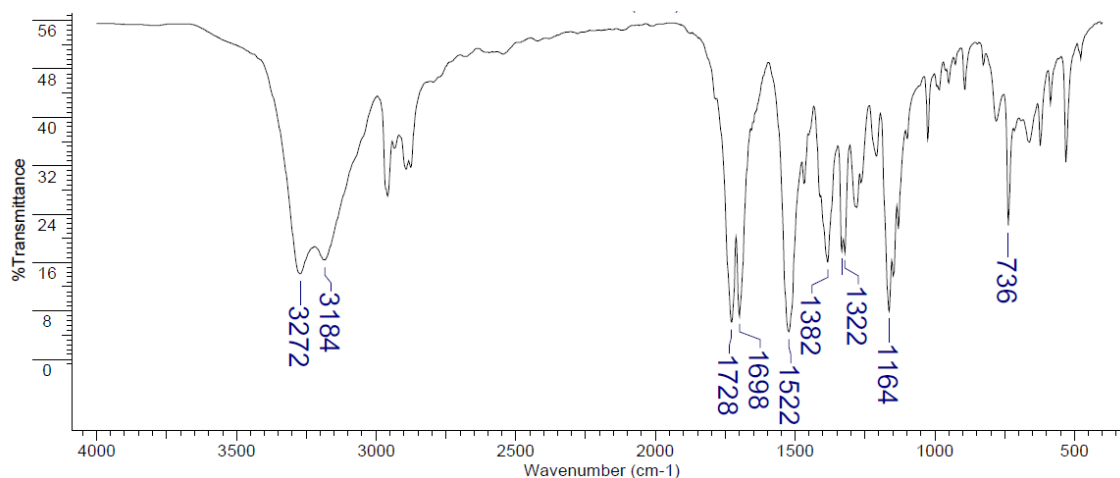


Além disso, comparando-se o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 obtido para **110ac** (Figura 14, pg. 54), nos espectros obtidos para **110** (Figura 17) não foram observados os sinais referentes ao grupo acetila.

Figura 17. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (abaixo; 100 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ) e DEPT 135 (acima) do **110**



Evidências adicionais da formação de **110** a partir de **110ac** foram observadas no espectro na região do infravermelho (Figura 18, pg. 57) que, além das bandas já discutidas anteriormente, apresentou uma banda adicional em comparação ao espectro obtido para **110ac** (Figura 15, pg. 55), característica do estiramento N-H ( $3272$  e  $3184\text{ cm}^{-1}$ ).

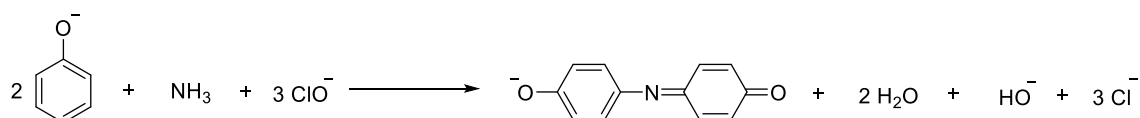
Figura 18. Espectro na região do IV (em KBr, cm<sup>-1</sup>) do **110**

Os dados de caracterização para os demais derivados de aminoácidos encontram-se nas páginas 41 a 46 e os respectivos espectros no anexo I deste exemplar.

### 3.2 Testes *in vitro* dos compostos sintetizados e de seus respectivos aminoácidos precursores frente a enzima purificada de *C. ensiformes*.

A determinação da atividade inibitória das tioidantófnas para a enzima urease purificada de *C. ensiformes* foi realizada a partir do método do indofenol. O indofenol é um composto de coloração azul intensa, formado a partir da reação entre fenol e amônia na presença de um agente oxidante (Esquema 7). Nesse trabalho foi adotado hipoclorito de sódio, como agente oxidante.

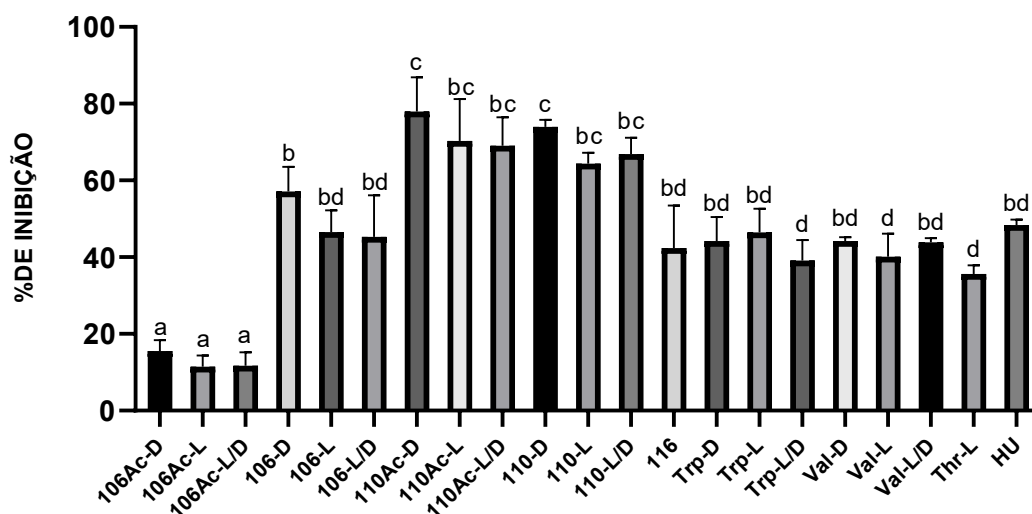
Esquema 7. Equação química para formação do indofenol



Como essa reação é utilizada para quantificar toda amônia proveniente da ureia, é importante que ela ocorra rapidamente, requerendo assim, o uso de nitroprussiato de sódio em meio básico para catalisar essa reação. A quantidade de indofenol gerada está diretamente relacionada a quantidade de amônia gerada a partir da ureia, também utilizada na construção da respectiva curva de calibração.

A quantidade de amônia gerada foi relacionada à porcentagem de inibição da enzima (Figura 19, pg. 58).

Figura 19. Porcentagem de inibição da enzima urease, a uma concentração de 500  $\mu$ M dos inibidores e seus respectivos aminoácidos precursores.



\*letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre os compostos avaliados

Foi observado que todos compostos atuaram como inibidores da enzima sendo que essa porcentagem de inibição variou de 12 a 79%. As tioidantoínas derivadas da valina (**110**) foram os compostos mais ativos, sendo estatisticamente mais eficientes quando comparados ao inibidor de referência hidroxiureia. No entanto, entre os derivados de valina não foi possível identificar o melhor inibidor, pois não houve diferença estatística significativa entre eles. Diferentemente, nos derivados do triptofano (**106**) houve uma diferença estatística considerável entre os compostos acetilados e desacetilados, sugerindo que o grupamento acetil prejudica a interação com a enzima, conseqüentemente, reduzindo a porcentagem de inibição em comparação a molécula que possui o nitrogênio “livre”.

De uma maneira geral, não houve variação significativa da porcentagem de inibição entre os enantiômeros e racematos para cada derivado, o que para fins de um produto comercial configura um saldo positivo, visto que o material de partida não requer ser um enantiômero específico.

Em relação à porcentagem de inibição dos precursores sintéticos, todos os aminoácidos apresentaram atividades comparáveis ao inibidor de referência, o que é um resultado positivo, uma vez que em estudos futuros, relacionados à degradação das tioidantoínas, pode-se ter a liberação do respectivo aminoácido, que também pode atuar como inibidor da enzima urease.

Os valores das concentrações necessárias para inibir 50% da atividade enzimática ( $IC_{50}$ ) para os compostos são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Valores de  $IC_{50}$  (mM) dos inibidores e seus respectivos aminoácidos precursores\*

| Composto       | $IC_{50}$ (mM) | Composto         | $IC_{50}$ (mM) | Composto       | $IC_{50}$ (mM) |
|----------------|----------------|------------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>106-L</b>   | 0,68±0,13      | <b>106ac-L</b>   | 2,20±0,21      | <b>Trp-L</b>   | 0,61±0,08      |
| <b>106-D</b>   | 0,52±0,04      | <b>106ac-D</b>   | 1,69±0,10      | <b>Trp-D</b>   | 0,65±0,07      |
| <b>106-L/D</b> | 0,68±0,17      | <b>106ac-L/D</b> | 2,17±0,27      | <b>Trp-L/D</b> | 0,65±0,07      |
| <b>110-L</b>   | 0,45±0,04      | <b>110ac-L</b>   | 1,14±0,13      | <b>Val-L</b>   | 0,71±0,09      |
| <b>110-D</b>   | 0,33±0,01      | <b>110ac-D</b>   | 1,05±0,06      | <b>Val-D</b>   | 0,68±0,07      |
| <b>110-L/D</b> | 0,43±0,02      | <b>110ac-L/D</b> | 1,01±0,10      | <b>Val-L/D</b> | 0,70±0,02      |
| <b>116</b>     | 0,63±0,13      | <b>HU</b>        | 0,56±0,08      | <b>Treo</b>    | 0,76±0,05      |

\*106 – derivados de triptofano, 110 – derivados de valina e 116 – derivado da treonina

Das treze estruturas sintetizadas, sete apresentam valores de  $IC_{50}$  comparáveis ao inibidor de referência hidroxioureia (**HU**), sendo que as tioidantoínas derivadas da valina (**110**) são significativamente mais potentes. Apesar dos bons resultados obtidos em relação à hidroxioureia (**HU**), os valores de  $IC_{50}$  dos compostos é relativamente elevado quando comparados aos valores de  $IC_{50}$  descritos na literatura para outros compostos, no entanto, para o desenvolvimento de um possível ativo comercial, deve-se avaliar diferentes fatores como toxicidade, solubilidade, facilidade de obtenção, além de experimentos representativos que mimetizam as condições de aplicação dos inibidores.

### **3.3 Ensaio de quantificação de NH<sub>3</sub> volatilizada pelo método de fluxo contínuo de ar em câmara fechada**

#### *3.3.1 Elaboração e implementação do projeto técnico*

De uma maneira geral existem diferentes experimentos que avaliam a atividade anti-ureolítica de enzimas ureases, seja em estudos *in vitro* ou em solo. Ao se tratar de experimentos em solo, os mais comuns e amplamente utilizados são os baseados na quantificação de amônia através do método de indofenol por UV-VIS, avaliando-se a inibição das enzimas ureolíticas presentes na microbiota do solo. O outro método amplamente utilizado é o de quantificação da amônia volatilizada, diferenciando-se do método anterior pela robustez já que é adotado maior quantidade de solo, ureia e inibidor, fazendo também com que esse ensaio seja mais representativo frente aos demais.

O ensaio de volatilização é considerado padrão ouro por empresas/indústria que atuam com P&D associados a inibidores de urease, sendo, de uma maneira geral, um experimento de “bancada” que antecede o aumento de escala e estudos associados às plantas. Sendo assim, por se tratar de um ensaio de elevada importância, dedicamos esforços para implementar esse experimento não somente para a elaboração do presente trabalho, mas para ser um experimento acessível a comunidade acadêmica e científica. Mesmo sendo fundamental para estudos associados a ureases em solo, o ensaio não é muito comum nas principais Universidades do Brasil, mas isso pode estar associado a especificidade do experimento.

Em 2015, nosso grupo de pesquisa teve o privilégio de estabelecer uma colaboração com o professor Reinaldo Bertola Cantarutti do departamento de solos da Universidade Federal de Viçosa, onde foram desenvolvidos experimentos de volatilização de amônia com um sistema já implementado e padronizado. Através desse primeiro contato e experiência, nosso grupo de pesquisa estruturou um experimento de volatilização de amônia na UFMG, hoje alocado na Faculdade de Farmácia.

Como apresentado no Item 3.6 (pg. 34) desse trabalho, para a realização desse experimento é necessário um sistema fechado, sem perda de amônia, que permita passagem constante de ar “livre”, de ácidos e bases dentro de uma câmara de incubação que comporte 100 g de solo, conectada a uma unidade coletora responsável por abrigar uma solução “sequestradora” de amônia. Inicialmente foi dada

atenção a qualidade do ar comprimido utilizado, passando o mesmo por um sistema de filtros de membranas, empregados na indústria farmacêutica, e para garantir a ausência de compostos que poderiam alterar o pH realizamos um pequeno teste no qual foi borbulhado ar em uma solução indicadora, verde de bromocresol e vermelho de metila, por 24 h com o intuito de comprovar que qualquer variação de pH não está relacionada ao ar utilizado.

Figura 20. Filtro de linha utilizados para purificar ar comprimido



Em relação as câmaras de incubação, uma alternativa de frasco que comportasse 100 g de solo, fosse hermeticamente fechado e permitisse a passagem de ar, foram empregados os vacuômetros, largamente utilizados na clínica médica para sucção em redes de vácuo (Figura 21). No entanto, diferentemente do manômetro, o manovacuômetro é utilizado na medição inversa do exigido em nosso experimento sendo necessário à sua substituição por um manômetro.

Figura 21. Vacuômetro e manômetro utilizados na montagem do experimento



Após definida a câmara de incubação e garantida a “pureza” do ar comprimido, o sistema foi montado com o auxílio de mangueiras de silicone e mangueiras rígidas de alta pressão utilizadas em engates rápidos. Para garantir que todo ar proveniente da câmara de incubação fosse borbulhado na solução de ácido bórico, a mangueira rígida foi mantida dentro da solução com o auxílio de uma rolha de silicone acoplada ao erlenmeyer, nessa rolha foram realizados dois furos, o primeiro para a passagem da mangueira e o segundo para aliviar a pressão do sistema, saída de ar.

Figura 22. Montagem das unidades experimentais, câmara de incubação e unidade coletora



Em seguida, determinamos o layout do experimento uma vez que tínhamos como meta 25 unidades de tratamento. Para isso foram utilizadas cruzetas de engate rápido para mangueiras de 8 mm e uma estrutura feita com canos e conexões em PVC para segurarem o sistema.

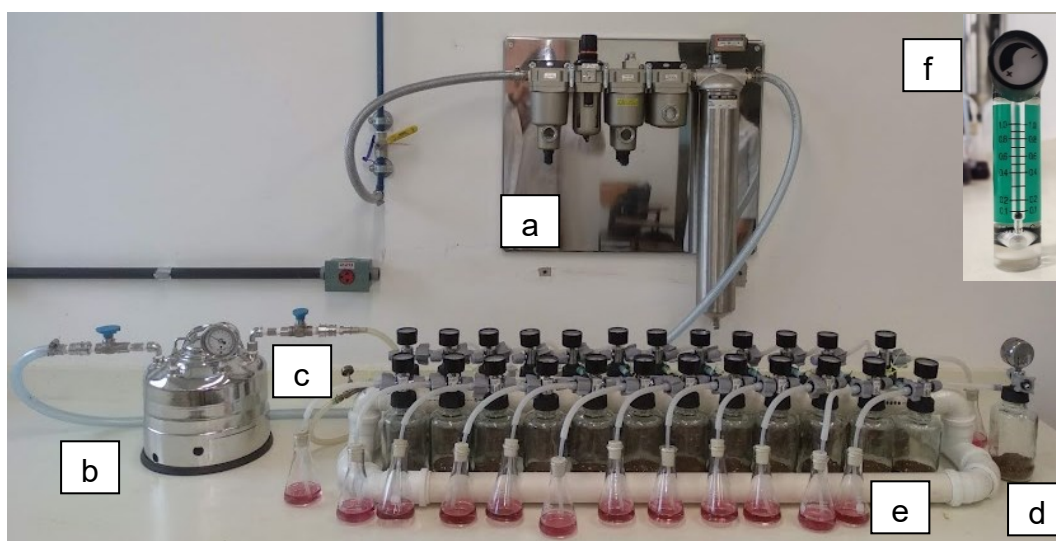
Figura 23. Esqueleto do sistema de volatilização com as respectivas câmaras, conexões e unidades coletoras





Primeiramente, foram realizados experimentos aplicando apenas ureia no solo, a fim de se verificar os desvios e incertezas experimentais. Identificou-se uma pequena variação no fluxo de entrada ao sistema e uma discrepância no fluxo de saída, borbulhamentos desordenados, em cada câmara, gerava grandes variações na quantidade de amônia quantificada comprometendo significativamente o experimento. Os manômetros acoplados a cada câmara de incubação mostravam a pressão interna de cada sistema sendo em sua maioria constante uma vez que estavam conectadas em linha, no entanto, o fluxo que consiste na quantidade de ar borbulhado dentro das unidades coletoras pode variar em relação a cada câmara mesmo a pressão interna permanecendo constante. Como resolução dos desvios associados ao fluxo de ar antes da entrada nas câmaras, direcionamos o ar comprimido para um recipiente que suporta alta pressão mantendo o fluxo de entrada no sistema constante mesmo havendo alguma variação na linha de ar comprimido disponibilizado para todo o departamento através do compressor. Outra melhoria foi a utilização de um fluxímetro após a saída de cada câmara de incubação, dessa forma o fluxo foi corrigido,  $0,5 \text{ L min}^{-1}$ , para todas as unidades através da válvula presente no vacuômetro. O ideal seria um fluxímetro para cada unidade, no entanto, como consiste em um item que multiplicado por 25 câmaras iria impactar significativamente o valor do experimento, optamos por fazer esse controle em todos os sistemas de forma individual até o fluxo de cada câmara permanecer igual (Figura 24, pg. 64). Essas mudanças contribuíram com uma redução significativa no erro experimental sendo as variações encontradas entre as leituras atribuídas, a complexibilidade da matriz trabalhada, solo, e o erro relacionada a precisão do titulador potenciométrico. Após padronizações, o sistema ficou apto para ser operado.

Figura 24. Sistema de volatilização completo. a. conjunto de filtros, b. recipiente que mantém a pressão constante, c. válvulas de fluxo pré sistema, d. câmaras de incubação, e. unidades coletoras, f. fluxímetro.



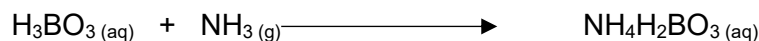
### 3.3.2 Volatilização de amônia

Existem outros experimentos que avaliam a atuação de inibidores de urease frente a enzimas ureolíticas presentes na microbiota do solo, como por exemplo, a metodologia adotada por Modolo *et al.* que foi executada em paralelo a este estudo em colaboração a doutoranda Thamara Ávila aluna da professora Luzia Modolo, coorientadora deste trabalho.

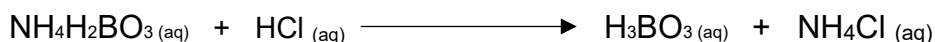
Apesar dos resultados *in vitro* indicarem o melhor candidato da série sintetizada para os derivados do aminoácido valina, estudos no solo\* mostraram que o derivado da treonina, **116**, tem se mostrado o mais promissor frente a matriz complexa que é o solo. Sendo assim, para o experimento de volatilização foi adotado o derivado de aminoácido mais promissor em experimento no solo, composto **116**.

\* Esse experimento não consta nesse trabalho uma vez que está sendo executado em paralelo a este estudo, em colaboração a doutoranda Thamara Ávila, responsável por avaliar os aspectos relacionados aos impactos dos compostos sintetizados no solo e em plantas.

De uma maneira geral, a avaliação da volatilização de amônia, pelo método de fluxo contínuo de ar consiste do carreamento do gás amônia proveniente da ureia pelo ar comprimido. Quando o gás arrastado é borbulhado em uma solução de ácido bórico ocorre a seguinte reação:



Em seguida, a solução resultante é titulada até o pH da solução de ácido bórico inicial.



A quantidade de equivalente de HCl consumida é proporcional a quantidade de borato de amônio, sendo relacionada diretamente a quantidade de amônia gerada. Foram utilizados indicadores, mistura de verde de bromocresol e vermelho de metila, a fim de facilitar o acompanhamento do experimento já que era esperado uma coloração próxima em cada replicata e caso houvesse alguma mudança seria possível verificar o fluxo de cada câmara e se necessário, desconsiderar a medição no intervalo de tempo avaliado. A mistura de indicadores permite a visualização em três faixas de pH, coloração vermelha clara em  $\text{pH} \approx 4$ , vermelha escura em  $\text{pH} \approx 5$  e azul em  $\text{pH} \approx 6$  (Figura 25).

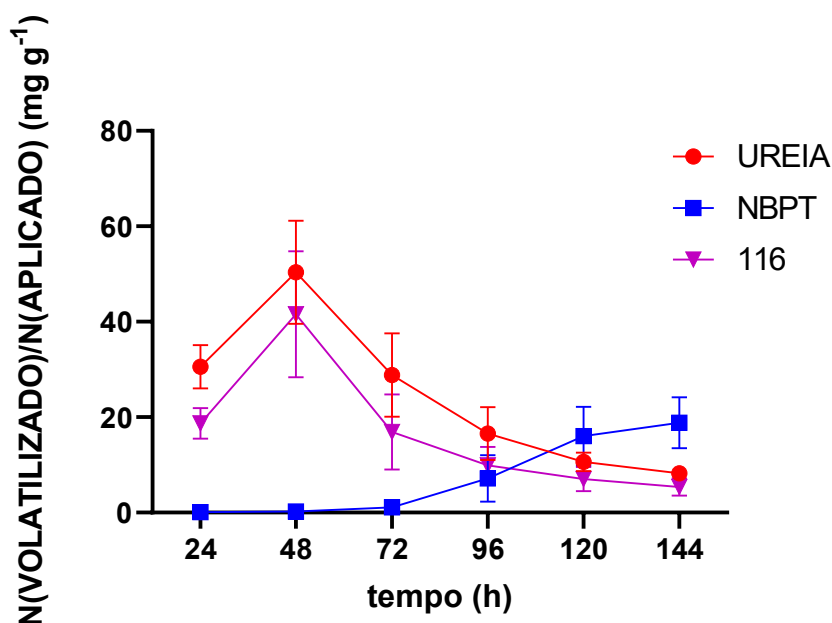
Figura 25. Ilustração representativa da coloração da mistura reagente em função da variação do valor de pH



Dessa forma, foi possível quantificar a perda de nitrogênio na forma de gás amônia proveniente da ureia, estabelecendo-se a quantidade de nitrogênio perdido (mg) por nitrogênio aplicado (g) em 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas (Figura 26, pg.66).

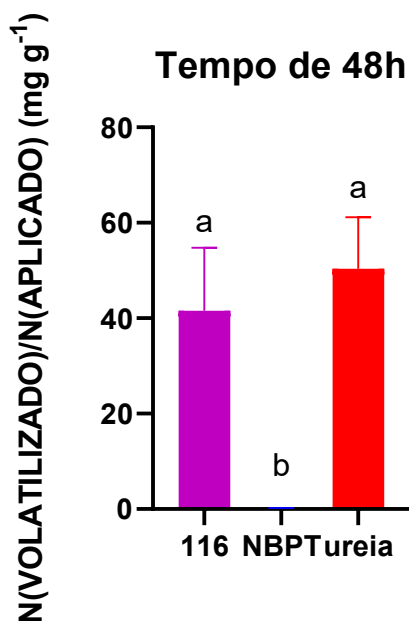
Sendo o derivado de aminoácido proveniente da treonina, composto **116**, avaliado a uma concentração 1% m/m em relação a ureia, condição satisfatória em experimento de inibição em solo.

Figura 26. Taxa da perda de nitrogênio volatilizado por nitrogênio aplicado



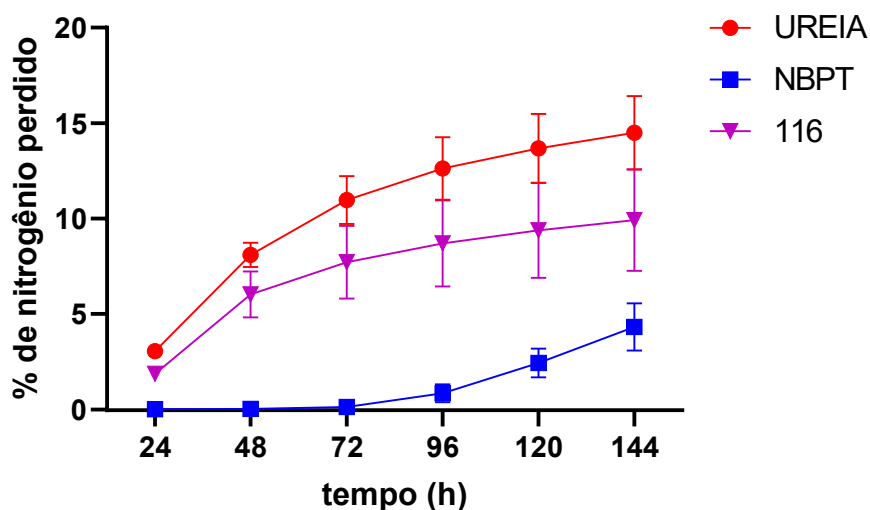
No gráfico correspondente a taxa da perda de nitrogênio volatilizado sob a forma de amônia, Figura 26, foi observado um máximo de volatilização por volta do segundo dia após aplicação da ureia na superfície do solo, sendo condizente com os resultados observados por Paiva *et al.*<sup>75</sup> No entanto, na presença do inibidor que vem sendo avaliado, composto **116**, não foi observado uma redução significativa em relação a volatilização de amônia, o que foi evidenciado na Figura 27, pg. 67 após os testes de ANOVA One-way e Tukey em que letras iguais indicam que não há diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) para a leitura no intervalo de 24 a 48h da ureia na presença do composto sintetizado. Diferentemente quando comparado ao inibidor de referência, NBPT, que reduziu significativamente a volatilização de amônia no mesmo período de tempo (Figura 27, pg. 67), retardando o pico máximo de volatilização (Figura 26).

Figura 27. Perda de nitrogênio sob a forma de amônia de 24 a 48h.



Outra maneira de se trabalhar os dados obtidos a partir do ensaio de volatilização é realizando um somatório da quantidade de nitrogênio perdido ao longo do experimento. Dessa forma foi possível determinar a quantidade de nitrogênio perdido em seis dias após aplicação da ureia no solo (Figura 28)

Figura 28. Perda acumulada de nitrogênio por tempo a partir da ureia



Foi observado que após 144 h da aplicação da ureia na superfície do solo, aproximadamente 15% do nitrogênio foi perdido sob a forma de amônia, evidenciando a necessidade do uso dos inibidores, uma vez que, ao se referir ao sistema de produção em que toneladas de ureia são aplicadas ao solo, tem-se um impacto

econômico e ambiental imensurável. Novamente, foi observado que o composto de interesse não apresentou diferença estatística em relação a ureia, mas o experimento foi realizado com sucesso, uma vez que o inibidor de referência, NBPT, reduziu em mais da metade a perda de nitrogênio. Apesar da perda de 15% de nitrogênio já impactar a utilização da ureia, existem ensaios de volatilização que mostram perdas próximas de 25%<sup>90</sup> no mesmo período de avaliação. No entanto, essa perda pode estar relacionada ao tipo de solo e condições da sua microbiota uma vez que uma microbiota mais ativa contribui mais para a volatilização de amônia.

#### 4. Conclusão e Perspectivas

Foram obtidas 13 tioidantoínas derivadas de triptofano, valina e treonina com rendimentos que variaram de 48 a 94%.

Os compostos sintetizados, foram avaliados em estudos *in vitro* frente a enzima urease isolada de *C. ensiformis*. Por meio dos testes estatísticos realizados neste trabalho, foi possível demonstrar que não houve variação significativa na comparação da atividade entre enantiômeros e racemato, tanto para os compostos sintetizados quanto para os aminoácidos puros. Dentre os compostos testados, em experimento *in vitro*, os derivados da valina ( $IC_{50}$  - 332, 433, 448 mM), se mostraram mais eficientes do que o inibidor de referência hidroxureia ( $IC_{50}$  - 559 mM).

Foi estabelecido e padronizado dentro do nosso grupo de pesquisa um experimento mais robusto e representativo para a avaliação de novos inibidores de ureases voltados para a agricultura. No ensaio de quantificação de amônia volatilizada pelo método de fluxo contínuo de ar em câmara fechada, o composto mais promissor não reduziu a perda de nitrogênio no uso de ureia, mas o sistema foi validado em comparação ao inibidor de referência utilizado NBPT. Uma alternativa para a continuação desses estudos seria o desenvolvimento de formulações que favoreçam a ação do inibidor sintetizado uma vez que o mesmo possui efeito em experimentos em solo e *in vitro*.

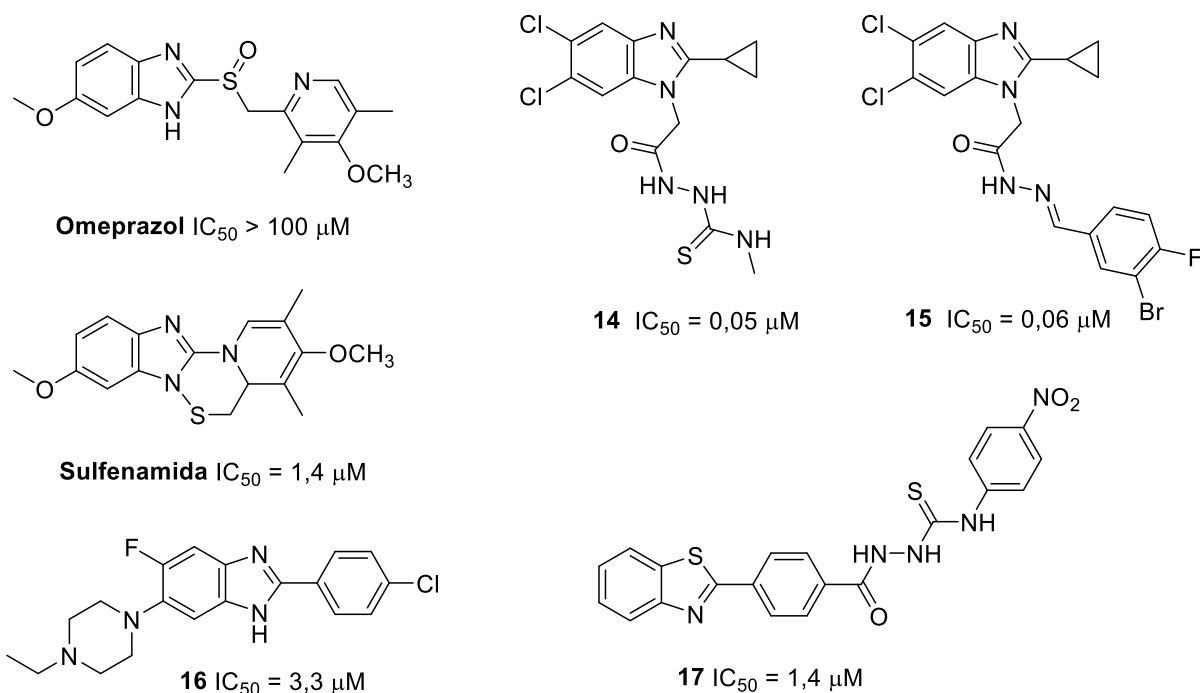
## Capítulo 2 – Síntese e Avaliação Anti-ureolítica de Derivados Benzotiazóis

### 1. Introdução

Em 1995, Kuhler *et al.* relataram que derivados de imidazóis estão entre os inibidores de ureases mais potentes.<sup>71</sup> Considerado como um pró-fármaco para inibição de urease, o omeprazol tem IC<sub>50</sub> superior a 100 µM, no entanto, em condições ácidas é rapidamente convertido a sulfenamida que apresenta um IC<sub>50</sub> de 1,4 µM (Figura 29, pg. 70). Apesar de elevada atividade *in vitro*, o mecanismo de ação do omeprazol utilizado no tratamento de úlceras gástricas,<sup>46,91</sup> está relacionado a sua capacidade de inibir as bombas de prótons, não assegurando sua atividade como inibidor de urease em modelos humanos.<sup>46</sup> Mentese *et al.* (2017) verificaram que derivados de 5,6-dicloro-2-ciclopropil-1*H*-benzimidazol inibem a enzima urease em uma ordem de grandeza superior ao controle, tioureia. Os compostos mais ativos **14** e **15** (Figura 29, pg. 70) foram 10 vezes mais eficientes que o inibidor de referência, tioureia (IC<sub>50</sub> = 0,56 µM).<sup>92</sup> Mais recentemente, Moghadam *et al.* sintetizaram 14 derivados de benzimidazóis destacando como melhor inibidor aquele que possui átomo de cloro na posição *para* do anel aromático, composto **16**.<sup>93</sup>

Os benzotiazóis também apresentam sua importância para a inibição da enzima urease, pois o composto de menor IC<sub>50</sub> relatado na literatura pertence a essa classe (**3**, IC<sub>50</sub> = 2 nM, Figura 5, pg.31). Híbridos de benzotiazóis com tiossemicarbazinas também apresentaram bons resultados frente a enzima urease isolada de *Canavalia ensiformes*, destacando-se o composto **17** (Figura 29, pg. 70) com IC<sub>50</sub> de 1,4 µM.<sup>94</sup>

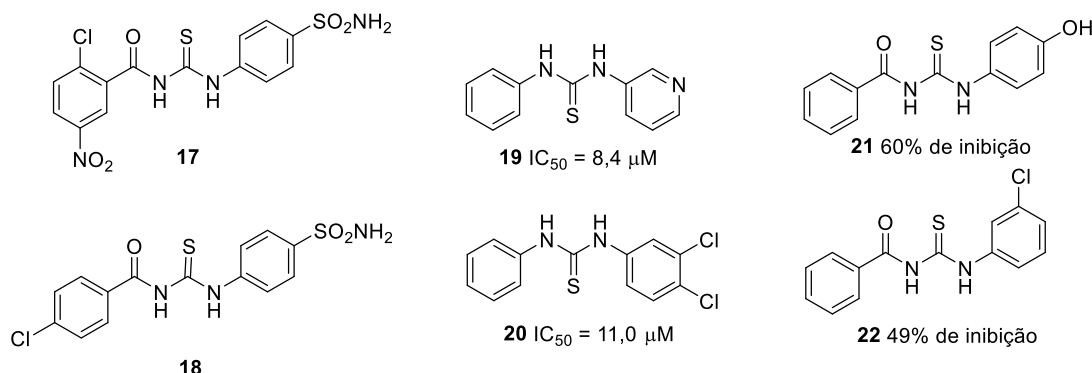
Figura 29. Representação de estruturas químicas de reconhecidos inibidores de urease derivados de benzoimidazóis e benzoitiazóis



Visando a aplicação medicinal, Saeed *et al.* (2013) sintetizaram uma série de benzoiltioureias e avaliaram suas atividades frente a urease *Canavalia ensiformis*, destacando-se os compostos **17** e **18** (Figura 30, pg. 71), que foram, respectivamente, 50 e 100 vezes mais eficientes que o inibidor de referência, tioureia.<sup>95</sup> Em 2014, Khan *et al.* sintetizaram uma série de tioureias e avaliaram suas atividades frente a urease isolada de *C. ensiformis*, destacando-se os compostos **19** e **20** (Figura 30, pg. 71), com valores de  $IC_{50}$  de 8,4 e 11,0  $\mu M$ , respectivamente, mais ativos que o inibidor de referência, tioureia (21,0  $\mu M$ ).<sup>96</sup> Brito *et al.* (2015) sintetizaram uma série de benzoiltioureias verificando a atividade inibitória em experimentos *in vitro* e *in natura* apresentando os resultados em função da porcentagem de inibição a 0,5 mM do inibidor. Na Figura 30 estão apresentados os compostos mais ativos *in vitro* (60% de inibição) e em *solu* (49% de inibição) mostrando resultados de inibição próximos aos inibidores de referência hidroxiureia (*in vitro*, 74%) e NBPT (*in natura*, 40%).<sup>97</sup>

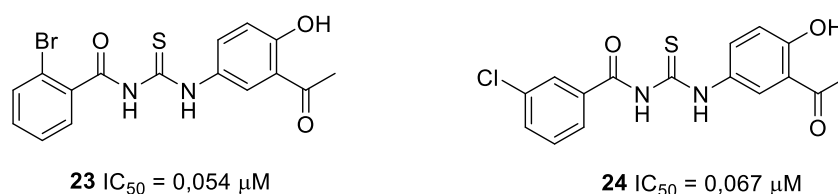


Figura 30. Representação de estruturas químicas de reconhecidos inibidores de urease derivados de tioureia



Mais recente, em 2022 o grupo de Khan e Saeed sintetizou uma nova classe de benzoiltioureias derivadas do hidroxiafetofenona, dentre os dez compostos sintetizados destacaram-se os compostos **23** e **24** com  $IC_{50}$  de 0,054 e 0,067  $\mu M$ , respectivamente (Figura 31). Apesar do composto mais ativo, **23**, apresentar o átomo de bromo na posição *orto* de sua estrutura, os pesquisadores não sintetizaram o análogo, substituindo por um átomo de cloro o que era de se esperar, já que o segundo melhor composto sintetizado apresenta o átomo de cloro substituindo a posição *meta* do anel, **24**. Para os melhores compostos que apresentaram resultados os pesquisadores realizaram estudos de cinética enzimática concluindo que a inibição é do tipo competitiva e mostraram através de estudos de *docking* interações prováveis com resíduos de aminoácidos na proximidade do sitio ativo da enzima.<sup>98</sup>

Figura 31. Representação de benzoiltioureias sintetizadas por Khan *et al.*<sup>98</sup>



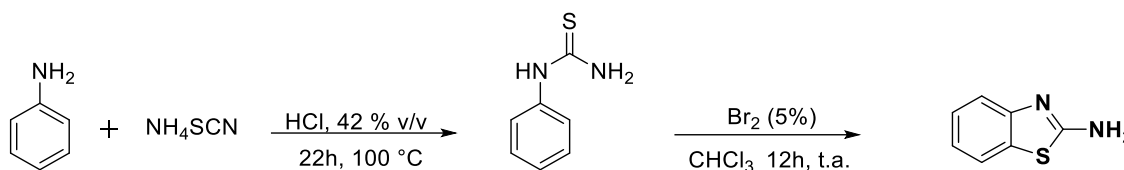
Decorrente da eficiente atividade anti-ureolítica das benzoiltioureias e dos anéis benzotiazólicos e benzoimidazólicos, propõe-se no presente trabalho, a obtenção de híbridos benzoiltioureia-benzotiazóis e benzoiltioureia-benzoimidazóis que apresentem a capacidade de reduzir a volatilização de amônio no uso de ureia como fertilizante e que sejam favoráveis na erradicação da bactéria *H. pylori*.

## 2. Objetivos específicos

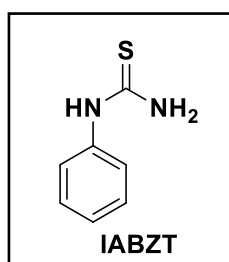
- Síntese e caracterização dos híbridos benzotiazol-benzoiltioureia;
- Determinação da porcentagem de inibição dos compostos sintetizados para a urease de *C. ensiformis*;
- Avaliação do híbrido benzotiazol-benzoiltioureia mais eficiente em teste de volatilização de amônia.

### 3. Procedimentos experimentais

#### 3.1 Síntese do 2-aminobenzotiazol



O 2-aminobenzotiazol foi obtido a partir da metodologia descrita por Saeed *et al.*<sup>99,100</sup> Foram adicionados 2 mL de ácido clorídrico concentrado a 33 mmol de anilina previamente transferida para um balão de fundo redondo de 25 mL. Em outro balão contendo 33 mmol de tiocianato de amônio foram adicionados 4 mL de água, após completa solubilização do sal, a solução saturada foi adicionada à solução de anilina. A mistura foi submetida a aquecimento sob refluxo por 22 h até formação de um precipitado branco. Decorrido o tempo de reação, a mistura foi vertida em gelo triturado, aproximadamente 50 mL. O sólido obtido foi solubilizado em água quente e filtrado. O filtrado foi mantido em repouso e o produto cristalizado dentro de aproximadamente 24h. Em uma segunda etapa foram transferidos 10 mmol da feniltiourea previamente sintetizada para um balão de fundo redondo de 50 mL, e em seguida adicionaram-se 15 mL de clorofórmio ao balão e o mesmo foi mantido sob agitação em banho de gelo. Adicionaram-se 750 µL de bromo, 5% v/v em relação a quantidade de clorofórmio, e o sistema foi mantido fechado a temperatura ambiente sob agitação por aproximadamente 12h. O precipitado formado foi filtrado e lavado com clorofórmio a frio até reduzir a coloração amarelada. Após completa solubilização do bromidrato em etanol, adicionou-se uma solução de hidróxido de amônio, resultando na formação de um sólido branco que foi filtrado e lavado com etanol frio. Por fim, o produto foi obtido pela remoção de voláteis à pressão reduzida.



Fórmula Molecular: C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>S

Aspecto: sólido branco

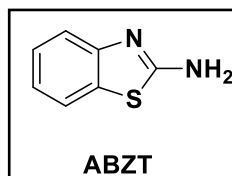
Rendimento: 16-30%

Temperatura de Fusão: 153,0 – 154,9 °C (Lit. 154 °C)

IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3424, 3276, 3178, 1610, 1520, 1446, 1316, 1274, 1232, 1062, 750, 694.

Tabela 10. Sinais observados no espectro de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C da feniltiourea sintetizada (**IABZT**)

| <b>RMN de <sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub></b>  |           |          |               |
|---|-----------|----------|---------------|
| <b>δ (ppm)</b>  | <b>M</b>  | <b>I</b> | <b>J (Hz)</b> |
| 6,21  | <i>s</i>  | 2        | -             |
| 7,24-7,27   | <i>m</i>  | 2        | -             |
| 7,33  | <i>ta</i> | 1        | 7,46          |
| 7,45  | <i>ta</i> | 2        | 7,56          |
| 8,29  | <i>s</i>  | 1        | -             |
| <b>RMN de <sup>13</sup>C, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub></b> |           |          |               |
| δ: 125,2; 127,9; 130,4; 136,4; 181,7                    |           |          |               |



Fórmula Molecular: C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>S

Aspecto: sólido branco

Rendimento: 80-88%

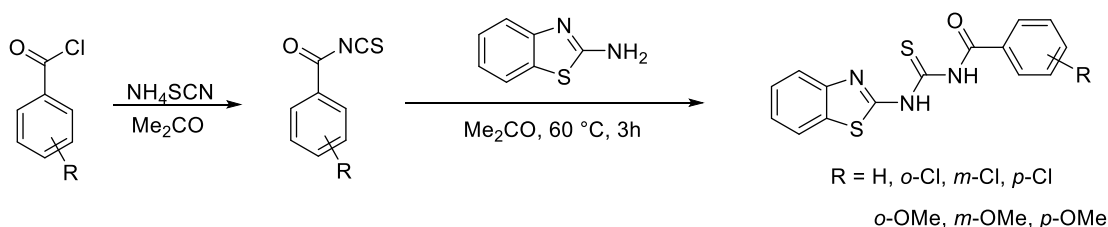
Temperatura de Fusão: 126,5 – 128,2 °C (Lit. 126 – 129 °C)

IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3396, 3065, 1644, 1528, 1446, 1310, 742, 720.

Tabela 11. Sinais observados no espectro de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C do 2-aminobenzotiazol sintetizado (ABZT) e os descritos na literatura

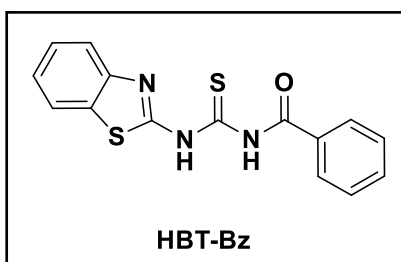
| RMN de <sup>1</sup> H, 400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub>  |          |   |       | RMN de <sup>1</sup> H, 400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub><br>(Chikhale <i>et al.</i> 2018) <sup>101</sup> |          |   |        |
|--|----------|---|-------|---|----------|---|--------|
| δ (ppm)  | M        | I | J(Hz) | δ (ppm)   | M        | I | J (Hz) |
| 7,00   | <i>t</i> | 1 | 7,3   | 6,9   | <i>t</i> | 1 | 7,8    |
| 7,20   | <i>t</i> | 1 | 7,3   | 7,18  | <i>t</i> | 1 | 4,6    |
| 7,33   | <i>d</i> | 1 | 7,9   | 7,35  | <i>s</i> | 2 | -      |
| 7,45   | <i>s</i> | 2 | -     | 7,37  | <i>s</i> | 1 | -      |
| 7,64   | <i>d</i> | 1 | 7,7   | 7,5   | <i>d</i> | 1 | 7,8    |
| RMN de <sup>13</sup> C, 100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> |          |   |       | RMN de <sup>13</sup> C, 100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub>  |          |   |        |
| δ: 117,7; 120,8; 120,8; 125,4; 130,9; 152,8; 166,4.  |          |   |       | δ: 117,7; 120,4; 120,7; 125,2; 130,9; 152,5; 166,6.   |          |   |        |

### 3.2 Síntese dos híbridos benzoiltioureia-benzotiazóis



Os híbridos benzoiltioureia-benzotiazóis foram obtidos pela metodologia descrita por Saeed *et al.*<sup>100</sup> Um mmol de tiocianato de amônio foi pesado e transferido para um balão bitubulado de 25 mL. Em seguida, foi conectado ao mesmo um condensador e um septo, sendo o sistema mantido sob atmosfera de argônio. Foram adicionados ao sistema, com o auxílio de uma cânula, 6 mL de acetona seca, em seguida, um mmol dos respectivos cloretos ácidos comerciais. A mistura foi mantida

em refluxo e agitação por 30 minutos, quando uma solução contendo um mmol do 2-aminobenzotiazol em 4 mL de acetona foi adicionada. Após 3 horas em refluxo a mistura foi vertida em um béquer contendo aproximadamente 20 mL de gelo triturado. O precipitado amarelo formado foi lavado com uma mistura etanol/acetona resfriada. Através da técnica de CCD foi verificado que o precipitado estava impuro, sendo necessário sua recristalização. Para o híbrido proveniente do cloreto de benzoila, o sólido foi solubilizado na menor quantidade possível de etanol a quente e mantido em repouso por aproximadamente três dias, sendo obtido, um cristal de coloração levemente amarelada. Para os derivados clorados, a cristalização foi realizada com uma mistura, etanol e acetona, a quente sendo o sistema mantido em repouso por aproximadamente três dias. Já os derivados metoxilados foram cristalizados seguindo a metodologia proposta por Odame *et al.* em que o precipitado foi solubilizado em uma mistura DMSO e tolueno, 1:1.<sup>102</sup> Todos os cristais obtidos foram caracterizados por ponto de fusão, espectroscopia na região do infravermelho e RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.



Fórmula Molecular: C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>OS<sub>2</sub>

Aspecto: sólido branco

Rendimento: 67%

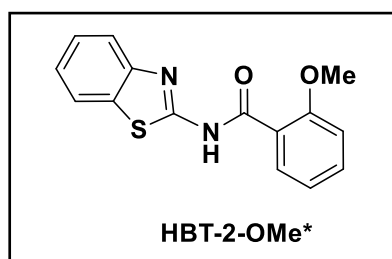
Temperatura de Fusão: 199,3 – 200,6 °C (Lit. 203 – 205 °C)<sup>99</sup>

IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3333, 1678, 1596, 1541, 1520, 1493, 1242, 758, 708.

Tabela 12. Sinais observados no espectro de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C do híbrido sintetizado (**HBT-Bz**) e os descritos na literatura

| <b>RMN de <sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub></b>  |          |          |               | <b>RMN de <sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub><br/>(Saeed et al., 2008)<sup>99</sup></b> |          |          |               |
|---|----------|----------|---------------|--|----------|----------|---------------|
| <b>δ (ppm)</b>  | <b>M</b> | <b>I</b> | <b>J (Hz)</b> | <b>δ (ppm)</b>   | <b>M</b> | <b>I</b> | <b>J (Hz)</b> |
| 13,97   | s        | 1        | -             | 11,34  | s        | 1        | -             |
| 9,21  | s        | 1        | -             | 10,06  | s        | 1        | -             |
| 7,93  | d        | 2        | 7,6           | 7,66-8,26  | m        | 5        | -             |
| 7,88  | d        | 1        | 8,2           | 7,56   | dd       | 1        | 6,9; 7,4      |
| 7,45  | ta       | 1        | 8,0           | 7,42   | dd       | 1        | 7,2; 6,8      |
| 7,68  | ta       | 1        | 7,6           | 7,15   | d        | 1        | 8,4           |
| 7,57  | ta       | 2        | 7,6           | 7,15   | d        | 1        | 8,2           |
| 7,49  | ta       | 1        | 7,7           |  |          |          |               |
| 7,37  | ta       | 1        | 7,6           |  |          |          |               |
| <b>RMN de <sup>13</sup>C, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub></b> |          |          |               |  |          |          |               |

δ: 121,3; 121,6; 124,6; 126,5; 127,7; 129,4;  
131,1; 132,0; 134,2; 148,4; 158,7; 166,6;  
176,1.



Fórmula Molecular: C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S

Aspecto: cristal amarelo

Rendimento: 65%

Temperatura de Fusão: 154 – 156 °C (Lit. 156-158 °C)<sup>103</sup>

IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3276, 2924, 1666, 1600, 1540, 1474, 1292, 1242, 1016, 754

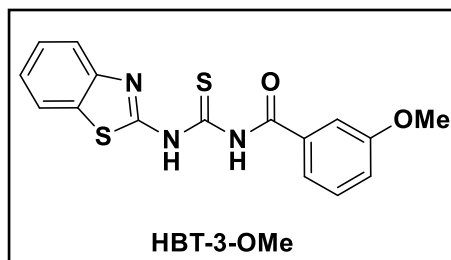
ESI(+)-MS: 285,21 [M+H]<sup>+</sup>; 307,17 [M+Na]<sup>+</sup>

Tabela 13. Sinais observados no espectro de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C do híbrido sintetizado (**HBT-2-OMe**) e os descritos na literatura

| <i>RMN de <sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub></i> |           |          |               | <i>RMN de <sup>1</sup>H, 500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub></i><br>(Gergely e Kollar 2019) <sup>103</sup> |           |          |               |
|--|-----------|----------|---------------|--|-----------|----------|---------------|
| <i>δ (ppm)</i>   | <i>M</i>  | <i>I</i> | <i>J (Hz)</i> | <i>δ (ppm)</i>   | <i>M</i>  | <i>I</i> | <i>J (Hz)</i> |
| 11,97  | <i>br</i> | 1        | -             | 12,07  | <i>br</i> | 1        | -             |
| 7,99   | <i>d</i>  | 1        | 7,7           | 8,03   | <i>d</i>  | 1        | 7,9           |
| 7,78   | <i>dd</i> | 1        | 1,7; 7,7      | 7,78-7,81  | <i>m</i>  | 2        | -             |
| 7,76   | <i>d</i>  | 1        | 8,3           | 7,61   | <i>t</i>  | 1        | 7,8           |
| 7,60   | <i>t</i>  | 1        | 7,7; 8,3      | 7,48   | <i>d</i>  | 1        | 7,6           |
| 7,46   | <i>t</i>  | 1        | 7,7; 8,3      | 7,35   | <i>t</i>  | 1        | 7,6           |
| 7,33   | <i>t</i>  | 1        | 7,7; 8,3      | 7,26   | <i>d</i>  | 1        | 8,4           |
| 7,23   | <i>d</i>  | 1        | 8,3           | 7,16   | <i>t</i>  | 1        | 7,5           |
| 7,12   | <i>t</i>  | 1        | 7,7           | 3,97   | <i>s</i>  | 3        | -             |
| 3,95   | <i>s</i>  | 3        | -             |  |           |          |               |
| <i>RMN de <sup>13</sup>C, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub></i>  |           |          |               | <i>RMN de <sup>13</sup>C, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub></i>  |           |          |               |
| <i>δ</i> : 165,1; 158,0; 157,6; 148,7; 134,3;            |           |          |               | 165,2; 158,1; 157,7; 149,0; 134,2; 132,1;  |           |          |               |
| 131,8; 130,8; 126,7; 124,2; 122,1; 121,3;                |           |          |               | 130,9; 126,7; 124,2; 122,2; 121,9; 121,2;  |           |          |               |
| 121,2; 120,9; 112,7; 56,5.                               |           |          |               | 121,1; 112,8; 56,7   |           |          |               |

\* benzamida correspondente





Fórmula Molecular: C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>

Aspecto: sólido branco

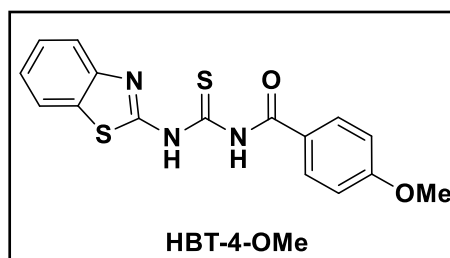
Rendimento: 68%

Temperatura de Fusão: 167 – 168 °C (Lit. 117 – 119 °C)<sup>102</sup>

IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3230, 1672, 1540, 1524, 1318, 1276, 1220, 1044, 888, 750, 694.

Tabela 14. Sinais observados no espectro de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C do híbrido sintetizado (**HBT-3-OMe**) e os descritos na literatura

| <i>RMN de <sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub></i> |           |          |               | <i>RMN de <sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub><br/>(Odame et al., 2020)<sup>102</sup></i> |           |          |               |
|--|-----------|----------|---------------|---|-----------|----------|---------------|
| <i>δ (ppm)</i>   | <i>M</i>  | <i>I</i> | <i>J (Hz)</i> | <i>δ (ppm)</i>  | <i>M</i>  | <i>I</i> | <i>J (Hz)</i> |
| 14,27  | <i>br</i> | 1        | -             | 12,89   | <i>br</i> | 1        | -             |
| 12,26  | <i>br</i> | 1        | -             | 12,21   | <i>br</i> | 1        | -             |
| 8,05   | <i>d</i>  | 1        | 7,7           | 8,04  | <i>dd</i> | 1        | 8,0           |
| 7,81   | <i>d</i>  | 1        | 7,5           | 7,80  | <i>t</i>  | 1        | 8,0           |
| 7,59   | <i>d</i>  | 1        | 7,7           | 7,73  | <i>s</i>  | 1        | -             |
| 7,57   | <i>m</i>  | 1        | -             | 7,57  | <i>m</i>  | 1        | -             |
| 7,52-7,46  | <i>m</i>  | 2        | -             | 7,48  | <i>t</i>  | 2        | 8,0           |
| 7,40   | <i>t</i>  | 1        | 7,5           | 7,36  | <i>m</i>  | 1        | -             |
| 7,36   | <i>dd</i> | 1        | 8,0; 2,1      | 7,23  | <i>t</i>  | 1        | 8,0           |
| 3,86   | <i>s</i>  | 3        | -             | 3,89  | <i>s</i>  | 3        | -             |



Fórmula Molecular: C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>

Aspecto: sólido branco

Rendimento: 78%

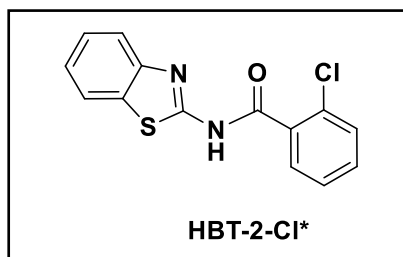
Temperatura de Fusão: 194 – 195 °C (Lit. 192 – 193 °C)<sup>102</sup>

IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3462, 3310, 2926, 1674, 1534, 1526, 1250, 1182, 816.

ESI(+)-MS: 344,10 [M+H]<sup>+</sup>; 366,07 [M+Na]<sup>+</sup>

Tabela 15. Sinais observados no espectro de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C do híbrido sintetizado (**HBT-4-Cl**) e os descritos na literatura

| <i>RMN de <sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub></i> |           |          |               | <i>RMN de <sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub></i><br>(Odame <i>et al.</i> , 2020) <sup>102</sup> |          |          |               |
|--|-----------|----------|---------------|---|----------|----------|---------------|
| <i>δ (ppm)</i>   | <i>M</i>  | <i>I</i> | <i>J (Hz)</i> | <i>δ (ppm)</i>  | <i>M</i> | <i>I</i> | <i>J (Hz)</i> |
| 14,41  | <i>br</i> | 1        | -             | 12,06   | <i>s</i> | 1        | -             |
| 12,10  | <i>br</i> | 1        | -             | 8,06  | <i>m</i> | 3        | -             |
| 8,04-8,07  | <i>m</i>  | 3        | -             | 7,51  | <i>t</i> | 1        | 7,2           |
| 7,81   | <i>d</i>  | 1        | 7,9           | 7,40  | <i>t</i> | 2        | 7,2; 7,6      |
| 7,50   | <i>t</i>  | 1        | 7,5; 8,6      | 7,11  | <i>d</i> | 2        | 8,0           |
| 7,39   | <i>t</i>  | 1        | 7,5; 8,4      | 3,87  | <i>s</i> | 3        | -             |
| 7,09   | <i>d</i>  | 2        | 8,9           |   |          |          |               |
| 3,87   | <i>s</i>  | 3        | -             |   |          |          |               |



Fórmula Molecular: C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>ClN<sub>2</sub>OS

Aspecto: sólido branco

Rendimento: 81%

Temperatura de Fusão: 177 – 178 °C (Lit. 165 – 166 °C)<sup>104</sup>

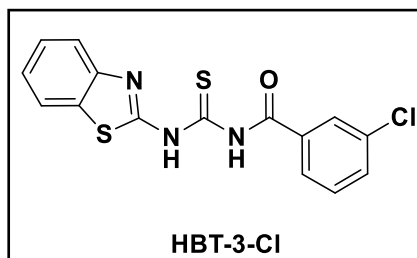
IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3448, 2924, 1682, 1558, 1302, 1280, 1124, 1050, 914, 872, 748, 730

ESI(+)-MS: 289,12 [M+H]<sup>+</sup>; 311,12 [M+Na]<sup>+</sup>

Tabela 16. Sinais observados no espectro de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C do híbrido sintetizado (HBT-2-Cl\*) e os descritos na literatura

| <b>RMN de <sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub></b>   |          |          |               | <b>RMN de <sup>1</sup>H, 300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub></b><br>(Ćaleta et al., 2008) <sup>104</sup>                        |          |          |               |
|--|----------|----------|---------------|---|----------|----------|---------------|
| <b>δ (ppm)</b>   | <b>M</b> | <b>I</b> | <b>J (Hz)</b> | <b>δ (ppm)</b>  | <b>M</b> | <b>I</b> | <b>J (Hz)</b> |
| 12,94  | s        | 1        | -             | 12,95   | s        | 1        | -             |
| 8,03   | d        | 1        | 7,7           | 8,04  | d        | 1        | 7,9           |
| 7,79   | d        | 1        | 8,0           | 7,79  | d        | 1        | 8,0           |
| 7,70   | dd       | 1        | 7,5; 1,4      | 7,70  | d        | 1        | 7,4           |
| 7,62-7,55  | m        | 2        | -             | 7,62-7,54   | m        | 2        | -             |
| 7,51-7,45  | m        | 2        | -             | 7,51-7,44   | m        | 2        | -             |
| 7,35   | t        | 1        | 7,6           | 7,35  | t        | 1        | 7,4           |
| <b>RMN de <sup>13</sup>C, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub></b>  |          |          |               | <b>RMN de <sup>13</sup>C, 75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub></b>  |          |          |               |
| δ: 164,99; 159,19; 147,74; 132,84; 132,80;<br>131,80; 131,72; 130,83; 130,72; 127,42;<br>126,38; 124,18; 121,48; 120,39. |          |          |               | δ: 166,16; 158,17; 148,97; 134,67; 132,60;<br>131,99; 130,78; 130,33; 130,00; 127,76;<br>126,74; 124,34; 122,28; 121,21 |          |          |               |

\* benzamida correspondente



Fórmula Molecular: C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>3</sub>OS<sub>2</sub>

Aspecto: sólido branco

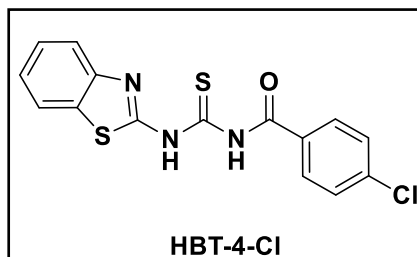
Rendimento: 47%

Temperatura de Fusão: 187 – 188 °C (Lit. 140 – 142 °C)<sup>102</sup>

IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3300, 2926, 1670, 1554, 1508, 1334, 1240, 1168, 824, 752.

Tabela 17. Sinais observados no espectro de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C do híbrido sintetizado (**HBT-3-Cl**) e os descritos na literatura

| <b>RMN de <sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub></b> |           |          |               | <b>RMN de <sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub><br/>(Odame et al., 2020)<sup>102</sup></b> |           |          |               |
|--|-----------|----------|---------------|---|-----------|----------|---------------|
| <b>δ (ppm)</b>   | <b>M</b>  | <b>I</b> | <b>J (Hz)</b> | <b>δ (ppm)</b>  | <b>M</b>  | <b>I</b> | <b>J (Hz)</b> |
| 14,10  | <i>br</i> | 1        | -             | 12,29   | <i>br</i> | 1        | -             |
| 12,34  | <i>br</i> | 1        | -             | 8,20  | <i>s</i>  | 1        | -             |
| 8,05   | <i>m</i>  | 2        | -             | 8,06  | <i>m</i>  | 2        | -             |
| 7,93   | <i>d</i>  | 1        | 8,0           | 7,93  | <i>d</i>  | 1        | 8,0           |
| 7,80   | <i>d</i>  | 1        | 7,7           | 7,80  | <i>t</i>  | 1        | 8,4; 8,8      |
| 7,75   | <i>d</i>  | 1        | 8,0           | 7,73  | <i>t</i>  | 1        | 8,0; 8,4      |
| 7,59   | <i>t</i>  | 1        | 7,9; 7,7      | 7,59  | <i>m</i>  | 1        | -             |
| 7,51   | <i>t</i>  | 1        | 7,7; 7,7      | 7,51  | <i>m</i>  | 1        | -             |
| 7,40   | <i>t</i>  | 1        | 7,7; 8,3      |   |           |          |               |



Fórmula Molecular: C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>3</sub>OS<sub>2</sub>

Aspecto: sólido branco

Rendimento 73%

Temperatura de Fusão: 205 – 206 °C (Lit. 206 – 207 °C)<sup>102</sup>

IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3314, 3034, 1670, 1540, 1458, 1328, 1242, 1168, 1096, 792, 748, 668.

Tabela 18. Sinais observados no espectro de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C do híbrido sintetizado (**HBT-4-Cl**) e os descritos na literatura

| <i>RMN de <sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub></i> |           |          |               | <i>RMN de <sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub><br/>(Odame et al., 2020)<sup>102</sup></i> |           |          |               |
|--|-----------|----------|---------------|---|-----------|----------|---------------|
| <i>δ (ppm)</i>   | <i>M</i>  | <i>I</i> | <i>J (Hz)</i> | <i>δ (ppm)</i>  | <i>M</i>  | <i>I</i> | <i>J (Hz)</i> |
| 14,17  | <i>br</i> | 1        | -             | 14,17   | <i>br</i> | 1        | -             |
| 12,31  | <i>br</i> | 1        | -             | 12,35   | <i>br</i> | 1        | -             |
| 8,05   | <i>d</i>  | 1        | 7,8           | 8,03  | <i>m</i>  | 3        | -             |
| 8,01   | <i>d</i>  | 2        | 8,5           | 7,81  | <i>m</i>  | 1        | -             |
| 7,81   | <i>d</i>  | 1        | 7,4           | 7,62  | <i>m</i>  | 2        | -             |
| 7,63   | <i>d</i>  | 2        | 8,5           | 7,51  | <i>m</i>  | 1        | -             |
| 7,51   | <i>t</i>  | 1        | 7,7; 8,6      | 7,39  | <i>m</i>  | 1        | -             |
| 7,40   | <i>t</i>  | 1        | 7,6; 8,5      |   |           |          |               |

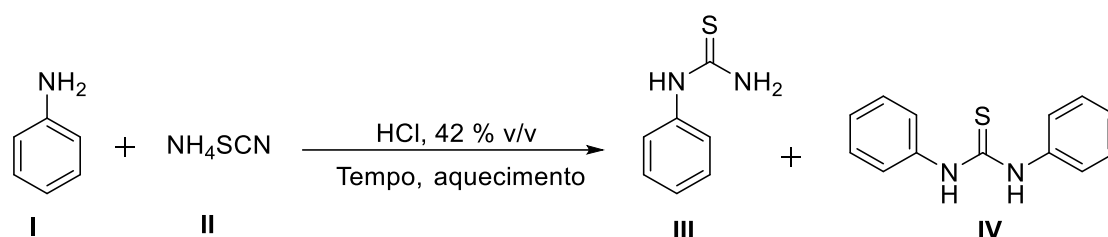
## 4. Resultados e Discussões

### 4.1 Síntese do 2-aminobenzotiazol (ABZT)

O 2-aminobenzotiazol foi obtido em duas etapas segundo a metodologia de Saeed *et al.*, de modo que o intermediário feniltiourea (IABZT) foi isolado e em seguida reagido com bromo, fornecendo o produto de interesse com rendimentos variando de 63 a 79%.<sup>100</sup> De fato, dentre as metodologias propostas para a obtenção do 2-aminobenzotiazol, várias relatam a obtenção quantitativa desta substância em uma reação *one-pot*. Porém, após diversas tentativas seguindo tais metodologias, nós não obtivemos êxito na preparação da substância de interesse.<sup>99,105,106</sup>

A metodologia em duas etapas para obtenção do 2-aminobenzotiazol descreve o intermediário, feniltiourea, como um sólido branco puro. No entanto, durante a elaboração e caracterização dos produtos das reações, observamos que 20 a 30% do sólido obtido era um subproduto resultante da reação entre a feniltiourea e uma molécula de anilina (Esquema 9, pg. 86, etapa paralela), reduzindo assim o rendimento da feniltiourea. De forma a diminuir a formação deste subproduto foram variados os parâmetros: temperatura, tempo de reação e proporção entre os reagentes (Tabela 19).

Tabela 19. Rendimentos para síntese da feniltiourea



| Reação | Tempo | Aquecimento | I:II  | III:IV | Rendimento para III |
|--------|-------|-------------|-------|--------|---------------------|
| 1      | 96 h  | 50 °C       | 1:1   | -      | 0%                  |
| 2      | 3 h   | 105 °C      | 1:1   | -      | 16%                 |
| 3      | 36 h  | 105 °C      | 1:1   | -      | 33%                 |
| 4*     | 22 h  | 105 °C      | 1:1   | 1:1    | 30%                 |
| 5*     | 22 h  | 105 °C      | 1:1,5 | 1:2    | 21%                 |

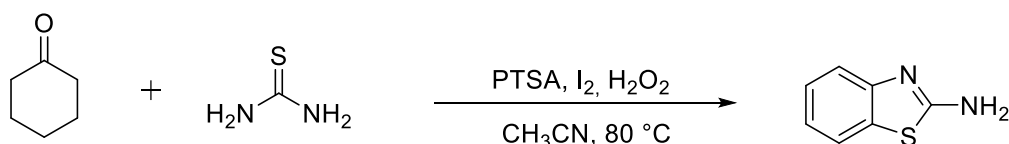
\* Rendimentos obtidos a partir do bruto de reação pela análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H.

Apesar dos materiais de partida não serem completamente consumidos após 36 h de reação, a melhor metodologia para preparação do feniltiourea foi adaptada de

Chikhale *et al.*, reação 4 da Tabela 19, pg. 84.<sup>101</sup> Visto que, na temperatura de 50 °C não houve formação do produto. Com o aumento da temperatura para 105 °C, a reação foi acompanhada por CCD no intervalo de 10 em 10 minutos durante a primeira hora a fim de verificar a formação do subproduto, sendo este, observado nos primeiros 10 minutos da reação. Outra alternativa foi o aumento na proporção de tiocianato fazendo com que a anilina “livre” tivesse maior acesso ao tiocianato, ocasionando em uma melhor competição em relação a feniltioureia. No entanto, foi observado maior formação do subproduto, sendo essa razão produto:subproduto determinada a partir da interpretação do espectro de RMN de <sup>1</sup>H, comparando os valores das integrais referentes aos sinais correspondentes de cada produto, os espectros encontram-se na Figura 59 e Figura 60, pg 117, do anexo 1. Uma possível explicação para o resultado obtido consiste na baixa densidade de carga sobre a tiocarbonila do que no isotiocianato, uma vez que em meio ácido a tiocarbonila estará ativada favorecendo assim a reação consecutiva.

Vale ressaltar que, além das metodologias descritas acima, foram testadas outras metodologias empregando-se ciclohexanona e tioureas como reagentes de partida (Esquema 8). No entanto, nenhum dos procedimentos resultou na formação do produto desejado.<sup>107,108</sup>

Esquema 8. Esquema de síntese de 2-aminobenzotiazol proposto por Bandyopadhyay *et al.*

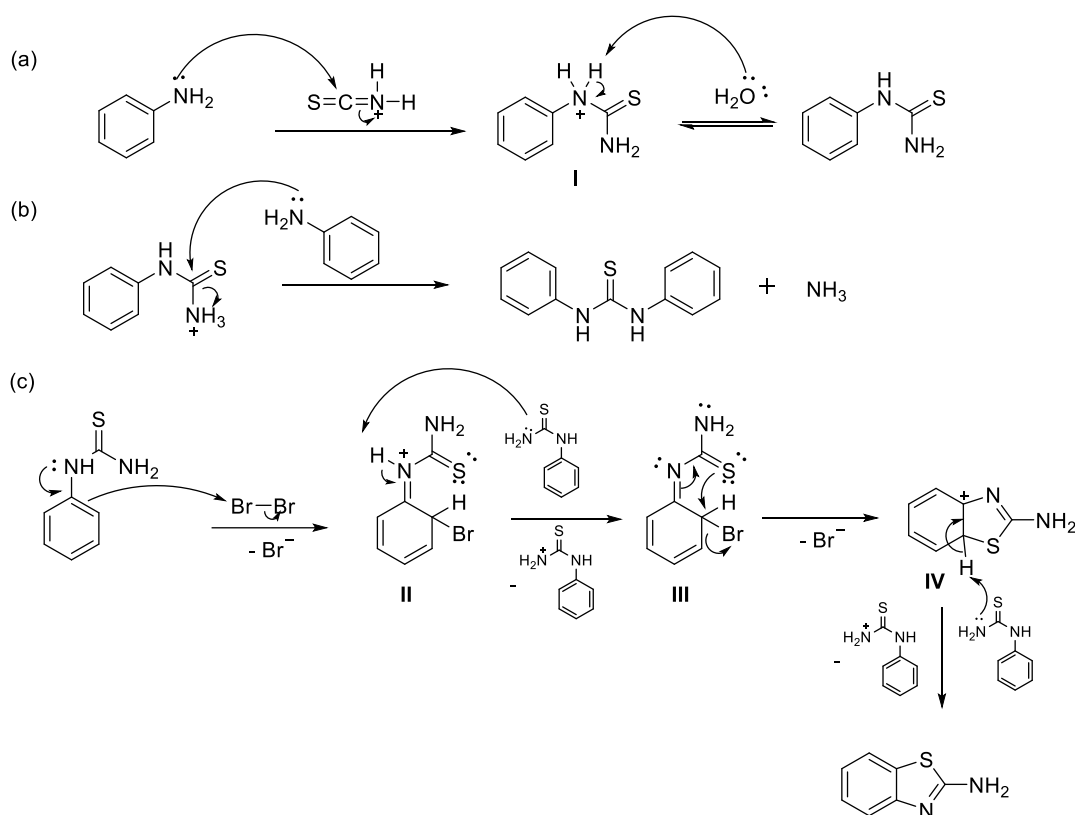


De posse da feniltioureia, foi possível obter o produto de interesse empregando-se a metodologia adaptada de Saeed *et al.*, com rendimento variando de 80 a 88%. O mecanismo proposto para obtenção do 2-aminobenzotiazol (ABZT) consiste no ataque do nitrogênio da anilina ao carbono do tiocianato protonado formando o intermediário I, que após abstração de próton por uma molécula de água, fornece a feniltioureia. Como já abordado, a feniltioureia presente no meio de reação pode sofrer o ataque de outra molécula de anilina formando subproduto (Esquema 9, pg. 86).

A feniltioureia na presença de Br<sub>2</sub> sofre uma substituição eletrofílica aromática liberando o íon brometo para o meio. Em seguida, uma outra molécula de feniltioureia abstrai o próton da tioureia restabelecendo a carga e formando o intermediário III. Para

o fechamento do anel tiazólico, o átomo de enxofre da tiocarbonila ataca o carbono halogenado com a consecutiva perda do íon brometo que participa como contra íon do produto da reação ácido-base entre a feniltioureia e o intermediário **III**. Por fim, o 2-aminobenzotiazol é formado por uma reação ácido-base novamente envolvendo a feniltioureia (Esquema 9).

Esquema 9. Mecanismo proposto para obtenção (a) da feniltioureia, (b) do subproduto e (c) do 2-aminobenzotiazol

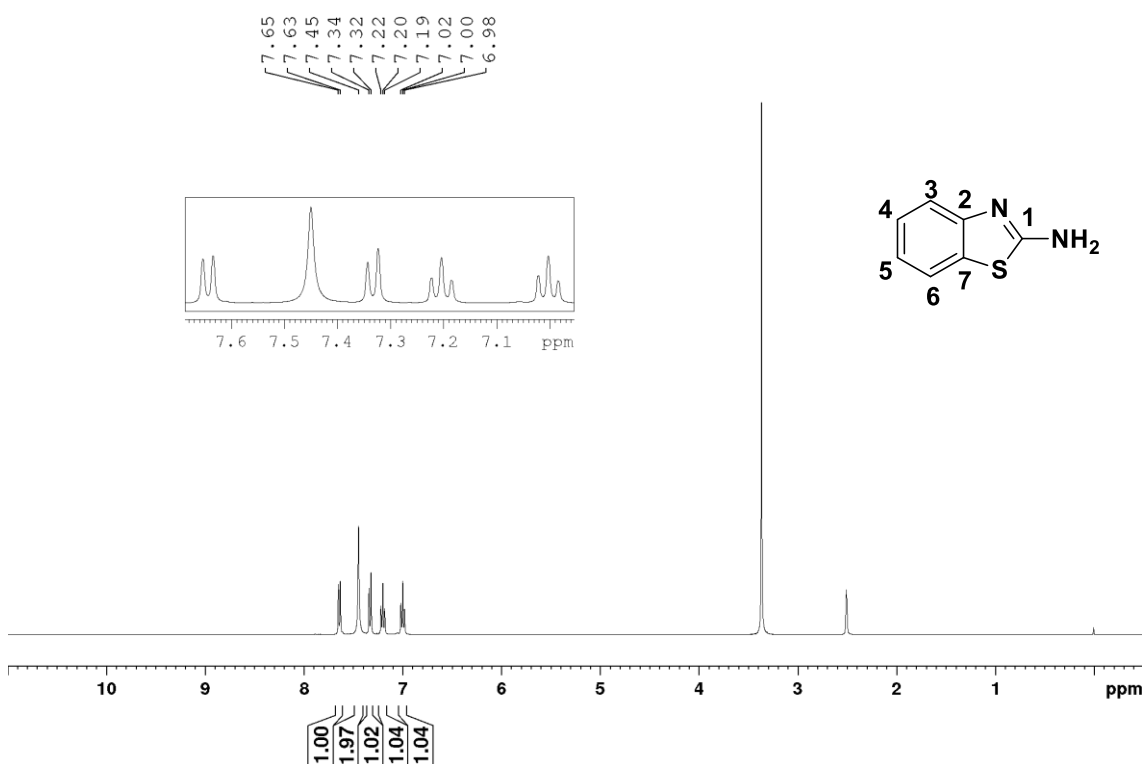


No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para o 2-aminobenzotiazol (tendo  $\text{DMSO}-d_6$  como solvente, Figura 32, pg. 87) foi possível observar maior quantidade de sinais em relação ao 2-aminobenzimidazol, uma vez que a estrutura não apresenta simetria. Em 7,64 ppm foi observado um sinal sob a forma de duplete, integrado para um hidrogênio, que corresponde ao átomo de hidrogênio ligado ao átomo de carbono 3 com constante de acoplamento de 7,70 Hz. Os hidrogênios do grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ) foram observados sob a forma de um simpleto largo, integrado para dois hidrogênios, em 7,45 ppm. O outro duplete em 7,33 ppm foi atribuído ao átomo de hidrogênio ligado ao átomo de carbono 6, apresentando uma constante de acoplamento de 7,9 Hz. Em 7,00 e 7,20 ppm foram observados dois tripletos, integrados para um hidrogênio, com



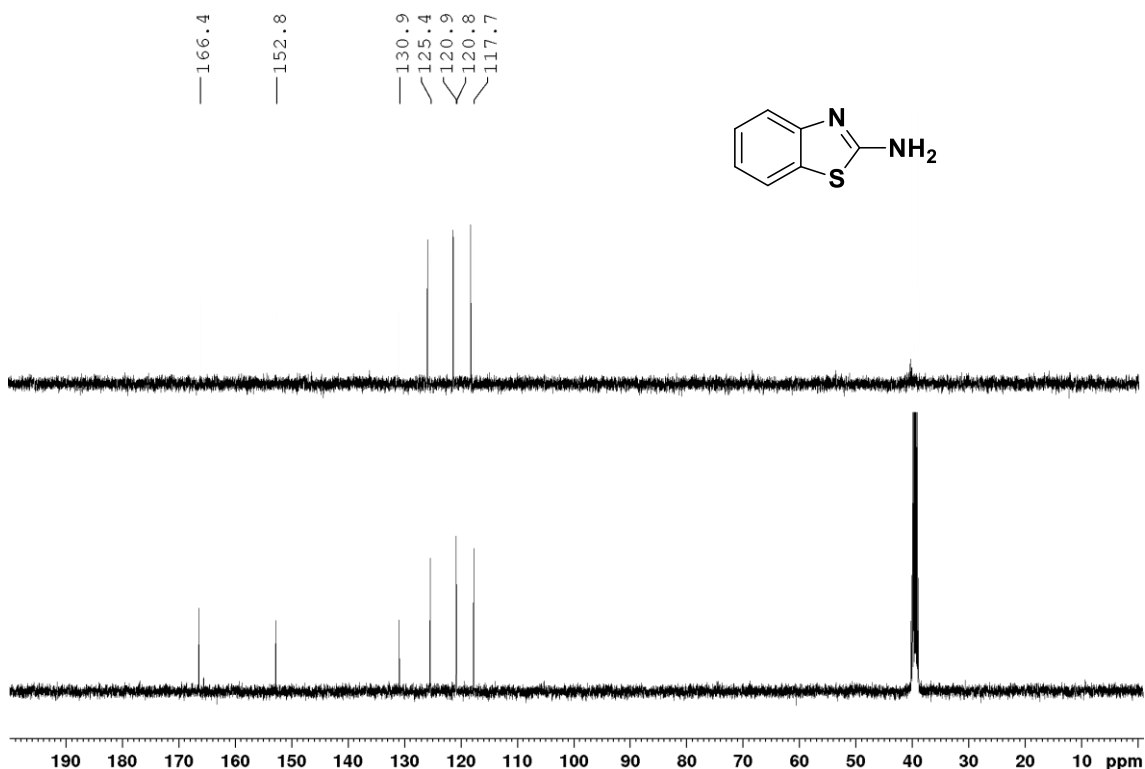
constantes de acoplamento 7,7 e 7,5 Hz, respectivamente. O tripleto com maior deslocamento químico foi atribuído ao átomo de hidrogênio ligado ao carbono C4 (Figura 32) que apresenta maior proximidade ao átomo mais eletronegativo do anel, nitrogênio. Já o sinal em 7,00 ppm foi atribuído ao átomo de hidrogênio ligado ao carbono C5 (Figura 32).

Figura 32. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do 2-aminobenzotiazol

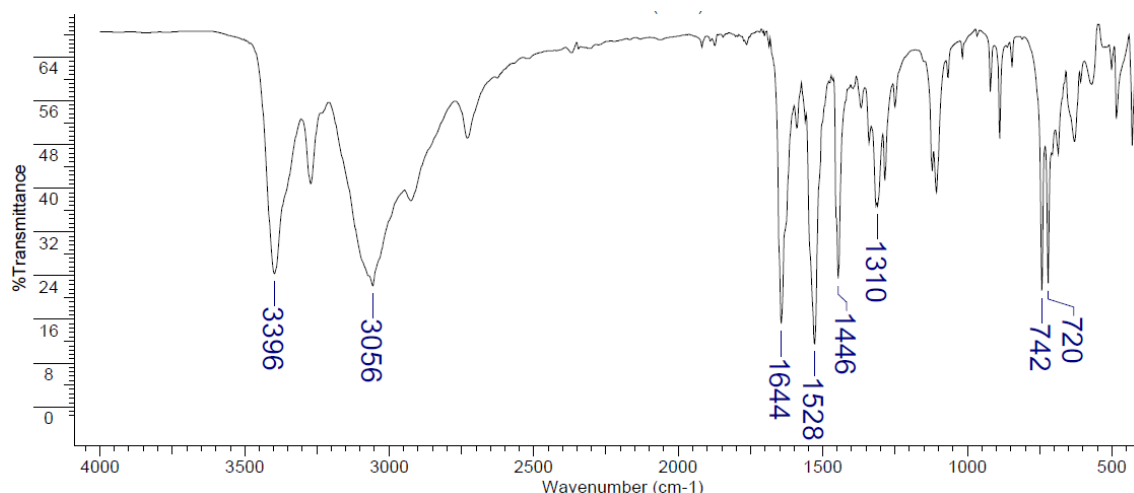


No espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 foi possível relacionar os sinais observados com aqueles relatados na literatura<sup>109</sup> (Tabela 11, pg. 75), sendo quatro sinais referentes aos carbonos hidrogenados e três sinais referentes aos carbonos não hidrogenados. O sinal atribuído ao carbono ligado aos três heteroátomos foi observado em maior deslocamento químico (166,4 ppm), seguido dos carbonos ligados aos átomos de nitrogênio e enxofre, respectivamente em 152,8 e 130,9 ppm. Sendo os demais sinais 117,7; 120,8; 120,9 e 125,4 ppm referentes aos átomos de carbono hidrogenados do anel aromático (Figura 33, pg. 88).

Figura 33. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (abaixo; 100 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ) e DEPT 135 (acima) do 2-aminobenzotiazol



No espectro da região do infravermelho obtido para o composto **ABZT** (Figura 34, pg. 89) foi observado uma banda em 3396 característica de estiramento N-H do grupo  $-\text{NH}_2$  que, conseqüentemente, resulta no aparecimento das bandas atribuídas a deformação angular da respectiva ligação N-H, em 1644. A banda observada em 3056  $\text{cm}^{-1}$  foi atribuída ao estiramento da ligação  $=\text{CH}$  e 1528  $\text{cm}^{-1}$  a ligação  $\text{C}=\text{C}$ . A banda proveniente do estiramento da ligação  $\text{C}=\text{N}$  do anel tiazólico foi observada em 1446  $\text{cm}^{-1}$ , seguida da banda que corresponde à deformação angular C-H do anel aromático em 1310  $\text{cm}^{-1}$ . As demais bandas intensas em 742 e 720  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas a deformação angular C-H do anel aromático.

Figura 34. Espectro na região do IV (em KBr, cm<sup>-1</sup>) do 2-aminobenzotiazol

Após a obtenção do 2-aminobenzotiazol foram avaliadas algumas metodologias variando tempo, aquecimento e solvente (Tabela 20) para obtenção da imina. No entanto, em nenhuma das condições observou-se o consumo dos reagentes de partida.

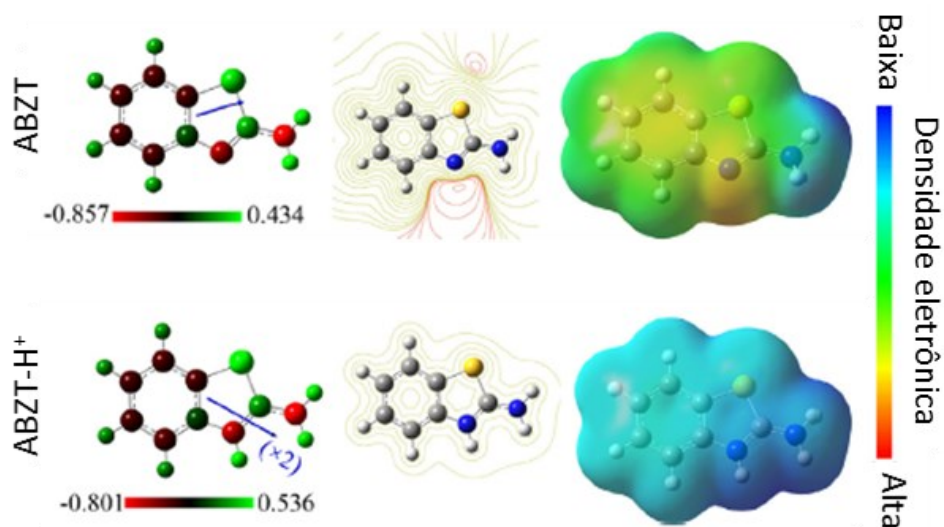
Tabela 20. Metodologias empregadas na tentativa de obtenção do híbrido imina

| Reação | Tempo                   | Aquecimento | Solvente                           | Catalisador          | Referência |
|--------|-------------------------|-------------|------------------------------------|----------------------|------------|
| 1      | 5 min.-1 h <sup>a</sup> | MW / 90°C   | DMF                                | CH <sub>3</sub> COOH | 110        |
| 2      | 6 – 96 h <sup>a</sup>   | t.a.        | DMF                                | CH <sub>3</sub> COOH | 105        |
| 3      | 3-96 h <sup>a</sup>     | Refluxo     | CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH | CH <sub>3</sub> COOH | 111        |

<sup>a</sup>Condições mais severas a fim de se verificar o desaparecimento do material de partida.

Uma possível explicação para o fracasso da reação, como discutido anteriormente para o 2-aminobenzimidazol, envolveria a distribuição da densidade de carga no heterociclo (Figura 35, pg. 90).<sup>112</sup> Danaee *et al.*, apresentam as propriedades eletrostáticas do 2-aminobenzotiazol (**ABZT**) e da espécie protonada (**2-ABTH<sup>+</sup>**). Na representação apresentada pelos autores, Figura 35 pg. 90, a baixa nucleofilia do nitrogênio da amina, coloração azul em **ABZT**, evidencia a preferência de protonação do nitrogênio tiazólico, em relação ao nitrogênio exocíclico, comprovando a maior afinidade eletrônica dos nitrogênios presentes na estrutura, **ABZT**, e a dificuldade de obtenção da imina de interesse.

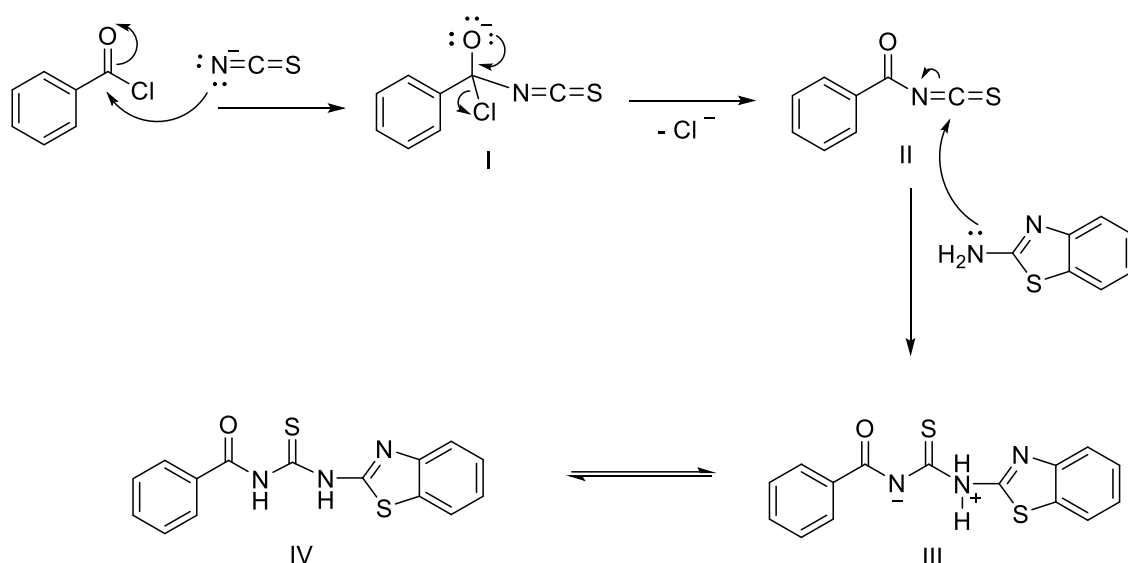
Figura 35. Representação das propriedades eletrostáticas do 2-aminobenzotiazol (ABZT) e sua forma protonada<sup>112</sup>



#### 4.2 Síntese dos híbridos benzotiazóis-benzoiltiureias

Os híbridos benzotiazóis-benzoiltiureias foram obtidos pela metodologia descrita por Saeed *et al.* O mecanismo proposto para a síntese do híbrido IV (Esquema 10, pg.91) baseia-se em um ataque do nitrogênio do tiocianato ao carbono eletrofílico do cloreto de benzoíla com a respectiva migração do par de elétrons da ligação C-O para o átomo de oxigênio. Para formação do isotiocianato de benzoila (II) o par de elétrons do oxigênio assiste a saída do íon cloreto. Então, o grupo amino (-NH<sub>2</sub>) do 2-aminobenzotiazol ataca o carbono mais eletrofílico de II, seguido da migração do par de elétrons da ligação C-N para o átomo de nitrogênio, formando o intermediário III que após reação ácido-base dá origem ao produto de interesse.

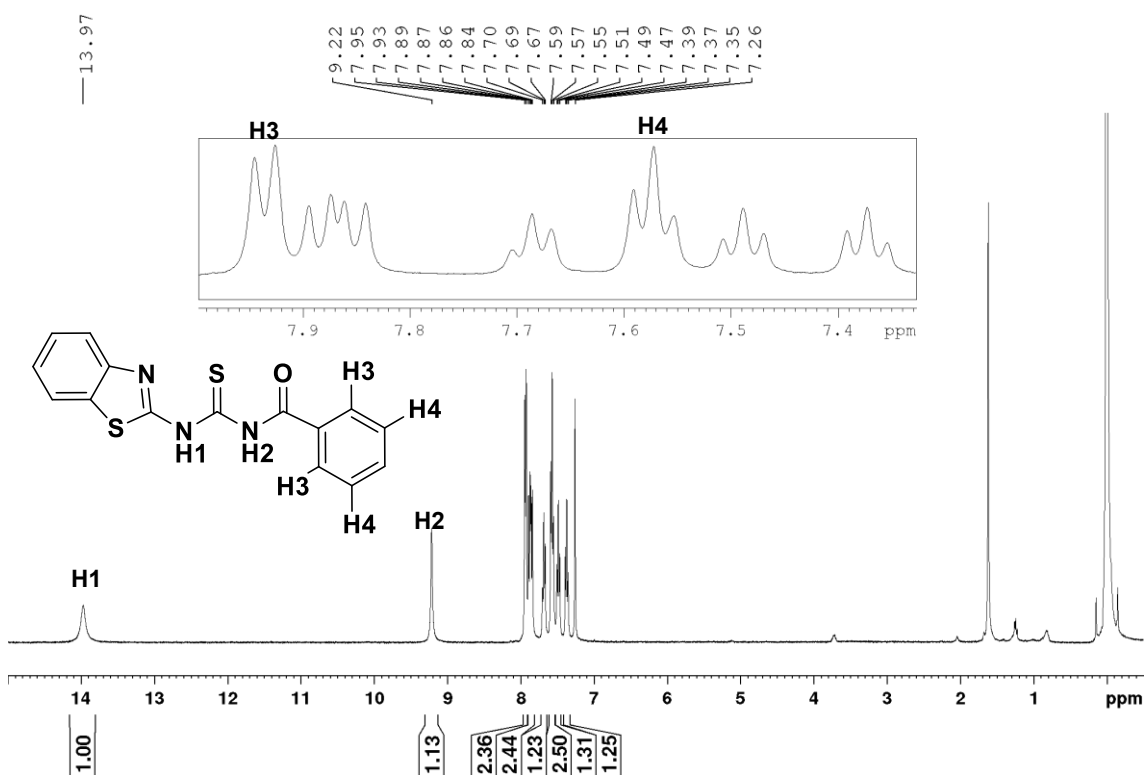
Esquema 10. Mecanismo proposto para obtenção do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol



Como todos os compostos sintetizados não são inéditos, optamos por apresentar a caracterização detalhada do primeiro híbrido sintetizado **HBT-Bz**. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o híbrido (Figura 36, pg.92) foram observados os simpletos ( $\delta$  13,97,  $\text{H}_1$  e 9,22 ppm,  $\text{H}_2$ ) referentes aos átomos de hidrogênio da tioureia. Na região dos hidrogênios aromáticos os sinais atribuídos aos hidrogênios provenientes do cloreto ácido, foram observados sob a forma de um duplete e um tripleto integrados para dois hidrogênios em 7,93 ( $\text{H}_3$ ) e 7,57 ( $\text{H}_4$ ) ppm, respectivamente ( $J = 7,6$  Hz).

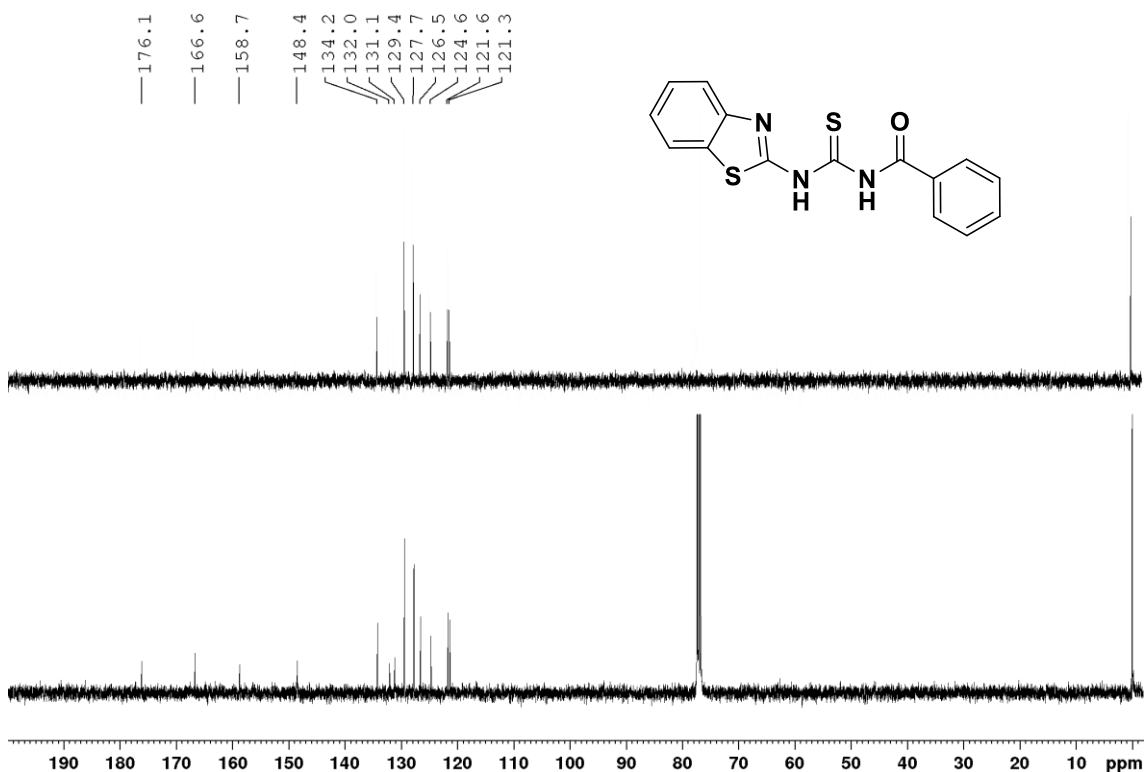
Os demais sinais foram observados na região dos hidrogênios aromáticos em que de acordo com os valores referentes às integrações e multiplicidades, condizem ao número de átomos de hidrogênios não atribuídos do **HBT-Bz**. A atribuição desses sinais será discutida utilizando experimentos de correlações bidimensionais.

Figura 36. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol (HBT-Bz)



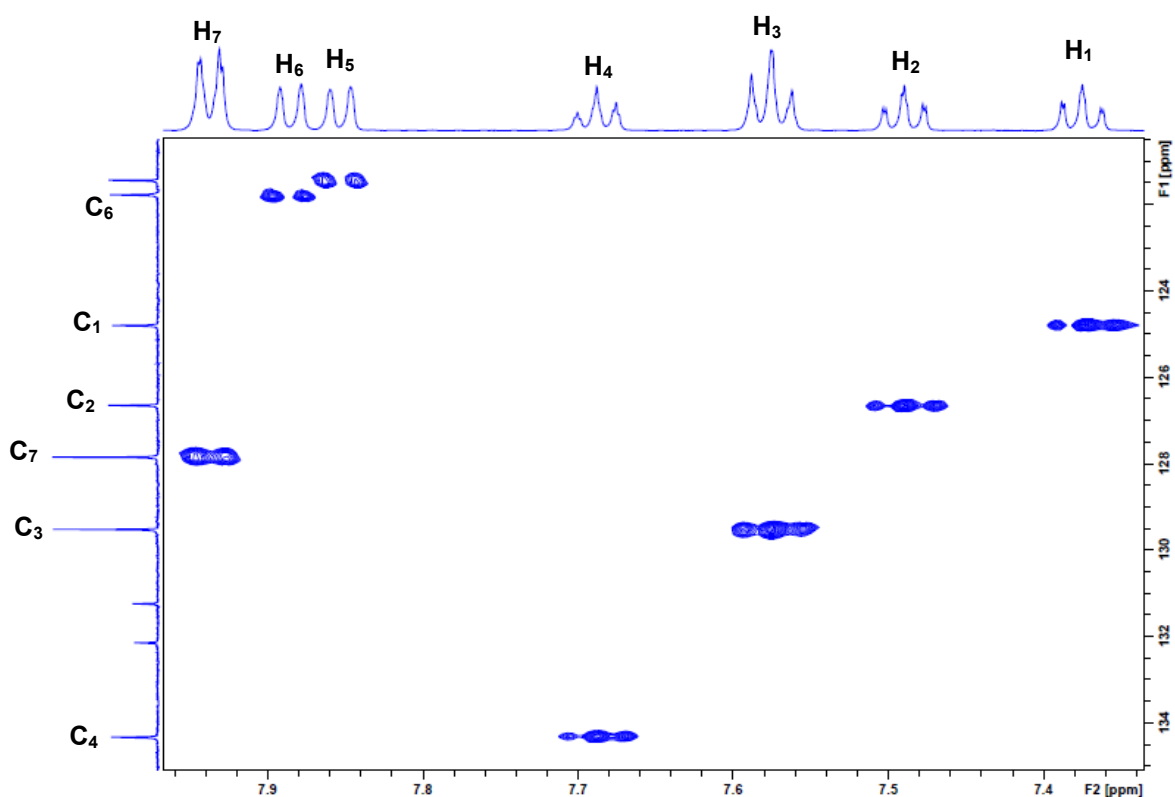
Para o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 (Figura 37, pg.93) foram observados um total de 13 sinais sendo 7 referentes a carbonos hidrogenados, confirmados pelo DEPT, o que está de acordo com a estrutura química proposta para o produto de interesse. Na região mais desblindada do espectro foram observados os sinais da tioureia, tiazol e carbonila em 176,1; 166,6 e 158,7 ppm, respectivamente.

Figura 37. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (abaixo; 100 MHz;  $\text{CDCl}_3$  e DEPT 135 (acima) do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol (HBT-Bz)

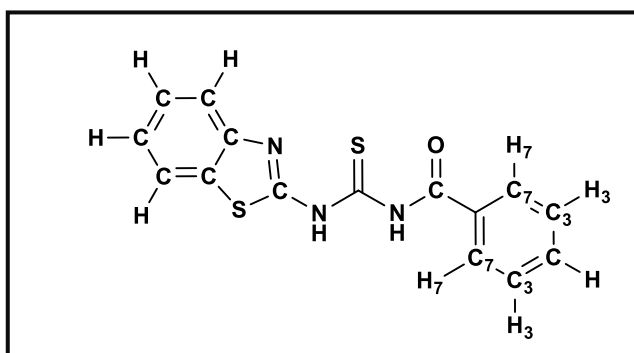


Os espectros presentes na literatura apresentam discrepância entre si e na grande maioria não reportam todos os sinais, uma vez que, dependendo do solvente, os átomos de hidrogênio ligado ao nitrogênio podem trocar com o átomo de deutério proveniente da água presente no solvente. Já nos espectros de  $^{13}\text{C}$  os átomos de carbonos relaxam muito lentamente dificultando sua visualização em experimentos rotineiros, sendo necessário alteração de alguns parâmetros, como, tempo de aquisição, resolução e o intervalo de relaxação, na aquisição do espectro. Além de apresentarmos todos os sinais referentes no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , podemos correlacionar os sinais em experimentos bidimensionais, como por exemplo, HSQC, que correlaciona o sinal do átomo de hidrogênio ao sinal referente ao átomo de carbono no qual encontra-se ligado em interações do tipo  $^1J_{\text{CH}}$ .

Figura 38. Seções expandidas do mapa de contornos HSQC do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol (HBT-Bz)



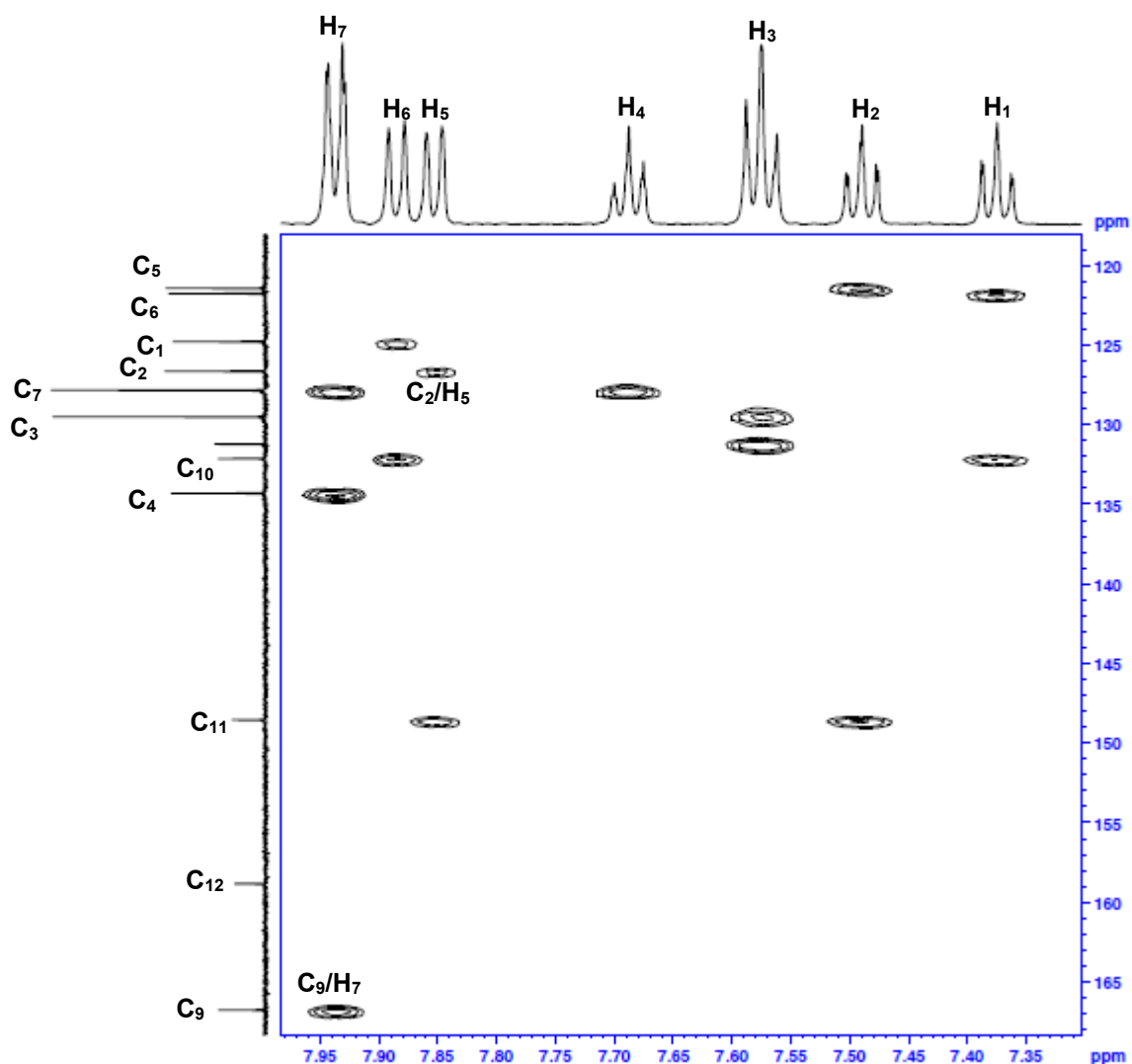
Foram observados sete sinais no mapa de contornos HSQC para o composto **HBT-Bz**, em concordância ao observado no espectro DEPT-135. Dessa forma os sinais foram numerados em ordem crescente de deslocamento químico do espectro de  $^1\text{H}$  e o número correlacionado ao respectivo carbono. A partir dessas informações e os valores referentes às integrações obtidas no espectro de  $^1\text{H}$ , foi possível atribuir alguns átomos de carbono  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_7$  da estrutura em análise.



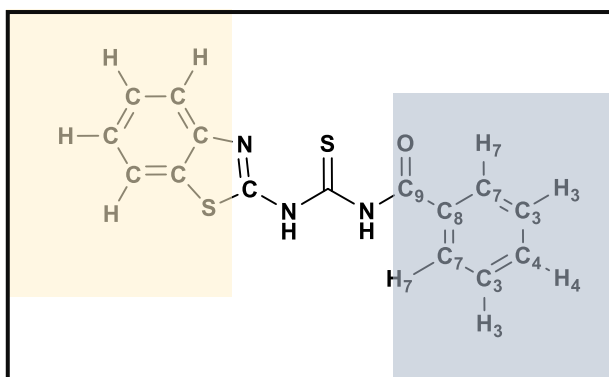


Outro experimento bidimensional que foi essencial para correlacionar os sinais referentes ao composto **HBT-Bz** é o mapa de contornos HMBC que permite visualizar interações entre átomos de hidrogênio e carbono em  ${}^nJ_{CH}$ ,  $n \geq 2$ .

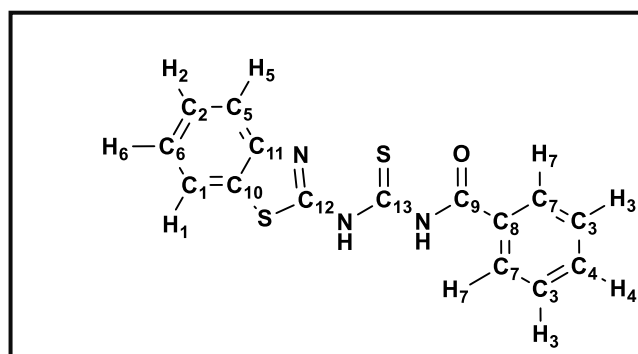
Figura 39. Seções expandidas do mapa de contornos HMBC do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol



Para facilitar as atribuições, as correlações começaram a serem analisadas a partir dos sinais já elucidados, no caso H<sub>3</sub> e H<sub>7</sub>. Sendo assim, determinou-se que o átomo H<sub>3</sub> se correlaciona a um átomo de carbono não hydrogenado, mas especificamente o de deslocamento químico em 131,1 ppm, C<sub>8</sub>. Em seguida, o átomo de hidrogênio intitulado H<sub>7</sub> se correlaciona ao sinal referente ao átomo de carbono C<sub>4</sub> e ao átomo de carbono não hydrogenado em elevado deslocamento químico sendo então atribuído ao átomo de carbono carbonílico C<sub>9</sub>, finalizando a atribuição do fragmento proveniente do cloreto ácido.



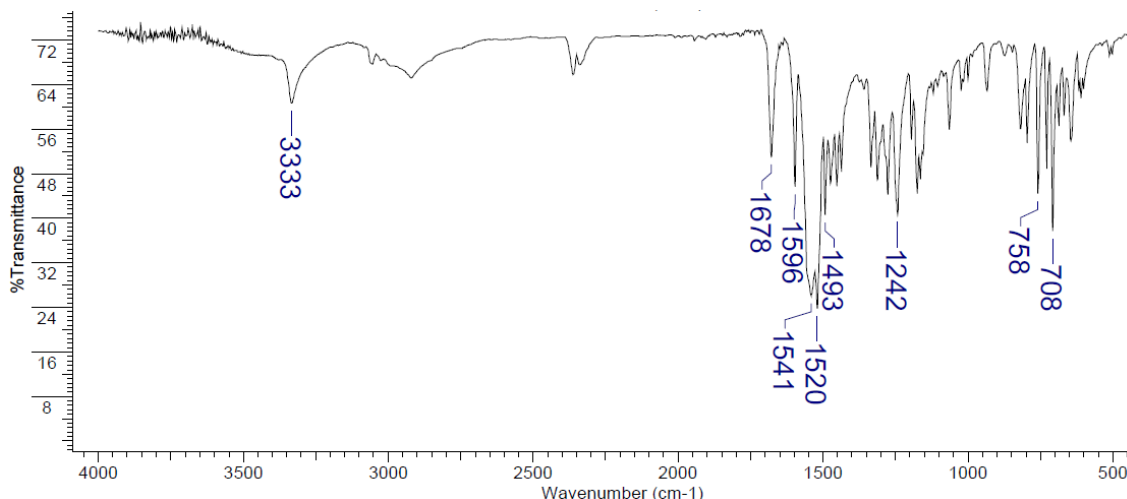
No fragmento proveniente do benzotiazol, as atribuições foram iniciadas pelo átomo de hidrogênio H<sub>1</sub> que se correlaciona ao átomo de carbono C<sub>6</sub> e ao átomo de carbono não hydrogenado vizinho ao átomo de enxofre, C<sub>10</sub>. Por fim, o sinal referente ao átomo de hidrogênio H<sub>2</sub> se correlaciona ao sinal de elevado deslocamento químico, 148,4 ppm, atribuído ao carbono vizinho ao nitrogênio do anel benzotiazolico (C<sub>11</sub>), que também está correlacionado ao sinal atribuído ao átomo de hidrogênio H<sub>5</sub>. Os sinais referentes a átomos de carbono que não apresentaram correção no mapa de contornos HMBC encontram-se a uma distância superior a  $^3J_{CH}$  e passam por heteroátomos que dificultam a visualização dessas correlações, sendo esses, atribuídos segundo Pretsch *et al.*<sup>109</sup>



No espectro na região do infravermelho obtido para o composto **HBT-Bz** (Figura 40, pg. 97) foi observado uma banda em  $3333\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento N-H da tiourea e à banda referente a carbonila da amida foi observada em  $1678\text{ cm}^{-1}$ . O anel tiazólico apresenta duas bandas características referentes aos estiramento C=N e C-S que foram observadas em  $1596$  e  $1493\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. A deformação angular da ligação N-H da tiourea foi observada como banda intensa em  $1541$ . Em  $1520\text{ cm}^{-1}$  foi observada a banda atribuído a ligação C=C de carbonos aromáticos. A banda referente ao estiramento C=S foi observada em  $1243\text{ cm}^{-1}$ ,

seguida das bandas correspondentes a deformação angular C-H do anel aromático, 758 e 708  $\text{cm}^{-1}$ .

Figura 40. Espectro na região do IV (em KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol



Após etapa de recristalização, a pureza dos compostos sintetizados foi verificada através da técnica de cromatografia em camada delgada (CCD). No entanto, para composto **HBT-3-CI** foram visualizadas duas manchas na CCD sendo necessário uma purificação por cromatografia em coluna. Após isolados, os dois produtos foram caracterizados por RMN de  $^1\text{H}$  e descritos na Tabela 21.

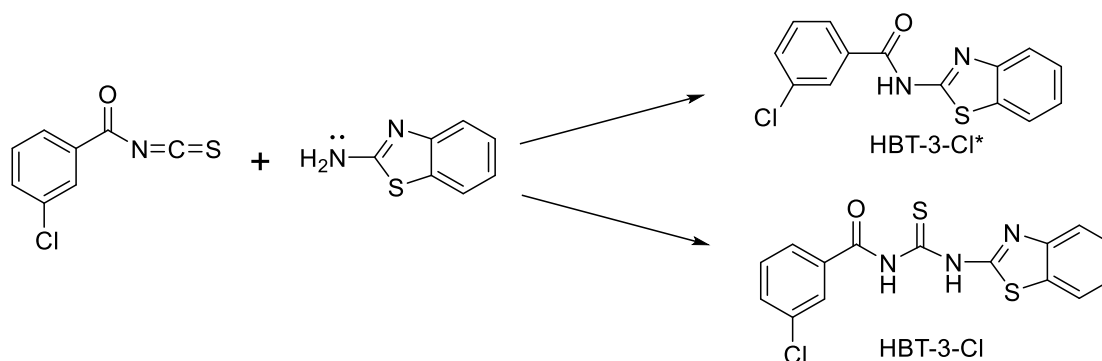
Tabela 21. Sinais observados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para os dois produtos provenientes de síntese do híbrido (**HBT-3-CI**)

| <i>RMN de <math>^1\text{H}</math>, 400 MHz, DMSO-<math>d_6</math></i><br>HBT-3-CI |           |   |        | <i>RMN de <math>^1\text{H}</math>, 400 MHz, DMSO-<math>d_6</math></i><br>HBT-3-CI* |           |   |        |
|---|-----------|---|--------|--|-----------|---|--------|
| $\delta$ (ppm)  | M         | I | J (Hz) | $\delta$ (ppm)   | M         | I | J (Hz) |
| 14,10   | <i>br</i> | 1 | -      | 13,00  | <i>br</i> | 1 | -      |
| 12,34   | <i>br</i> | 1 | -      | 8,20   | <i>s</i>  | 1 | -      |
| 8,05  | <i>m</i>  | 2 | -      | 8,08   | <i>d</i>  | 1 | 7,8    |
| 7,93  | <i>d</i>  | 1 | 8,0    | 8,01   | <i>d</i>  | 1 | 7,9    |
| 7,80  | <i>d</i>  | 1 | 7,7    | 7,78   | <i>d</i>  | 1 | 8,0    |
| 7,75  | <i>d</i>  | 1 | 8,0    | 7,72   | <i>d</i>  | 1 | 7,9    |
| 7,59  | <i>t</i>  | 1 | 7,9    | 7,59   | <i>t</i>  | 1 | 7,8    |
| 7,51  | <i>t</i>  | 1 | 7,7    | 7,47   | <i>t</i>  | 1 | 7,7    |
| 7,40  | <i>t</i>  | 1 | 8,3    | 7,34   | <i>t</i>  | 1 | 7,5    |

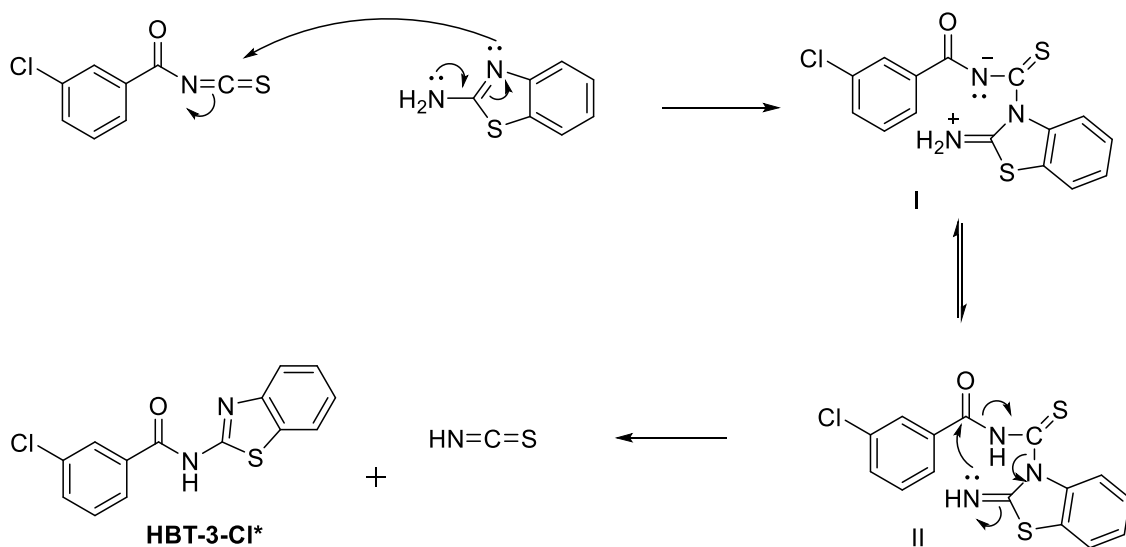
Foi possível observar que a principal diferença entre os dois espectros, além de pequenas variações de deslocamentos químicos, é um sinal largo adicional, acima de 12 ppm. Além disso, para o composto **HBT-3-CI**, foram realizados experimentos

de Espectrometria de Massas e RMN de  $^{13}\text{C}$  utilizando  $\text{CDCl}_3$  como solvente já que em  $\text{DMSO}-d_6$  não foi possível visualizar todos os sinais referentes aos átomos de carbono. Sendo assim, relacionando os resultados obtidos com os presentes na literatura foi possível elucidar os dois produtos obtidos (Esquema 11).

Esquema 11. Ilustração esquemática dos dois produtos de adição obtidos na síntese de **HBT-3-Cl**



Além do produto de interesse **HBT-3-Cl**, proveniente do ataque ao carbono do isotiocianato (Esquema 10, pg.91), também foi obtido o produto (**HBT-3-Cl\***) proveniente ao ataque a carbonila. Com base no mecanismo proposto por Rani *et al.*, a formação do composto **HBT-3-Cl\*** a partir do isotiocianato de benzóíla consiste no ataque do par de elétrons do nitrogênio no anel tiazólico assistido pelo par de elétrons do nitrogênio exocíclico formando o intermediário I (Esquema 12, pg. 99).<sup>113</sup> Em seguida, tem-se uma reação ácido base reestabelecendo a carga entre os átomos envolvidos (II). A próxima etapa consiste em uma adição a carbonila seguida de uma eliminação do ácido tiociânico, formando assim o produto de interesse, **HBT-3-Cl\*** (Esquema 12, pg. 99).

Esquema 12. Mecanismo proposto para obtenção da benzamida (**HBT-3-Cl\***)

Na preparação dos híbridos provenientes do cloreto de acila substituídos na posição *orto* do anel, seja pelo átomo de cloro ou grupamento metóxila, não foram identificados os produtos de interesse, benzoiltioureia, sendo o precipitado formado apenas referente ao produto de adição à carbonila. A proposta para a formação dos compostos **HBT-2-Cl\*** e **HBT-2-OMe\*** segue o mecanismo proposto no Esquema 12. Apesar dos compostos sintetizados nesse trabalho não serem inéditos, a referência encontrada para o derivado **HBT-2-OMe** não apresenta seus dados experimentais citando tal composto como um intermediário para outra etapa sintética.<sup>114</sup> Já o composto **HBT-2-Cl** foi obtido e caracterizado por Khan *et. al.*, em que os pesquisadores apresentaram o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  com sinais que evidenciam a estrutura de interesse.<sup>115</sup> No entanto, foi observado uma discrepância notável no espectro de massas, sendo apresentado pelos autores uma relação de massa carga ( $m/z$ ) de 290 o que poderia ser aceito, como resultado do uso de uma fonte de ionização de Impacto Eletrônico (EI), mas essa relação representa a massa do composto caso o ataque ocorra na carbonila.

Não podemos afirmar que o composto obtido por Khan *et al.* não seja o híbrido desejado mas nesse trabalho, foram adotados os mesmos materiais de partida diferenciando o solvente e a forma de aquecimento e só foi obtido a benzamida **HBT-2-Cl\*** cujo sinal observado no espectro de massas foi de  $m/z$  289,12, compatível com a massa nominal do composto mais um próton. No momento, estamos realizando

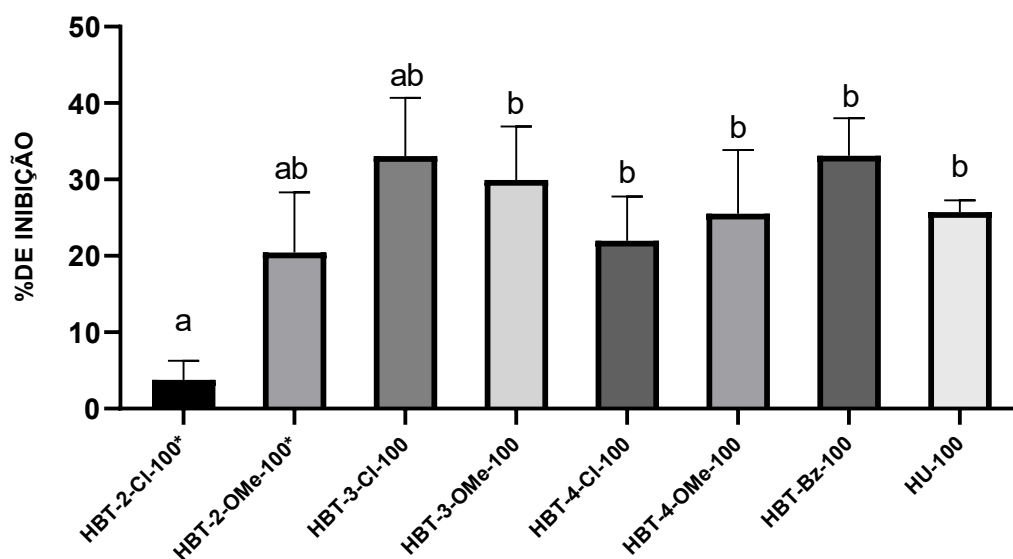
estudos teóricos para justificar o favorecimento do produto correspondente ao ataque à carbonila mas acreditamos, sob o ponto de vista da química orgânica clássica, que esteja havendo uma competição referente ao carbono mais propício ao ataque e que as condições experimentais possam estar contribuindo para formação dos dois tipos do produtos.

Para esses derivados cujo o produto obtido não foram os compostos de interesse **HBT-2-OMe\*** e **HBT-2-Cl\***, os dados experimentais foram comparados na literatura com os compostos provenientes ao ataque a carbonila, amidas, além de ter sido realizado o experimento de Espectrometria de Massas, confirmando o produto obtido. Os espectros referentes a caracterização dos demais híbridos encontram-se no anexo I, pg.111.

#### **4.3 Testes *in vitro* dos compostos sintetizados frente a enzima purificada de *C. ensiformes*.**

A determinação da atividade dos compostos frente a enzima urease purificada de *C. ensiformes* foi realizada a partir do método do indofenol como descrito no item 4.2 do capítulo 1 (pg.57). Diferentemente dos derivados de aminoácidos, os híbridos são pouco solúveis em etanol, solvente utilizado para o ensaio *in vitro*, dificultando, assim, os experimentos. No entanto, foi possível determinar a porcentagem de inibição a uma concentração de 100  $\mu\text{M}$  (Figura 41, pg. 101), uma vez que acima dessa concentração houve precipitação de alguns compostos na placa de 96 poços, prejudicando a leitura e, conseqüentemente, inviabilizando os experimentos.

Figura 41. Porcentagem de inibição da enzima urease, a uma concentração de 100  $\mu$ M dos inibidores e hidroxiureia como inibidor de referência



\*letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre os compostos avaliados

Foi observado que, com exceção do híbrido **HBT-2-Cl**, todos os compostos sintetizados, inibiram a enzima urease a uma porcentagem comparável ao inibidor referência hidroxiureia. Em 2016, Rauf *et al.* sintetizaram e testaram o híbrido **HBT-3-Cl** encontrando resultado de inibição próximo ao obtido nesse trabalho, no entanto a concentração utilizada pelo grupo de pesquisadores<sup>116</sup> está em uma concentração 10 vezes superior a testada nesse trabalho, o que surpreende, já que o composto é pouco solúvel em etanol. Existem trabalhos que utilizam uma pequena proporção de DMSO para solubilizar os compostos, no entanto, já foi comprovado que esse solvente possui atividade frente a enzima não sendo uma boa opção para esses estudos.

De uma maneira geral, os resultados de inibição mostraram que, com exceção ao híbrido derivado do 2-Cl-cloreto de benzoíla, todos os compostos apresentaram resultados de inibição estatisticamente similares, não sendo possível definir qual foi o mais eficiente. No entanto, podemos concluir que os compostos foram eficientes tanto quanto o inibidor de referência. Em comparação aos derivados de aminoácidos estudados no primeiro capítulo, foram observados maiores desvios associados aos inibidores sintetizados. Isso pode ser explicado pela baixa solubilidade dos compostos que apesar de gerar uma solução visivelmente límpida na placa de 96 poços a 100  $\mu$ M, durante a leitura, pequenas partículas podem ter contribuído para discrepância entre os resultados. Com o intuito de avançar com o melhor inibidor para o

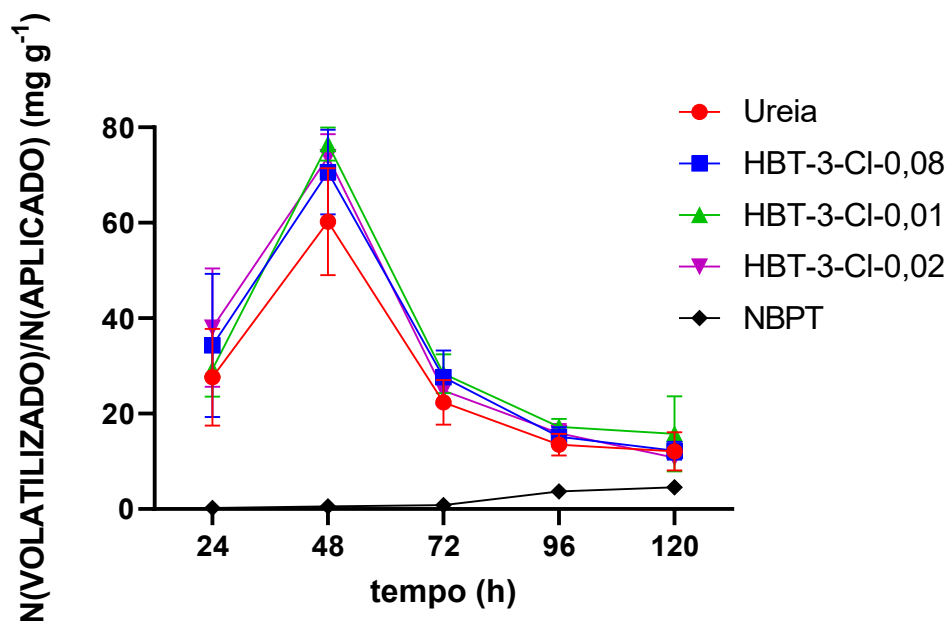
experimento de volatilização, apesar da maioria dos inibidores serem estatisticamente iguais, optou-se por selecionar o composto **HBT-3-CI**, que possui atividade anti-ureolítica, reconhecida na literatura frente a enzima isolada de *C. ensiformis* (*Jack bean*).

#### **4.4 Ensaio de volatilização de NH<sub>3</sub> pelo método de fluxo contínuo de ar em câmara fechada**

A avaliação dos inibidores sintetizados no ensaio de volatilização de amônia pelo método de fluxo contínuo de ar foi realizado seguindo o mesmo princípio discutido no item 4.3 do capítulo 1, pg.64. No entanto, para o derivado de aminoácido, foi utilizado uma concentração 1% m/m em relação a ureia e nesse caso, como o inibidor em questão apresenta baixa solubilidade, foram utilizadas três concentrações sendo elas: 0,08; 0,01; 0,02 % m/m em relação a ureia. Sendo a concentração de 0,08 % a adotada comercialmente para o produto referência na inibição da urease na agricultura **NBPT**, para esse ensaio o **NBPT** foi utilizado na concentração de 0,08 % m/m em relação a ureia. Dessa forma, foi possível quantificar a perda de nitrogênio na forma de gás amônia proveniente da ureia, estabelecendo-se a quantidade de nitrogênio perdido (mg) por nitrogênio aplicado (g) em 24, 48, 72, 96, 120 horas (Figura 42, pg. 103).

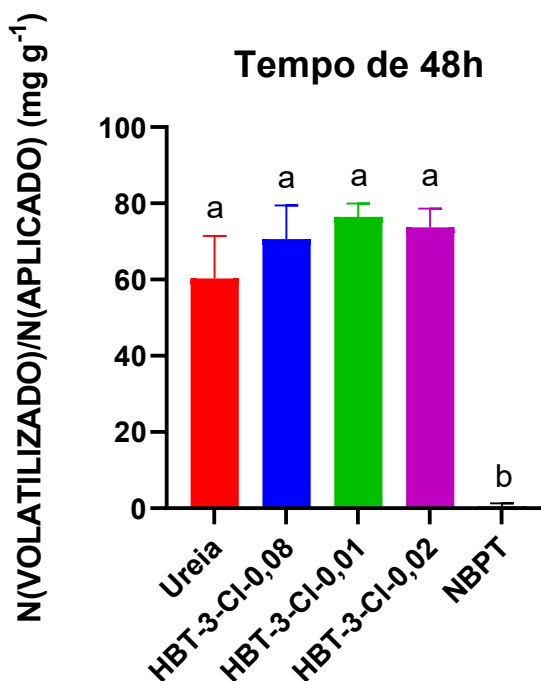


Figura 42. Taxa da perda de nitrogênio volatilizado por nitrogênio aplicado



No gráfico correspondente a taxa da perda de nitrogênio volatilizado sob a forma de amônia, Figura 42, também foi observado um máximo de volatilização no segundo dia de experimento. Aparentemente sem considerar os desvios, tem-se a impressão que o composto sintetizado favorece a volatilização, uma vez que a curva referente a ureia encontra-se em uma posição inferior as demais. Na Figura 43,104, em que foram realizados os testes de ANOVA One-way e Tukey, em que letras iguais indicam que não há diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) para a leitura no intervalo de 24 a 48 h da ureia e ureia na presença do composto sintetizado, percebe-se que o composto sintetizado possui a mesma perda de amônia quando comparada a ureia, evidenciando que o composto não possui atividade na concentração testada. Já como era de se esperar, o inibidor de referência, NBPT, mostrou sua eficácia na concentração que é utilizado na agricultura, reduzindo em praticamente 100% a perda de amônia no tempo máximo de volatilização da ureia.

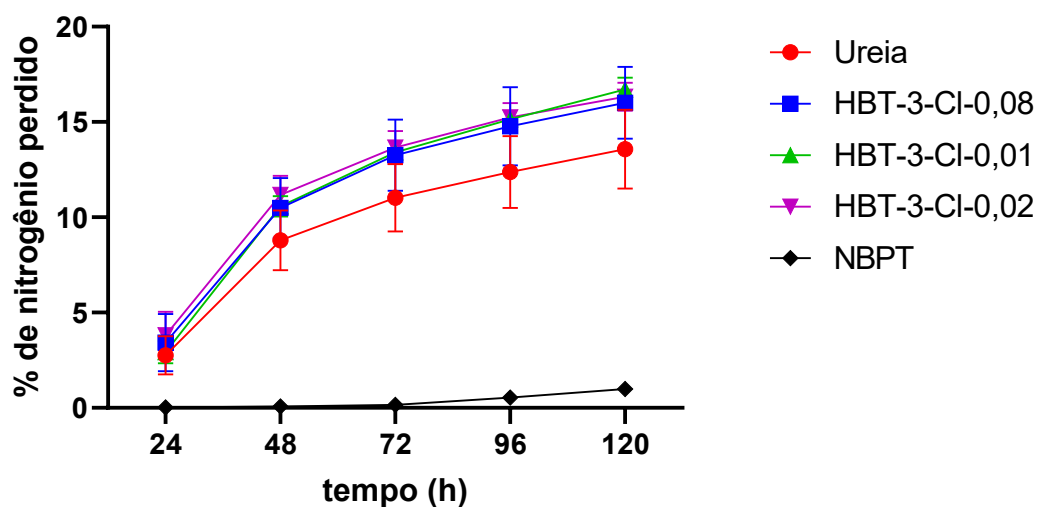
Figura 43. Perda de nitrogênio sob a forma de amônia de 24 a 48h.



\*letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre os compostos avaliados

No gráfico que mostra a porcentagem de nitrogênio perdido (Figura 44), não foi observado uma diferença estatística na perda de nitrogênio com o aumento na concentração do composto sintetizado sendo os dados muito próximo ao observado para ureia.

Figura 44. Perda acumulada de nitrogênio por tempo a partir da ureia



## 5. Conclusão e Perspectivas

O precursor para a síntese dos híbridos foi obtido de uma maneira viável e otimizada com 88% de rendimento. Apesar das dificuldades envolvidas na tentativa de obtenção das respectivas iminas, foram discutidos possíveis justificativas para a baixa reatividade da amina correspondente.

Foram obtidos 5 híbridos benzotiazol-benzotioureia (**HBTs**) com rendimentos que variaram de 47 à 81%. Os compostos sintetizados, foram avaliados em estudos *in vitro* frente a enzima urease isolada de *C. ensiformis*. Através dos testes estatísticos foi demonstrado que, com exceção do híbrido **HBT-2-CI\***, todos os compostos sintetizados foram tão eficientes quanto o inibidor de referência, hidroxioureia, a uma concentração de 100  $\mu$ M. No ensaio de quantificação de amônia volatilizada, pelo método de fluxo contínuo de ar em câmara fechada, o composto mais promissor que possui atividade comprovada na literatura em ensaios *in vitro*, **HBT-3-CI**, não reduziu a perda de nitrogênio no uso de ureia. Uma alternativa para obtenção de resultados mais promissores seria o preparo de uma formulação contendo o inibidor ou um estudo envolvendo concentrações mais elevadas. De toda forma deve-se avaliar até qual concentração seria vantajoso aplicar um inibidor, visto que o composto de referência é eficiente em concentrações mais baixas.

## 6. Conclusão Geral e Perspectivas

De uma maneira geral foram sintetizados e avaliados 20 compostos frente a inibição da enzima urease isolada de *C. ensiformis* encontrando resultados promissores em comparação ao inibidor de referência utilizado. Foi desenvolvido e padronizado um novo experimento mais representativo e robusto para avaliação de inibidores de urease. Apesar dos compostos sintetizados não mostrarem atividade no experimento de volatilização, essa nova aquisição vai contribuir para estudos de novos inibidores e até mesmo a obtenção de formulações com inibidores já estudados, tendo como perspectiva obter um produto que possa impactar o uso da ureia e seus prejuízos econômicos e ambientais relacionados a perda de nitrogênio na agricultura.

Sob o ponto de vista medicinal tem-se como perspectiva a avaliação da atividade anti-ureolítica dos compostos frente a outras cepas bacterianas como por exemplo *H. pylori*, *Cryptococcus* e *P. mirabilis*.

## Referências

1. Wöhler, F.; *Ann. Phys.* **1828**, *88*, 253.
2. Mobley, H. L.; Island, M. D.; Hausinger, R. P.; *Microbiol. Rev.* **1995**, *59*, 451.
3. Krajewska, B.; *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2009**, *59*, 9.
4. Sumner, J. B.; *J. Biol. Chem.* **1926**, *69*, 435.
5. Dixon, N. E.; Gazzola, C.; Blakeley, R. L.; Zerner, B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 4131.
6. Shaw, W. H. R.; Bordeaux, J. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 4729.
7. Rollinson, A. N.; Jones, J.; Dupont, V.; Twigg, M. V.; *Energy Environ. Sci.* **2011**, *4*, 1216.
8. Karplus, P. A.; Pearson, M. A.; Hausinger, R. P.; *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 330.
9. Jabri, E.; Karplus, P. A.; *Biochemistry* **1996**, *35*, 10616.
10. Benini, S.; Ciurli, S.; Nolting, H. F.; Mangani, S.; *Eur. J. Biochem.* **1996**, *239*, 61.
11. Ha, N. C.; Oh, S. T.; Sung, J. Y.; Cha, K. A.; Lee, M. H.; Oh, B. H.; *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 505.
12. Benini, S.; Rypniewski, W. R.; Wilson, K. S.; Miletti, S.; Ciurli, S.; Mangani, S.; *Structure* **1999**, *7*, 205.
13. Maroney, M. J.; Ciurli, S.; *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4206.
14. Mobley, H. L.; Hausinger, R. P.; *Microbiol. Rev.* **1989**, *53*, 85.
15. Follmer, C.; *Phytochemistry* **2008**, *69*, 18.
16. Newbould, P.; *Plant Soil* **1989**, *115*, 297.
17. Modolo, L. V.; da-Silva, C. J.; Brandão, D. S.; Chaves, I. S.; *J. Adv. Res.* **2018**, *13*, 29–37.
18. Bremner, J. M.; *Fertil. Res.* **1995**, *42*, 321.
19. Heffer, P.; Prud'homme, M.; *Int. Fertil. Assoc. (IFA). 7th Int. Nitrogen Initiat. Conf.* **2016**.
20. Cantarella, H.; Otto, R.; Soares, J. R.; Silva, A. G. de B.; *J. Adv. Res.* **2018**, *13*, 19–27.
21. Taiz, L.; Zeiger, E.; Møller, I. M.; Murphy, A. *Fundamentos de Fisiologia Vegetal-6*; Artmed Editora, 2021.
22. Barrios, A. M.; Lippard, S. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9172.
23. Bayrakli, F.; *Fertil. Res.* **1990**, *23*, 147.
24. Turner, P. A.; Griffis, T. J.; Lee, X.; Baker, J. M.; Venterea, R. T.; Wood, J. D.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, 9839.
25. Matthews, E.; *Global Biogeochem. Cycles* **1994**, *8*, 411.
26. Marshall, B. J.; Warren, J. R.; *Lancet.* **1984**, *1*, 1311.
27. Burne, R. A.; Chen, Y.-Y. M.; *Microbes Infect.* **2000**, *2*, 533.
28. Krebs, H. A.; Henseleit, K.; *Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem.* **1932**, *210*, 33.
29. Collins, C. M.; D'Orazio, S. E. F.; *Mol. Microbiol.* **1993**, *9*, 907.
30. Morou-Bermudez, E.; Elias-Boneta, A.; Billings, R. J.; Burne, R. A.; Garcia-Rivas, V.; Brignoni-Nazario, V.; Suarez-Perez, E.; *Arch. Oral Biol.* **2011**, *56*, 1282.
31. Schaffer, J. N.; Pearson, M. M.; *Microbiol. Spectr.* **2015**, *3*.
32. Armbruster, C. E.; Mobley, H. L. T.; Pearson, M. M.; *EcoSal Plus* **2018**, *8*.
33. Graham, D. Y.; Miftahussurur, M.; *J. Adv. Res.* **2018**, *13*, 51.
34. Guth, P. H.; Kaunitz, J. D.; *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **2008**, *294*, G1109.
35. Montecucco, C.; Rappuoli, R.; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 457.
36. Brown, L. M.; *Epidemiol. Rev.* **2000**, *22*, 283.
37. Rego, Y. F.; Queiroz, M. P.; Brito, T. O.; Carvalho, P. G.; de Queiroz, V. T.; de Fátima, Â.; Macedo Jr., F.; *J. Adv. Res.* **2018**, *13*, 69.
38. Follmer, C.; *J. Clin. Pathol.* **2010**, *63*, 424.
39. Graham, D. Y.; Fischbach, L.; *Gut* **2010**, *59*, 1143.
40. Mégraud, F.; *Therap. Adv. Gastroenterol.* **2012**, *5*, 103.
41. Michetti, P.; Kreiss, C.; Kotloff, K. L.; Porta, N.; Blanco, J.; Bachmann, D.; Herranz, M.; Saldinger, P. F.; Corthésy-Theulaz, I.; Losonsky, G.; Nichols, R.; Simon, J.; Stolte, M.; Ackerman, S.; Monath, T. P.; Blum, A. L.; *Gastroenterology* **1999**, *116*, 804.
42. Kappaun, K.; Piovesan, A. R.; Carlini, C. R.; Ligabue-Braun, R.; *J. Adv. Res.* **2018**, *13*,

- 3.
43. Pearson, R. M.; Smith, J. A. B.; *Biochem. J.* **1943**, *37*, 148.
44. Lewis, D.; *J. Agric. Sci.* **1960**, *55*, 111.
45. Patra, A. K.; Aschenbach, J. R.; *J. Adv. Res.* **2018**, *13*, 39.
46. Amtul, Z.; Atta-ur-Rahman, B. S. P.; Siddiqui, R.; Choudhary, M.; *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 1323.
47. Turner, J. C.; Heath, F. K.; Magasanik, B.; *Nature* **1943**, *152*, 326.
48. Ambrose, J. F.; Kistiakowsky, G. B.; Kridl, A. G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 1898.
49. Harmon, K. M.; Niemann, C.; *J. Biol. Chem.* **1949**, *177*, 601.
50. Kobashi, K.; Hase, J.; Uehara, K.; *Biochim. Biophys. Acta* **1962**, *65*, 380.
51. Xiao, Z.-P.; Peng, Z.-Y.; Dong, J.-J.; Deng, R.-C.; Wang, X.-D.; Ouyang, H.; Yang, P.; He, J.; Wang, Y.-F.; Zhu, M.; Peng, X.-C.; Peng, W.-X.; Zhu, H.-L.; *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *68*, 212.
52. Shaw, W. H. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 2160.
53. de Fátima, Â.; Pereira, C. de P.; Olímpio, C. R. S. D. G.; de Freitas Oliveira, B. G.; Franco, L. L.; da Silva, P. H. C.; *J. Adv. Res.* **2018**, *13*, 113.
54. You, Z.; Liu, M.; Wang, C.; Sheng, G.; Zhao, X.; Qu, D.; Niu, F.; *RSC Adv.* **2016**, *6*, 16679.
55. Habala, L.; Devínsky, F.; Egger, A. E.; *J. Coord. Chem.* **2018**, *71*, 907.
56. Gioacchini, P.; Nastri, A.; Marzadori, C.; Giovannini, C.; Vittori Antisari, L.; Gessa, C.; *Biol. Fertil. Soils* **2002**, *36*, 129.
57. Cantarella, H.; Trivelin, P. C. O.; Contin, T. L. M.; Dias, F. L. F.; Rossetto, R.; Marcelino, R.; Coimbra, R. B.; Quaggio, J. A.; *Sci. Agric.* **2008**, *65*, 397.
58. Chien, S. H.; Prochnow, L. I.; Cantarella, H.; *Adv. Agron.* **2009**, *102*, 267.
59. Nascimento, C. A. C. do; Vitti, G. C.; Faria, L. de A.; Luz, P. H. C.; Mendes, F. L.; *Rev. Bras. Ciência do Solo* **2013**, *37*, 1057.
60. Upadhyay, L. S. B.; *Indian J. Biotechnol.* **2012**, *11*, 391.
61. Modolo, L. V.; de Souza, A. X.; Horta, L. P.; Araujo, D. P.; de Fátima, Â.; *J. Adv. Res.* **2015**, *6*, 35.
62. Uddin, G.; Ismail; Rauf, A.; Raza, M.; Khan, H.; Nasruddin; Khan, M.; Farooq, U.; Khan, A.; Arifullah; *Nat. Prod. Res.* **2016**, *30*, 1411.
63. Yang, W.; Feng, Q.; Peng, Z.; Wang, G.; *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *234*, 114273.
64. Watson, C. J.; Akhonzada, N. A.; Hamilton, J. T. G.; Matthews, D. I.; *Soil Use Manag.* **2008**, *24*, 246.
65. Scivittaro, W. B.; Gonçalves, D. R. N.; Vale, M. L. C. do; Ricordi, V. G.; *Ciência Rural* **2010**, *40*, 1283.
66. Zanin, L.; Tomasi, N.; Zamboni, A.; Varanini, Z.; Pinton, R.; *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 1007.
67. Zanin, L.; Venuti, S.; Tomasi, N.; Zamboni, A.; De Brito Francisco, R. M.; Varanini, Z.; Pinton, R.; *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 845.
68. Domínguez, M. J.; Sanmartín, C.; Font, M.; Palop, J. A.; San Francisco, S.; Urrutia, O.; Houdusse, F.; García-Mina, J. M.; *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3721.
69. Andrews, R. K.; Dexter, A.; Blakeley, R. L.; Zerner, B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7124.
70. Tsuchiya, M.; Imamura, L.; Park, J.; Kobashi, K.; *Biol. Pharm. Bull.* **1995**, *18*, 1053.
71. Kuehler, T. C.; Fryklund, J.; Bergman, N.; Weillitz, J.; Lee, A.; Larsson, H.; *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4906.
72. Mojzych, M.; Tarasiuk, P.; Kotwica-Mojzych, K.; Rafiq, M.; Seo, S.-Y.; Nicewicz, M.; Fornal, E.; *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2017**, *32*, 99.
73. Kieboom, A. P. G.; Perrin, D. D. *Purification of Laboratory Chemicals*; 3rd ed.; John Wiley & Sons, Ltd, 1988; Vol. 107.
74. Weatherburn, M. W.; *Anal. Chem.* **1967**, *39*, 971.
75. Paiva, D. M. de; Cantarutti, R. B.; Guimarães, G. G. F.; Silva, I. R. da; *Rev. Bras. Ciência do Solo* **2012**, *36*, 1221.
76. Otake, S.; Nakahashi, K.; Morikawa, T.; Takebe, S.; Kobashi, K.; *Chem. Pharm. Bull.*

- 1992**, 40, 2764.
77. Ullah, A.; Iftikhar, F.; Arfan, M.; Batool Kazmi, S. T.; Anjum, M. N.; Haq, I.; Ayaz, M.; Farooq, S.; Rashid, U.; *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 145, 140.
  78. Ikram, M.; Rehman, S.; Akhtar, M. N.; Subhan, F.; Aslam, S.; *Pharm. Chem. J.* **2020**, 54, 469.
  79. De Oliveira, S. M.; Da Silva, J. B. P.; Hernandez, M. Z.; De Lima, M. D. C. A.; Galdino, S. L.; Pitta, I. D. R.; *Quim. Nova* **2008**, 31, 614–622.
  80. Johnson, T. B.; Nicolet, B. H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1911**, 33, 1973.
  81. Poyraz, S.; Belveren, S.; Ülger, M.; Şahin, E.; Döndaş, H. A.; *Monatshefte für Chemie - Chem. Mon.* **2017**, 148, 2173.
  82. LeTiran, A.; Stables, J. P.; Kohn, H.; *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 2693.
  83. Raj, R.; Mehra, V.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Wicht, K. J.; Egan, T. J.; Hopper, M.; Wrischnik, L. A.; Land, K. M.; Kumar, V.; *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 84, 425.
  84. Ware, E.; *Chem. Rev.* **1950**, 46, 403.
  85. de Carvalho, P. G. C.; Ribeiro, J. M.; Garbin, R. P. B.; Nakazato, G.; Yamada Ogatta, S. F.; de Fátima, Â.; de Lima Ferreira Bispo, M.; Macedo, F.; *Lett. Drug Des. Discov.* **2019**, 17, 94.
  86. Wang, Z.; Sheikh, S.; Zhang, Y.; *Molecules* **2006**, 11, 739.
  87. Reyes, S.; Burgess, K.; *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 2507.
  88. Congdon, W. I.; Edward, J. T.; *Can. J. Chem.* **1972**, 50, 3767.
  89. Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R. *Espectrometria de massas*; 2010.
  90. Soares, J. R.; Cantarella, H.; Menegale, M. L. de C.; *Soil Biol. Biochem.* **2012**, 52, 82.
  91. Jonkers, D.; Stobberingh, E.; Stockbrügger, R.; *J. Antimicrob. Chemother.* **1996**, 37, 145.
  92. Menteşe, E.; Bektaş, H.; Sokmen, B. B.; Emirik, M.; Çakır, D.; Kahveci, B.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27, 3014.
  93. Saeedian Moghadam, E.; Al-Sadi, A. M.; Talebi, M.; Amanlou, M.; Amini, M.; Abdel-Jalil, R.; *DARU J. Pharm. Sci.* **2022**.
  94. Taha, M.; Ismail, N. H.; Imran, S.; Wadood, A.; Rahim, F.; Khan, K. M.; Riaz, M.; *Bioorg. Chem.* **2016**, 66, 80.
  95. Saeed, A.; Zaib, S.; Pervez, A.; Mumtaz, A.; Shahid, M.; Iqbal, J.; *Med. Chem. Res.* **2013**, 22, 3653.
  96. Khan, K. M.; Naz, F.; Taha, M.; Khan, A.; Perveen, S.; Choudhary, M. I.; Voelter, W.; *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 74, 314.
  97. Brito, T. O.; Souza, A. X.; Mota, Y. C. C.; Morais, V. S. S.; de Souza, L. T.; de Fátima, Â.; Macedo, F.; Modolo, L. V.; *RSC Adv.* **2015**, 5, 44507.
  98. Zahra, U.; Zaib, S.; Saeed, A.; Rehman, M. ur; Shabir, G.; Alsaab, H. O.; Khan, I.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, 198, 157.
  99. Saeed, A.; Rafique, H.; Hameed, A.; Rasheed, S.; *Pharm. Chem. J.* **2008**, 42, 191.
  100. Saeed, S.; Rashid, N.; Jones, P. G.; Ali, M.; Hussain, R.; *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 1323.
  101. Chikhale, R.; Thorat, S.; Choudhary, R. K.; Gadewal, N.; Khedekar, P.; *Bioorg. Chem.* **2018**, 77, 84.
  102. Odame, F.; Woodcock, G.; Hosten, E. C.; Lobb, K.; Tshentu, Z. R.; *J. Organomet. Chem.* **2020**, 922, 121359.
  103. Gergely, M.; Kollár, L.; *Tetrahedron* **2019**, 75, 2027.
  104. Čaleta, I.; Cinčić, D.; Karminski-Zamola, G.; Kaitner, B.; *J. Chem. Crystallogr.* **2008**, 38, 775.
  105. Thakkar, S. S.; Thakor, P.; Ray, A.; Doshi, H.; Thakkar, V. R.; *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, 25, 5396.
  106. Li, H.; Li, J.; Chen, H.; Zhang, Y.; Huang, D.; *J. Chem. Crystallogr.* **2011**, 41, 1844.
  107. Bhuiyan, M. M. H.; Kamal, A. S. M. M.; *Chem J* **2012**, 2, 21.
  108. Bandyopadhyay, P.; Sathe, M.; Tikar, S. N.; Yadav, R.; Sharma, P.; Kumar, A.; Kaushik, M. P.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 2934.

109. Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Affolter, C.; Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Affolter, C. *Structure determination of organic compounds*; Springer, 2009; Vol. 13.
110. Chauhan, K.; Singh, P.; Kumari, B.; Singhal, R. K.; *Anal. Methods* **2017**, *9*, 1779.
111. Jetti, V.; Chidurala, P.; Pagadala, R.; Meshram, J. S.; Ramakrishna, C.; *J. Heterocycl. Chem.* **2014**, *51*, E183.
112. Danaee, I.; Gholami, M.; RashvandAvei, M.; Maddahy, M. H.; *J. Ind. Eng. Chem.* **2015**, *26*, 81.
113. Rani, B. R.; Rahman, M. F.; Bhalerao, U. T.; *Synth. Commun.* **1991**, *21*, 319.
114. Saeed, A.; Tehseen, Y.; Rafique, H.; Furtmann, N.; Bajorath, J.; Flörke, U.; Iqbal, J.; *Med. Chem. Commun.* **2014**, *5*, 1371.
115. Khan, M. R.; Zaib, S.; Rauf, M. K.; Ebihara, M.; Badshah, A.; Zahid, M.; Nadeem, M. A.; Iqbal, J.; *J. Mol. Struct.* **2018**, *1164*, 354.
116. Rauf, M. K.; Zaib, S.; Talib, A.; Ebihara, M.; Badshah, A.; Bolte, M.; Iqbal, J.; *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 4452.



## Anexos

### Anexo 1 – Espectros

Figura 45. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do **110ac**.

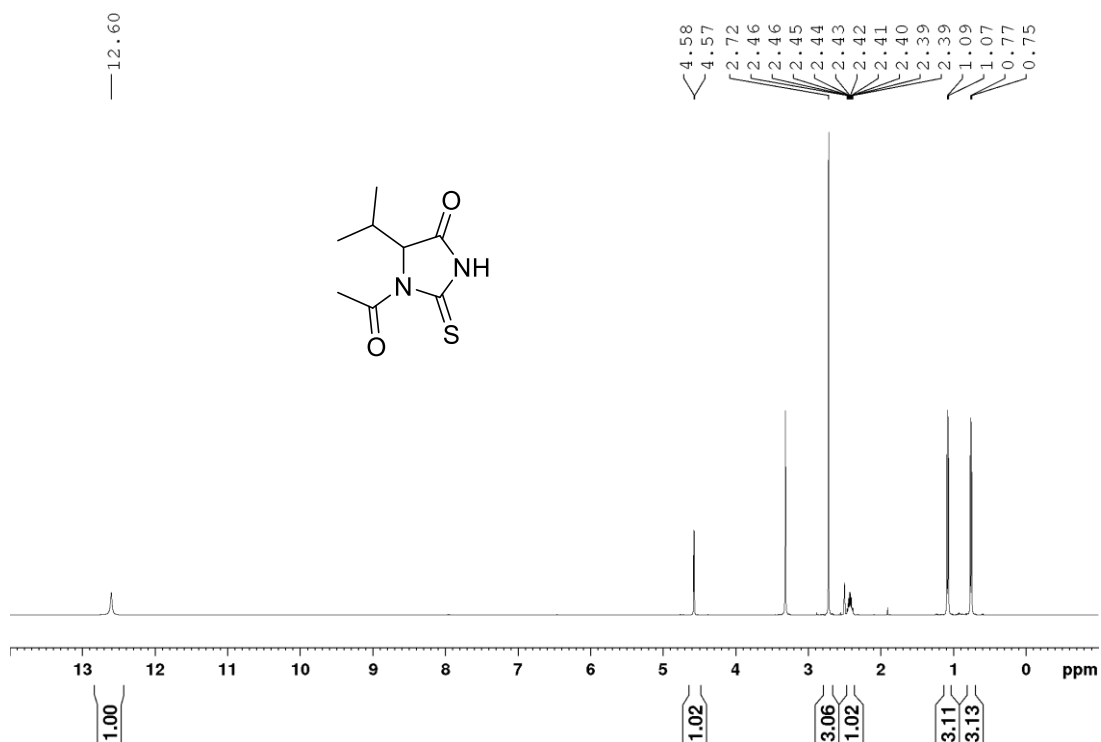


Figura 46. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (abaixo; 100 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ) e DEPT 135 (acima) do **110ac**.

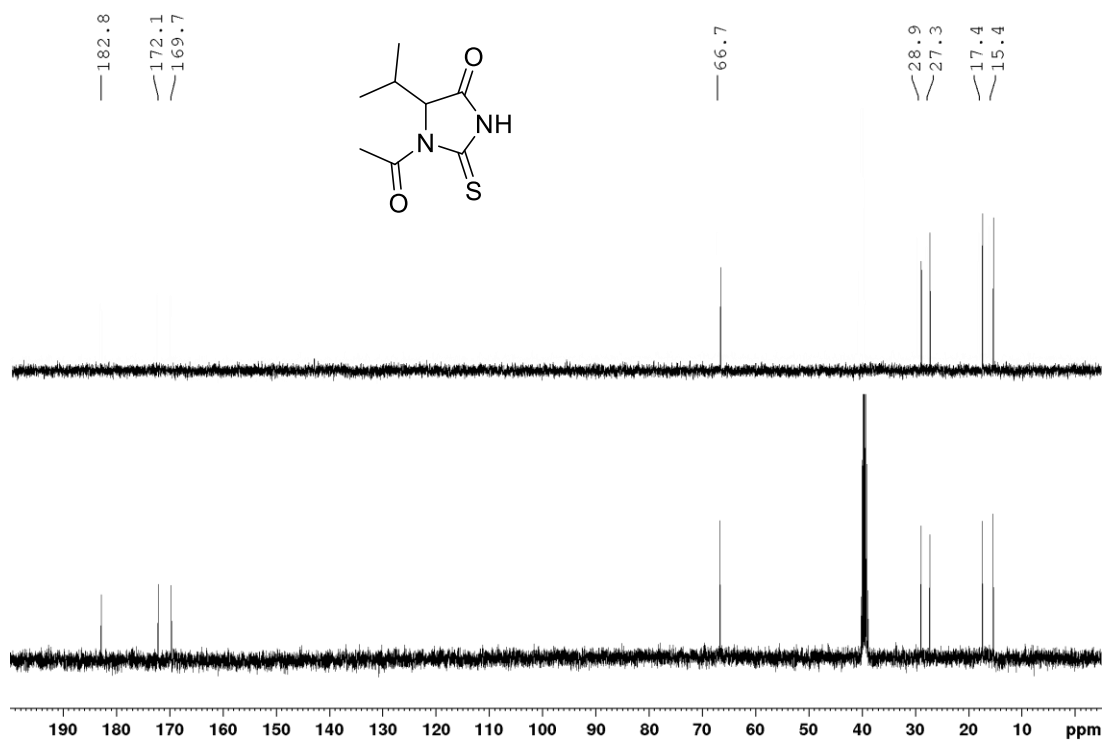


Figura 47. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do **106ac**.

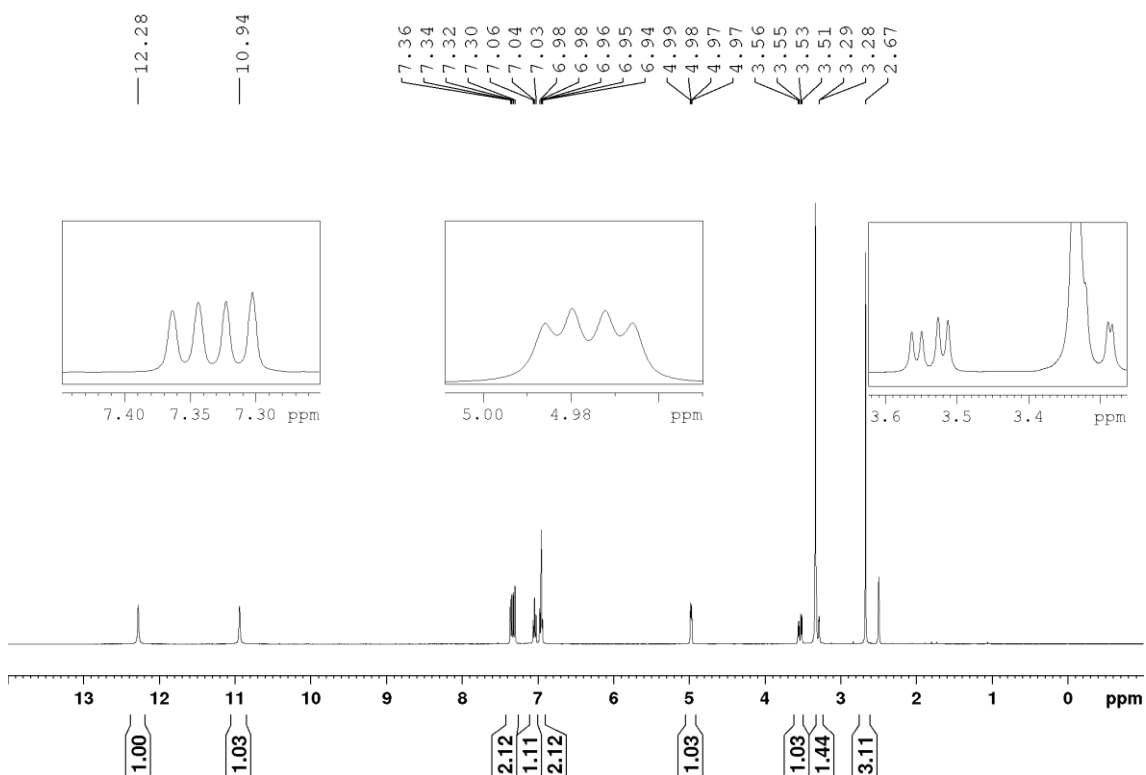


Figura 48. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (abaixo; 100 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ) e subspectro DEPT 135 (acima) do **106ac**.

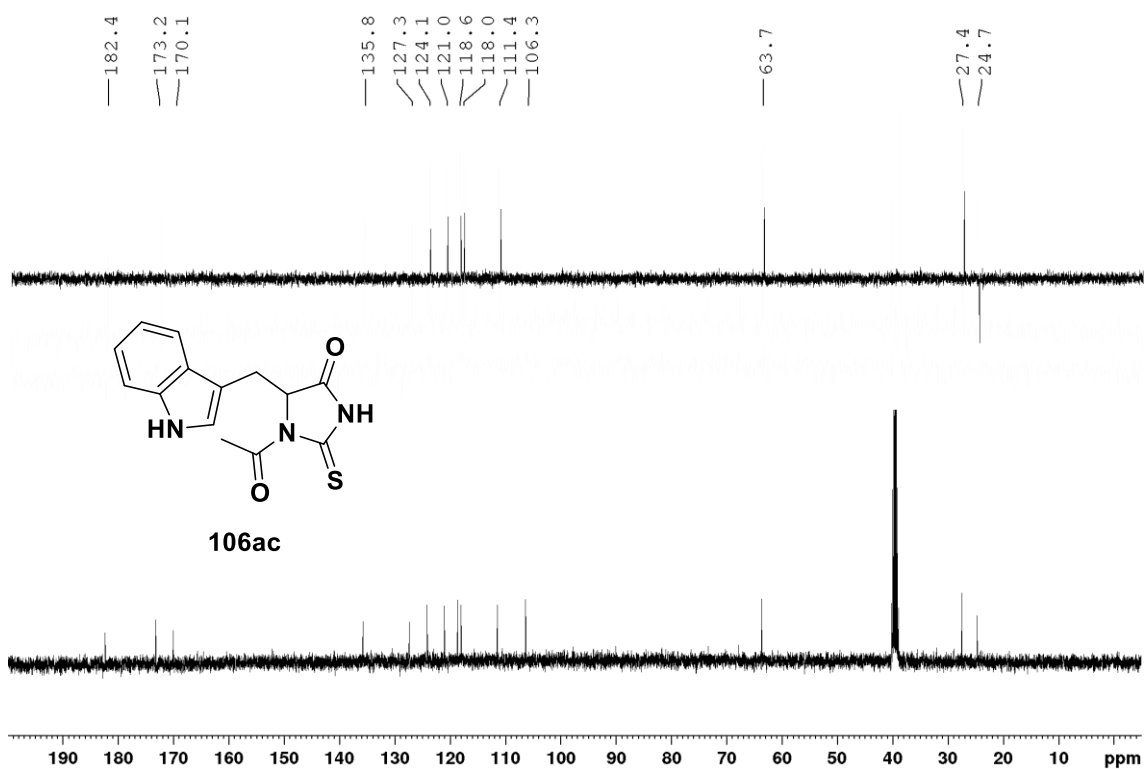


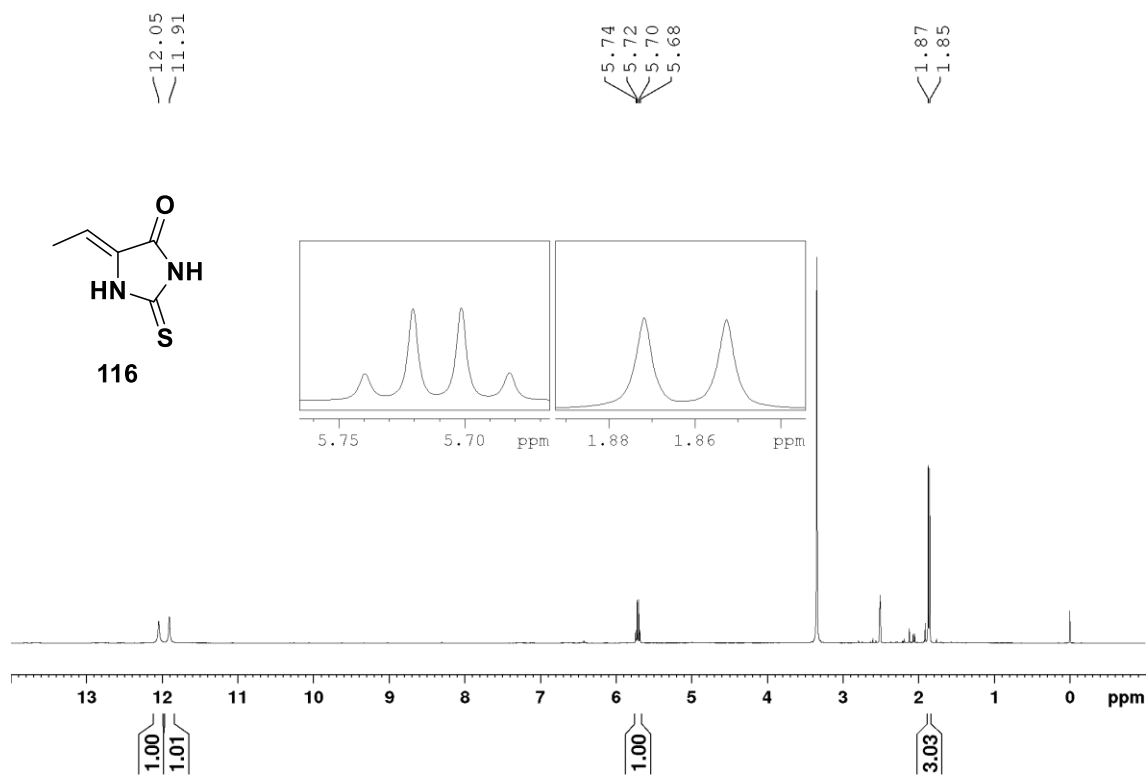
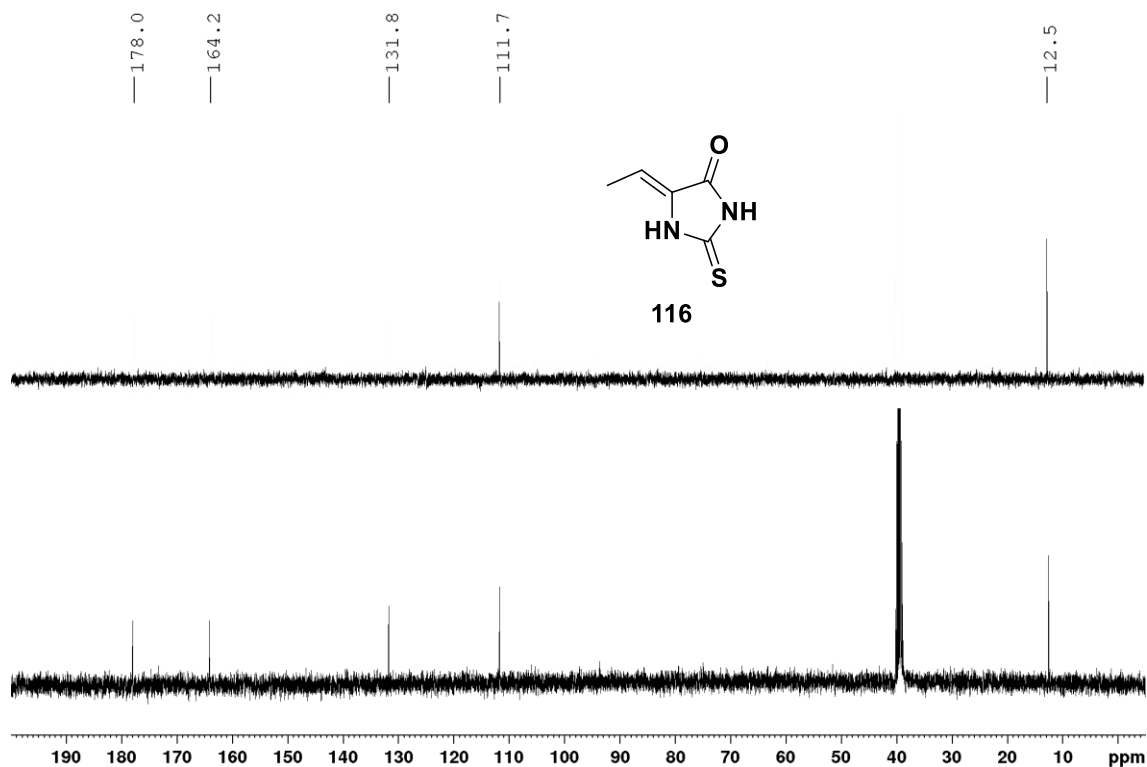
Figura 49. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do **116**.Figura 50. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (abaixo; 100 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ) e DEPT 135 (acima) do **116**.

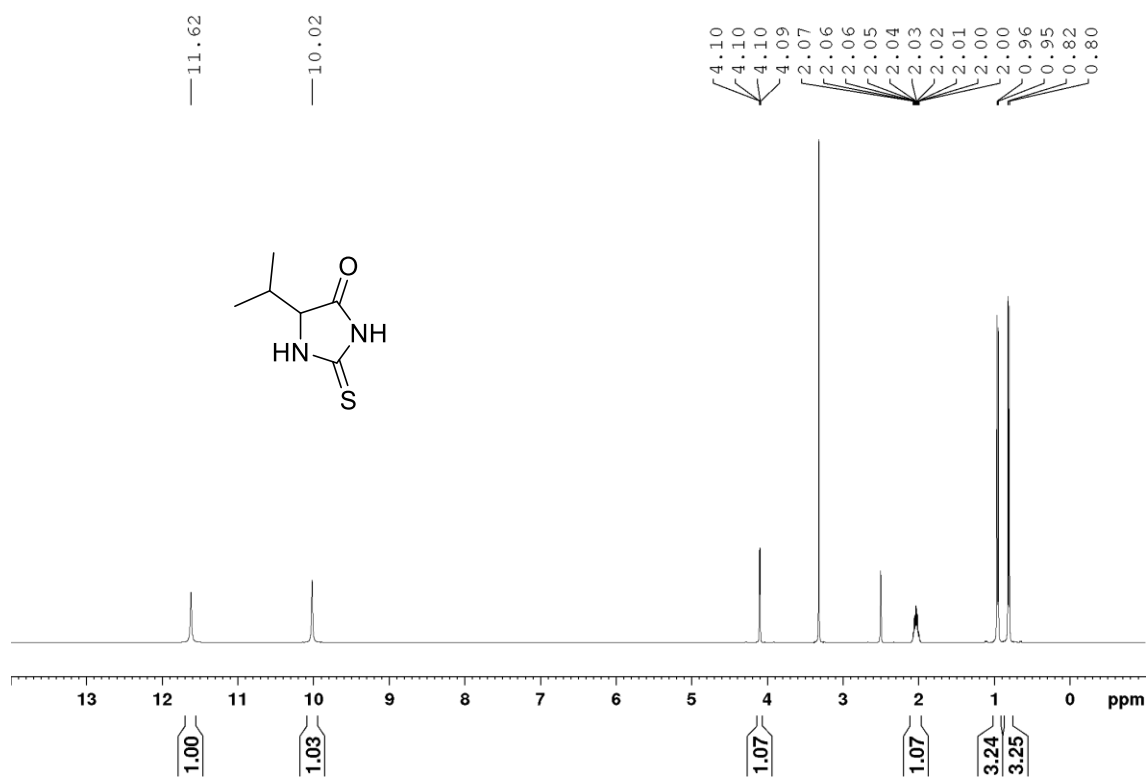
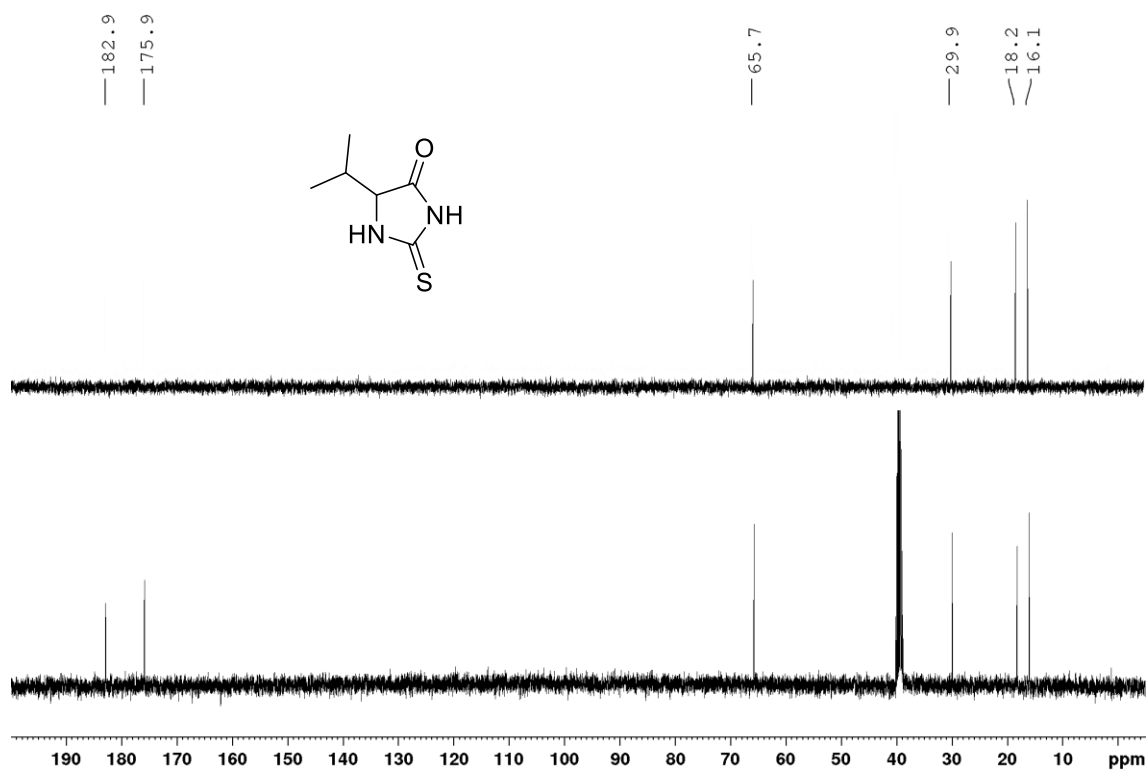
Figura 51. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do **110**.Figura 52. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (abaixo; 100 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ) e DEPT 135 (acima) do **110**.

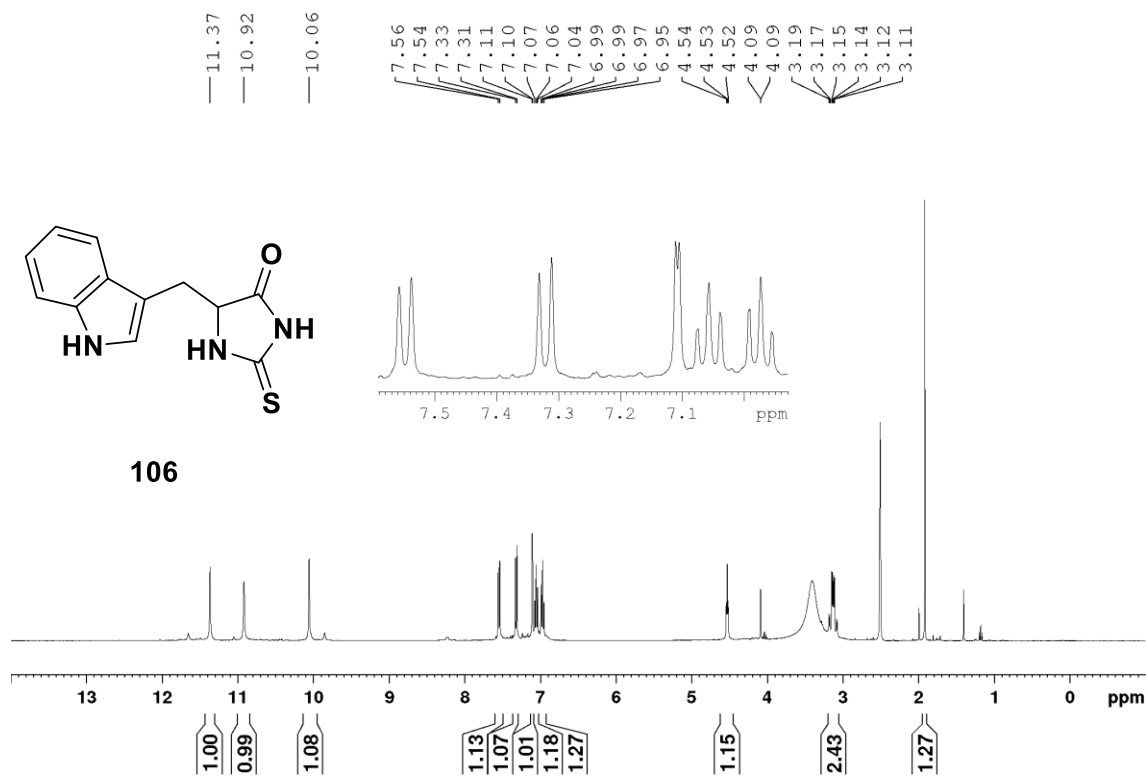
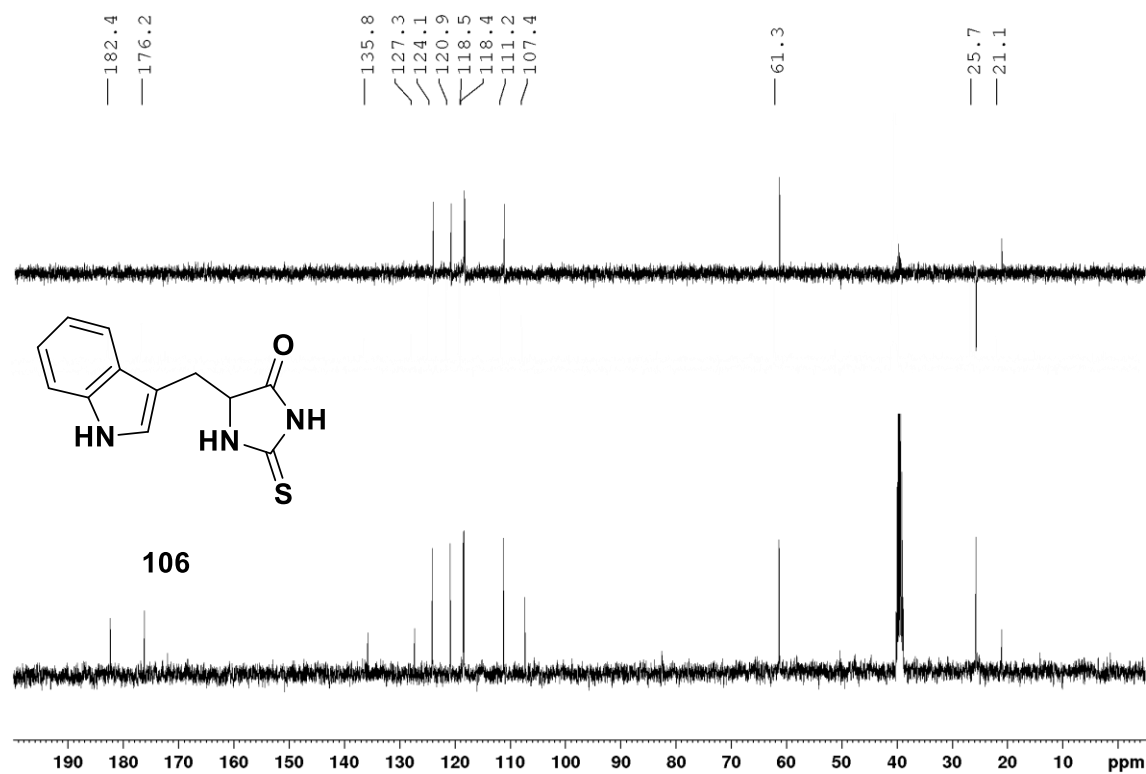
Figura 53. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do **106**.Figura 54. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (abaixo; 100 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ) e DEPT 135 (acima) do **106**.

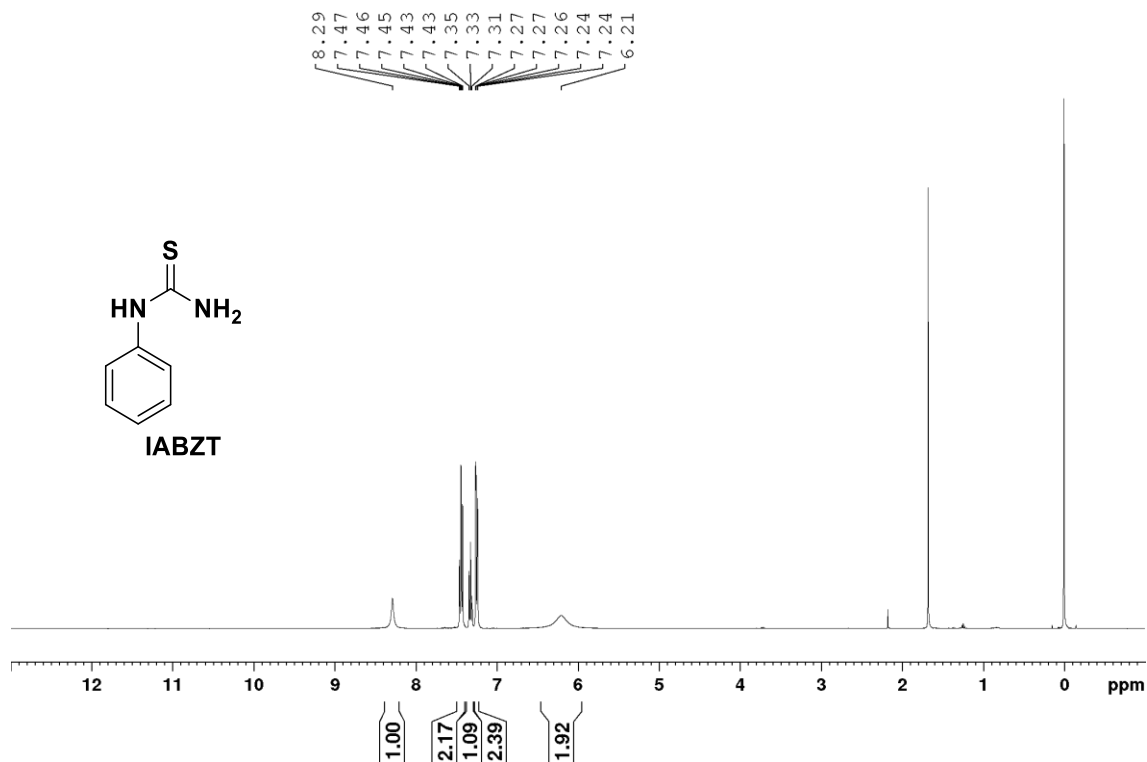
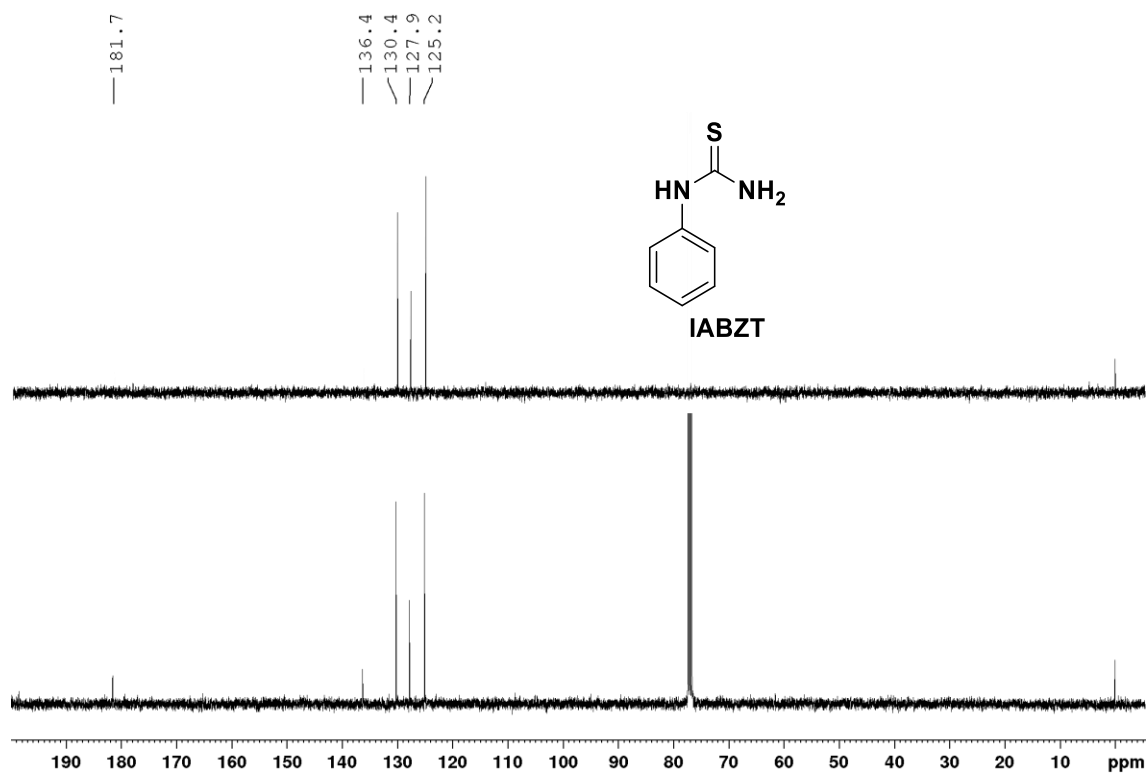
Figura 55. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do **IABZT**.Figura 56. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (abaixo; 100 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ) e DEPT 135 (acima) do **IABZT**.

Figura 57. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do subproduto.

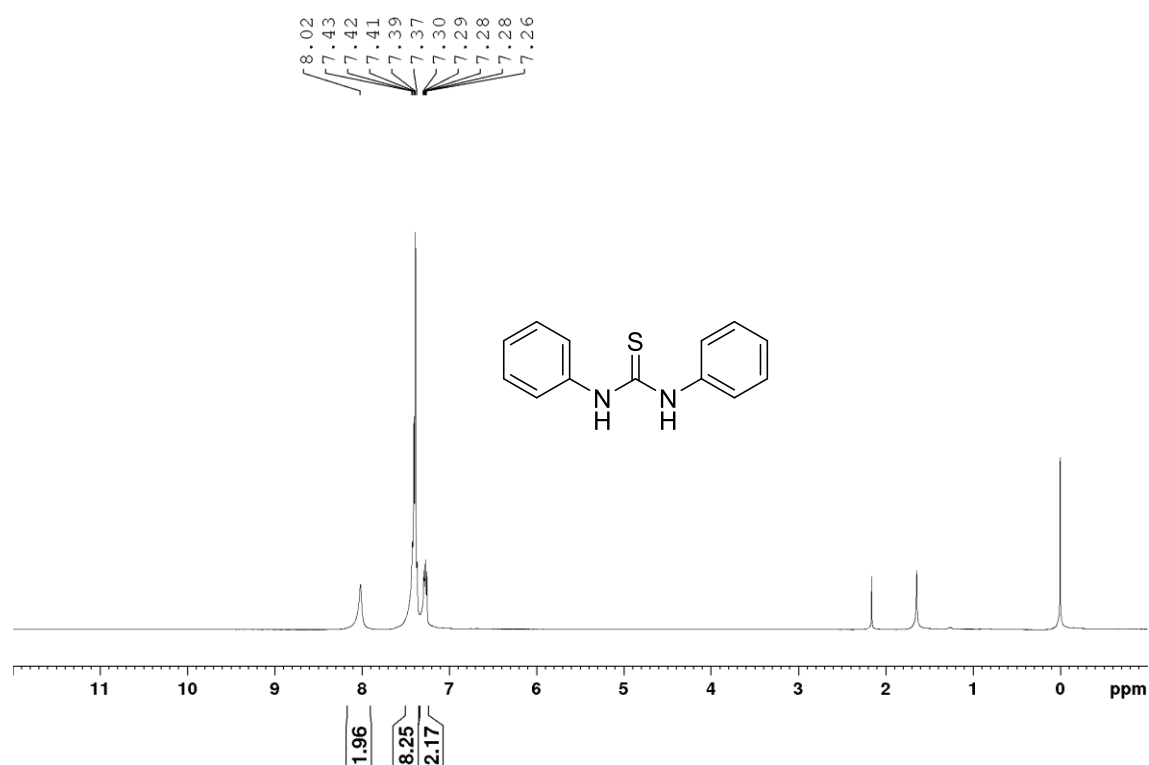


Figura 58. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (abaixo; 100 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ) e DEPT 135 (acima) do subproduto.

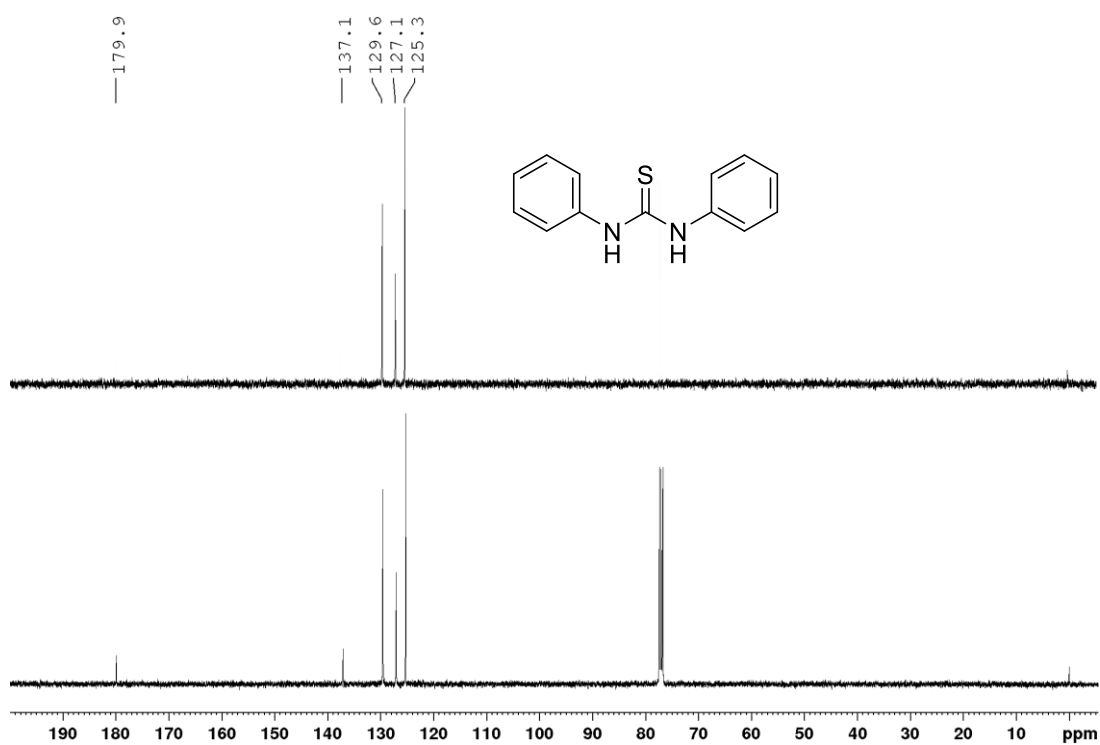


Figura 59. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do bruto de reação entrada 4.

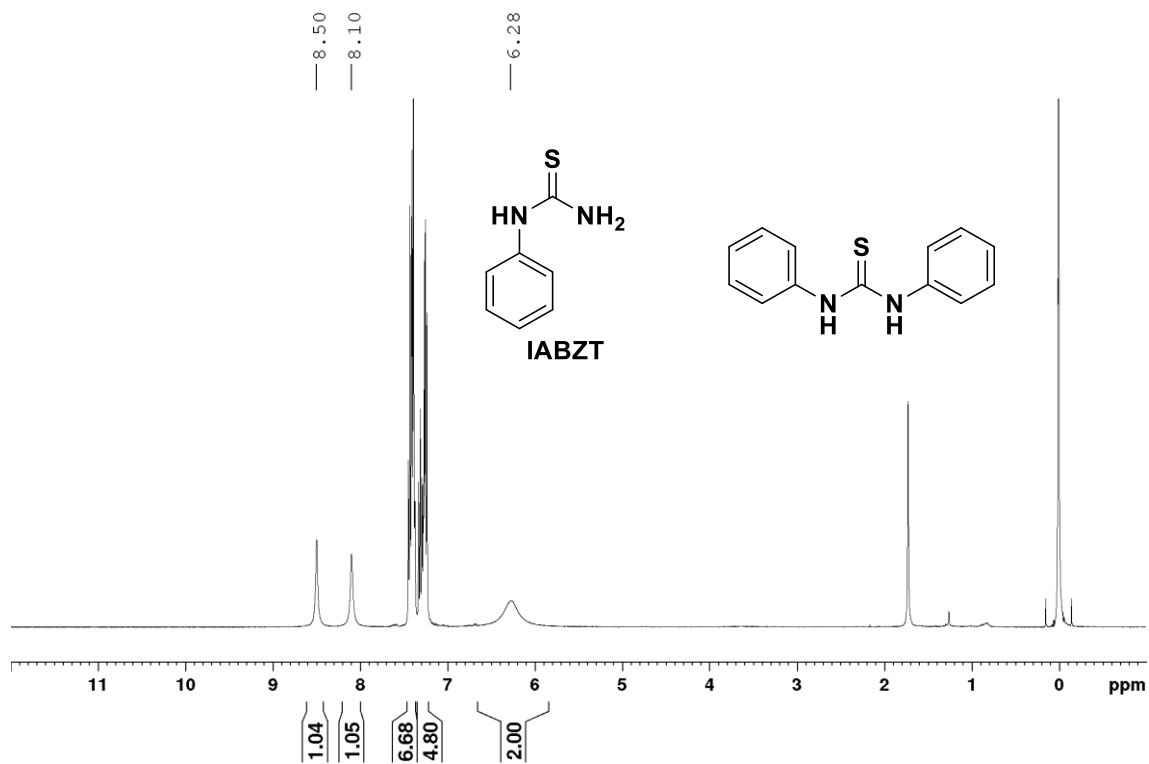


Figura 60. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do bruto de reação entrada 5.

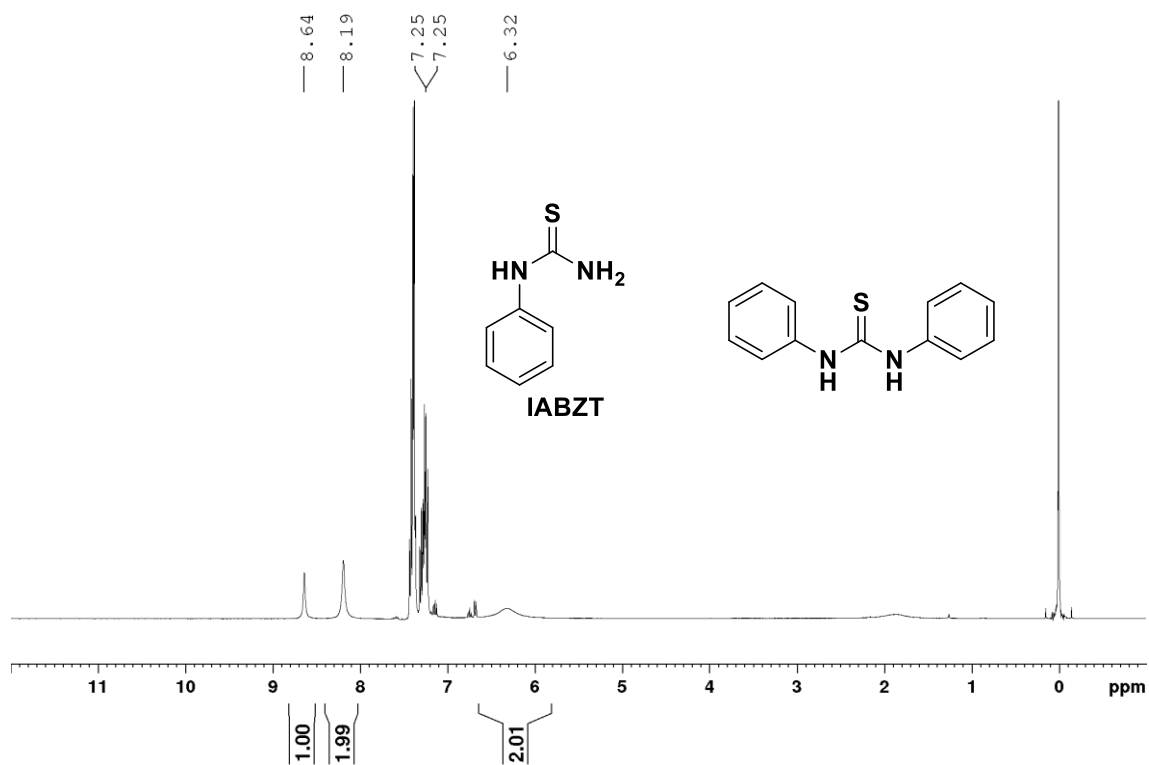




Figura 61. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do híbrido benzoiltiureia-benzotiazol (**HBT-2-OMe\***)

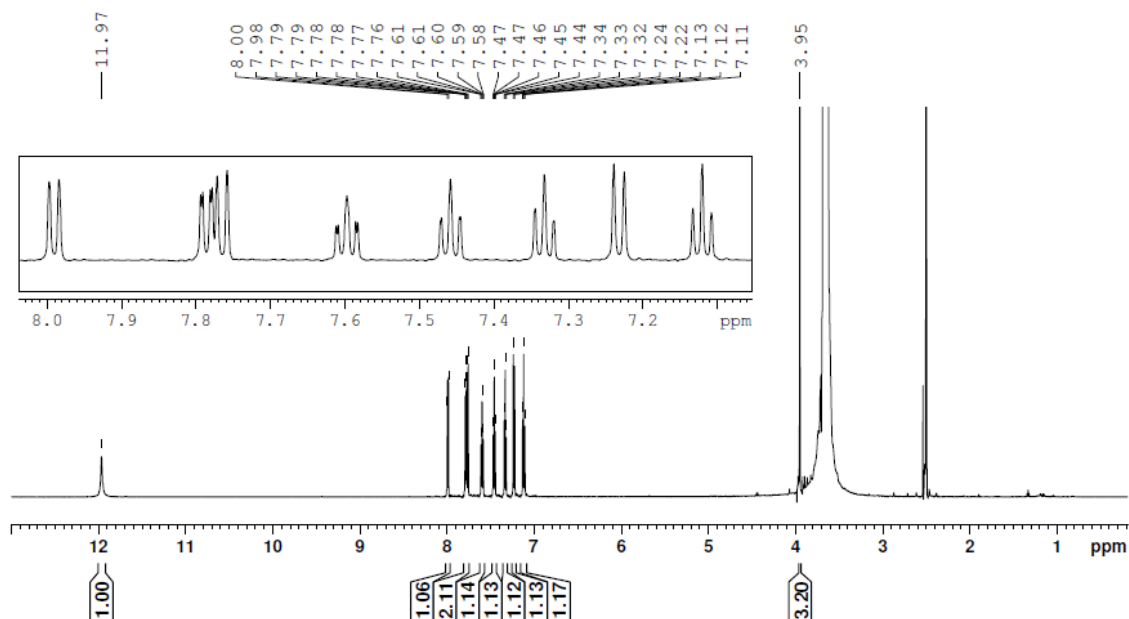


Figura 62. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (abaixo; 100 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ) do híbrido benzoiltiureia-benzotiazol (**HBT-2-OMe\***)

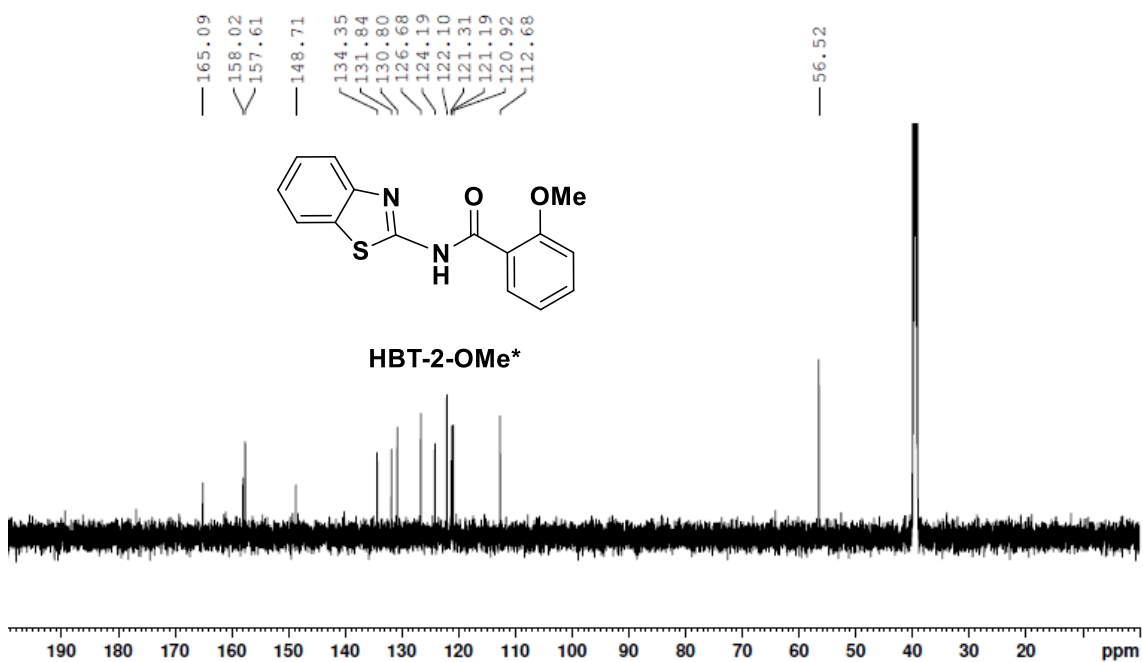


Figura 63. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do híbrido benzoiltiureia-benzotiazol (**HBT-3-OMe**)

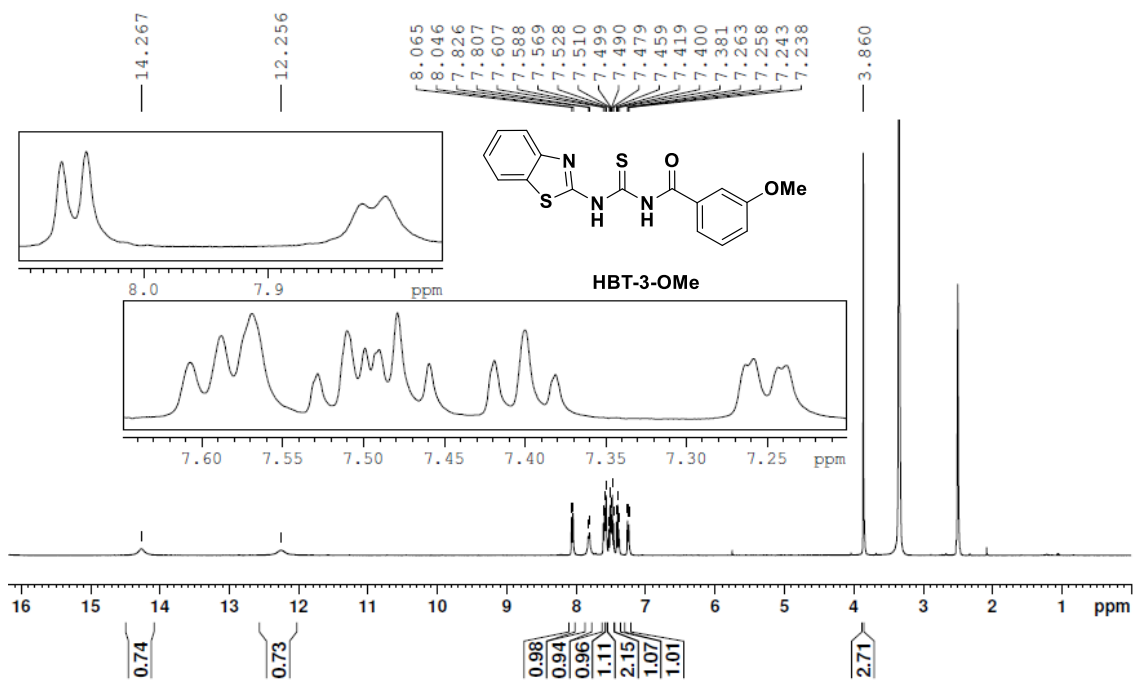


Figura 64. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do híbrido benzoiltiureia-benzotiazol (**HBT-4-OMe**)

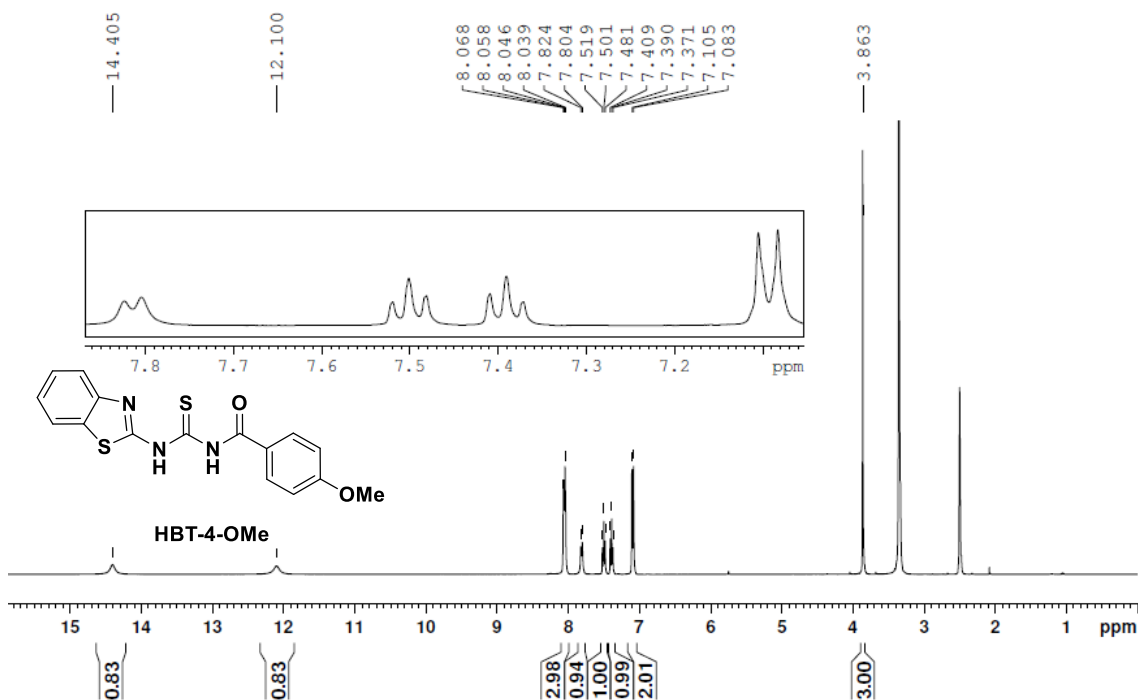


Figura 65. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do híbrido benzoiltiureia-benzotiazol (**HBT-2-Cl\***)

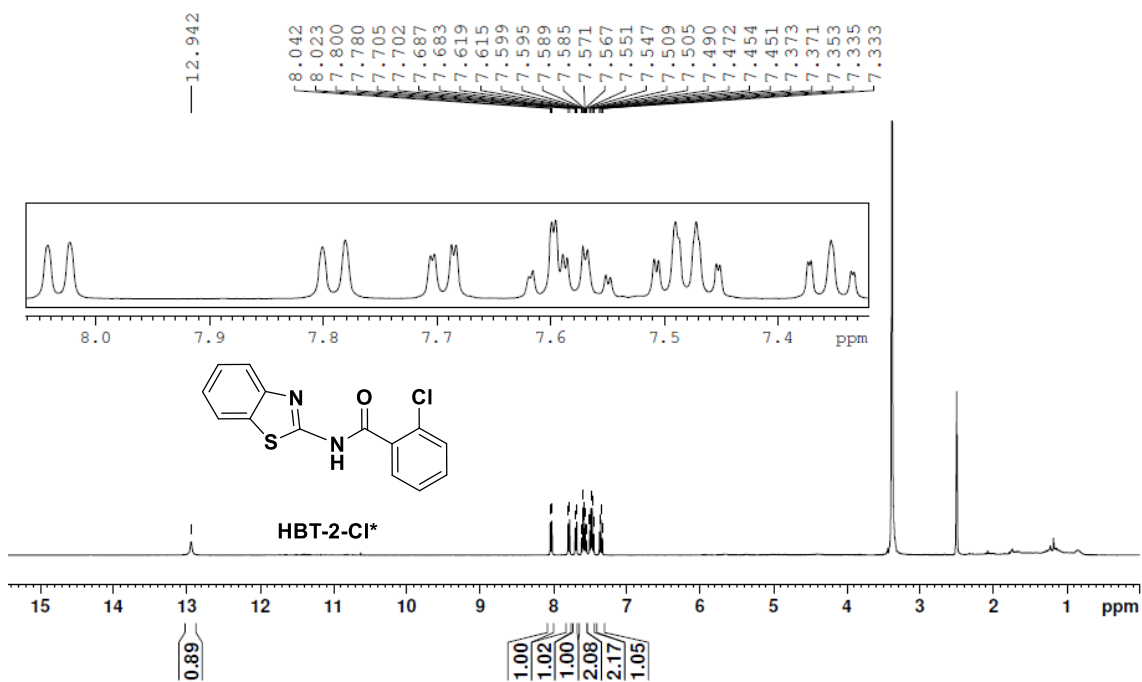


Figura 66. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) o híbrido benzoiltiureia-benzotiazol (**HBT-3-Cl**)

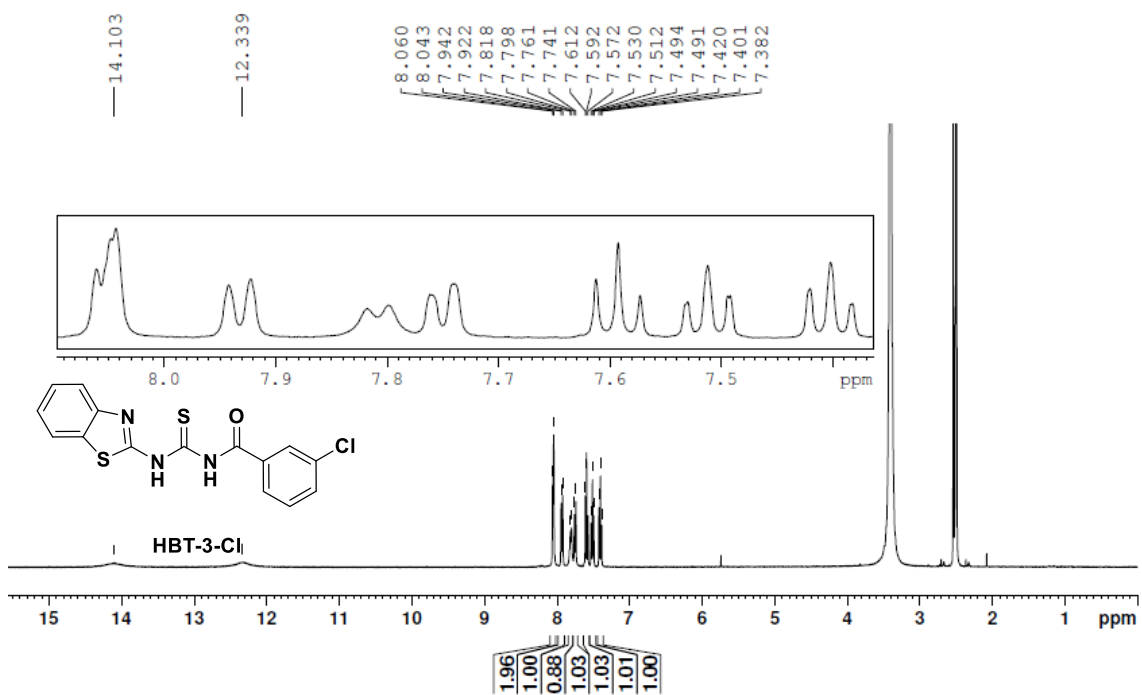


Figura 67. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) o híbrido benzoiltioureia-benzotiazol (**HBT-4-Cl**)

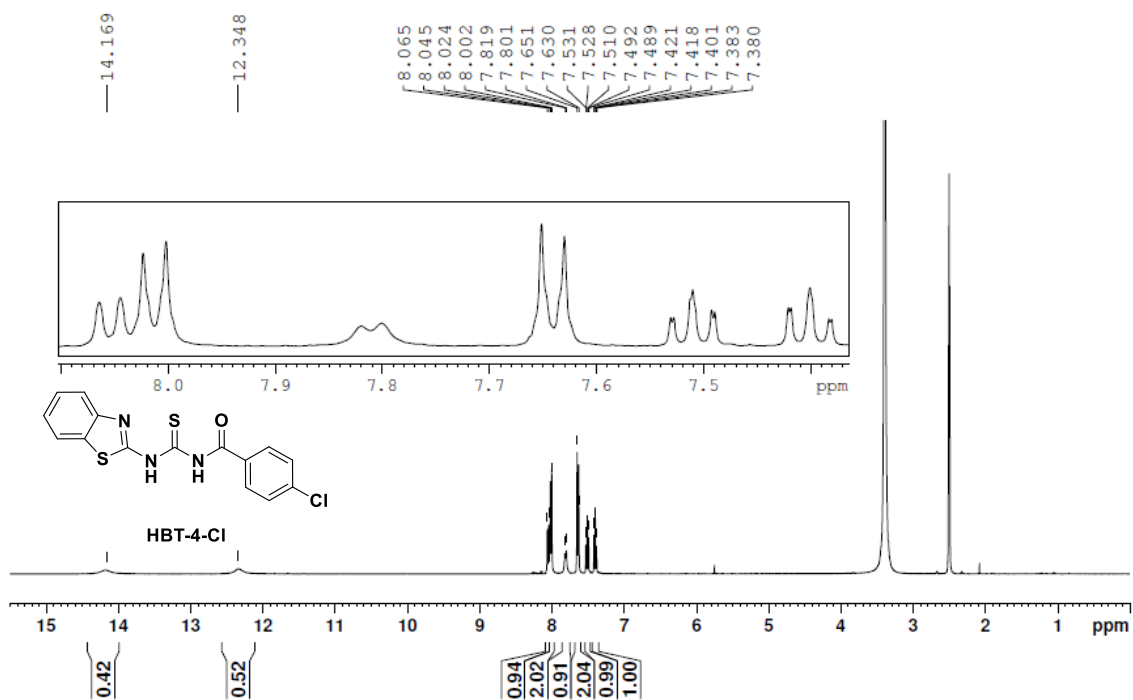


Figura 68. Espectro na região do IV (em KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) das acetil-tioantóinas derivadas de D,L,L/D-valina

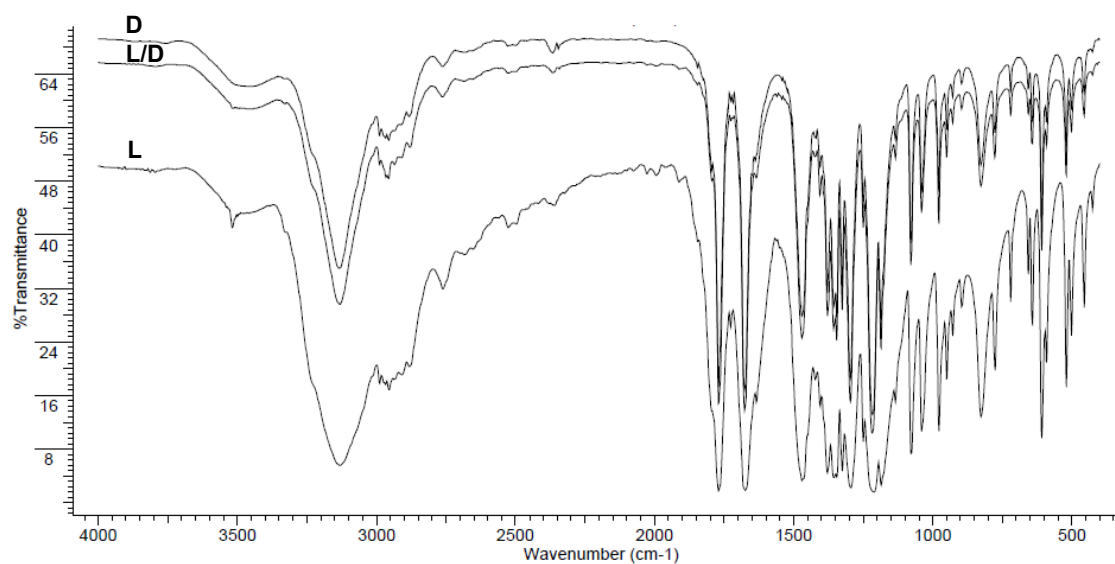


Figura 69. Espectro na região do IV (em KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) das acetil-tioindolinas derivadas de D,L,L/D-triptofano.

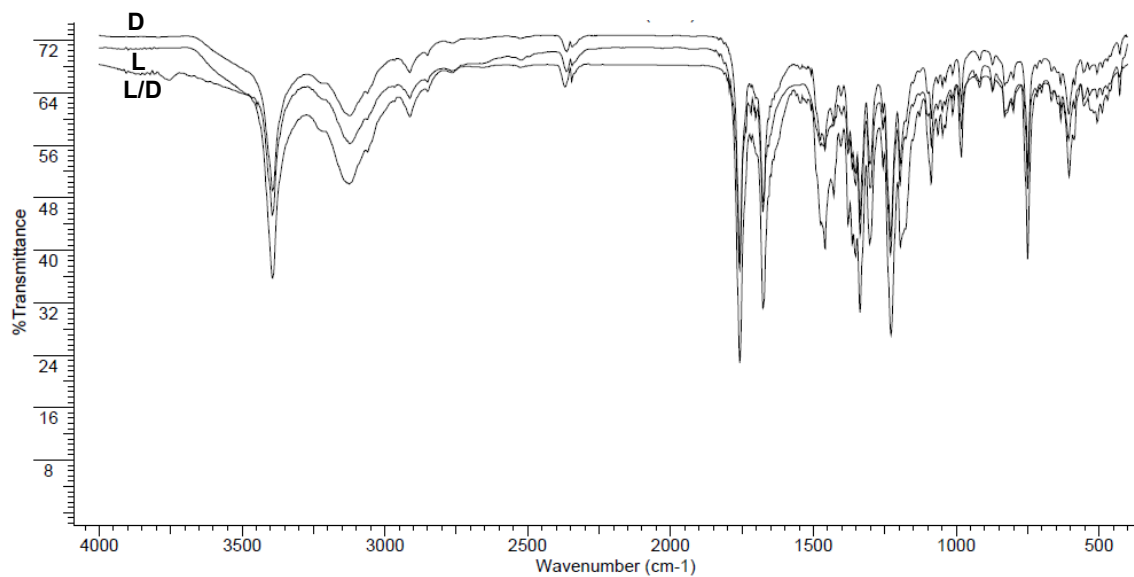


Figura 70. Espectro na região do IV (em KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) da tioindolína derivada de treonina.

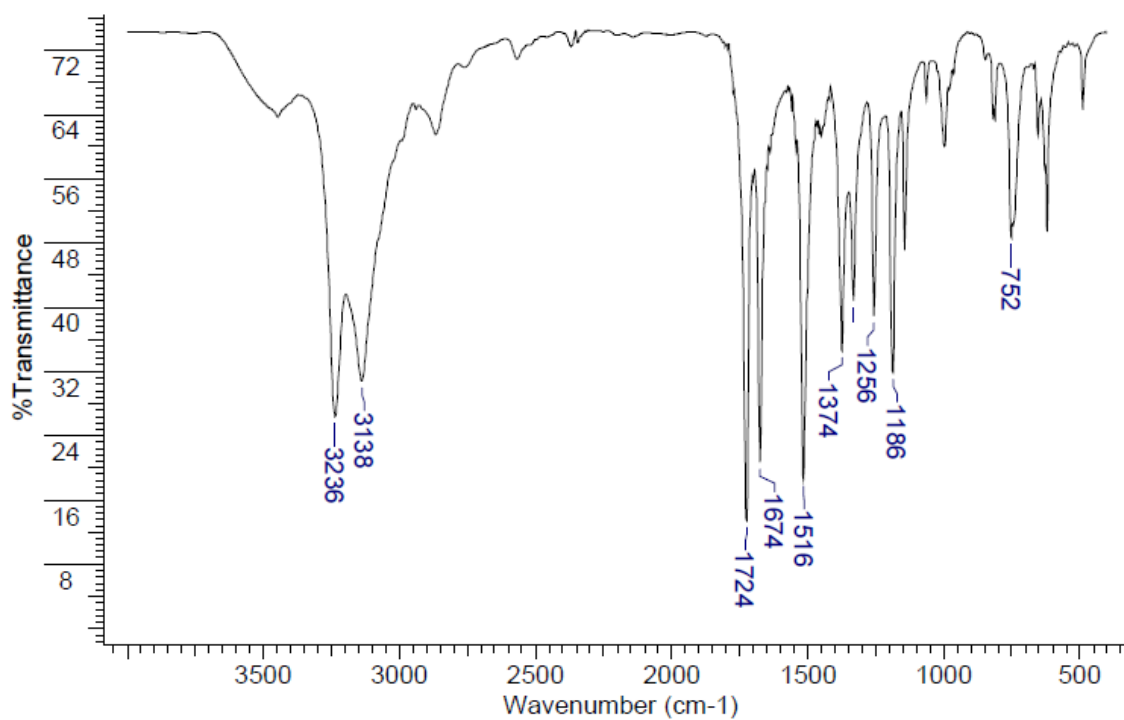


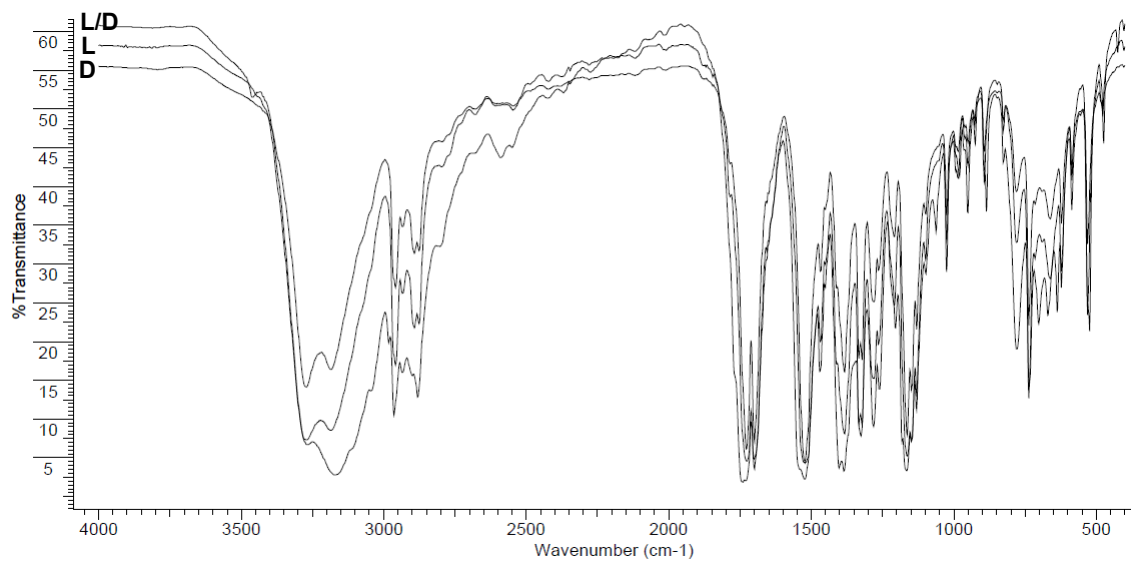
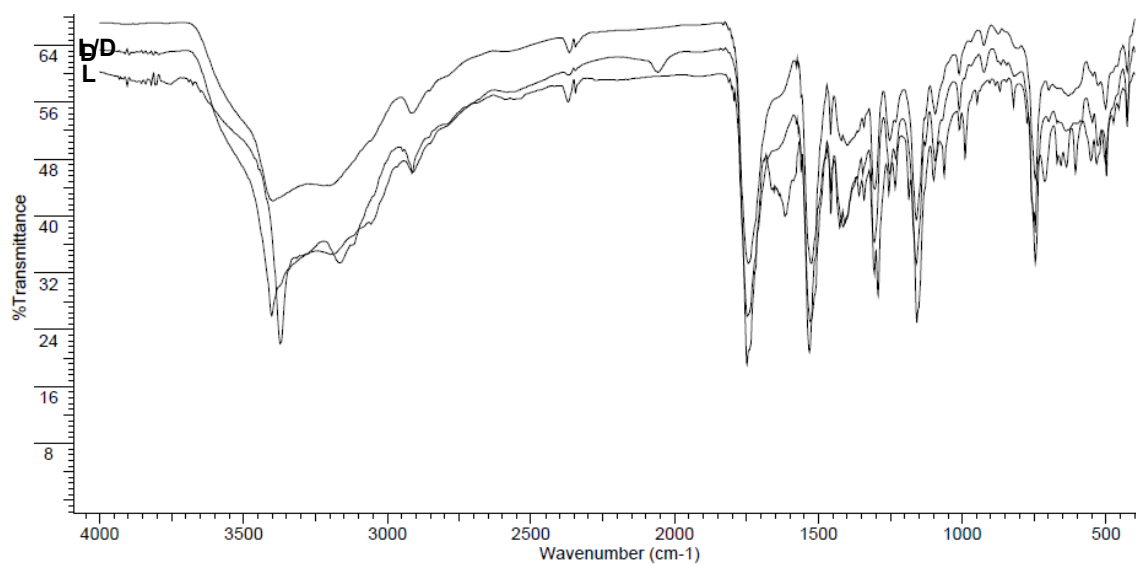
Figura 71. Espectro na região do IV (em KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) das tioidantoínas derivadas de D,L,L/D-valinaFigura 72. Espectro na região do IV (em KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) das tioidantoínas derivadas de D,L,L/D-triptofano.

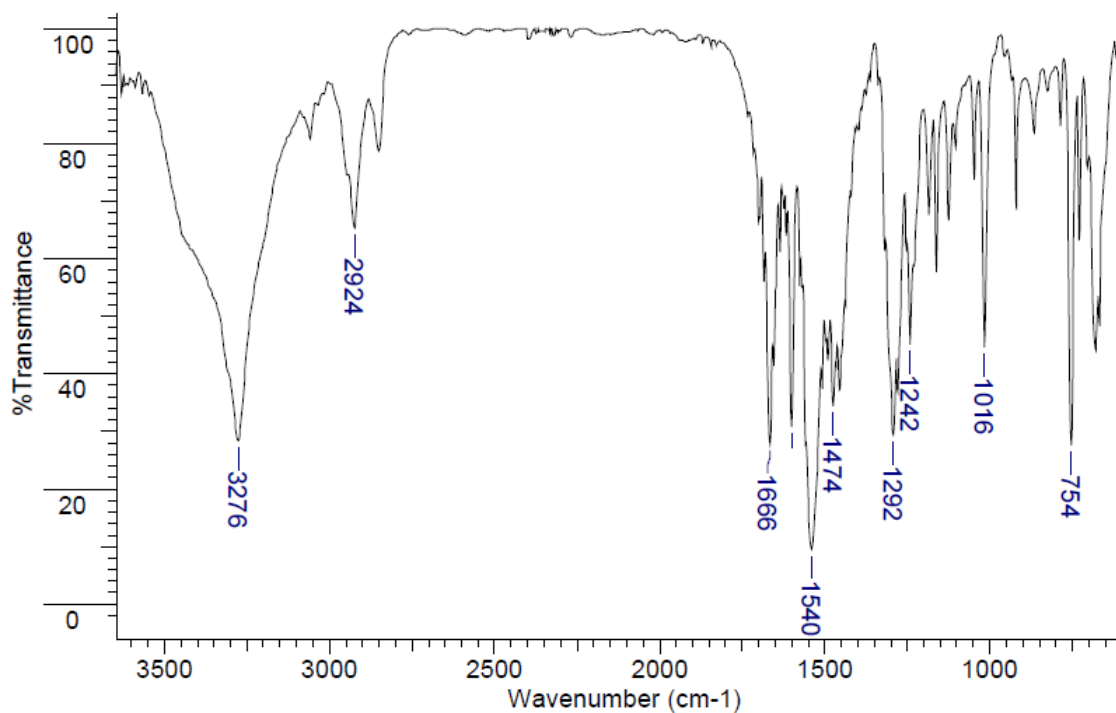
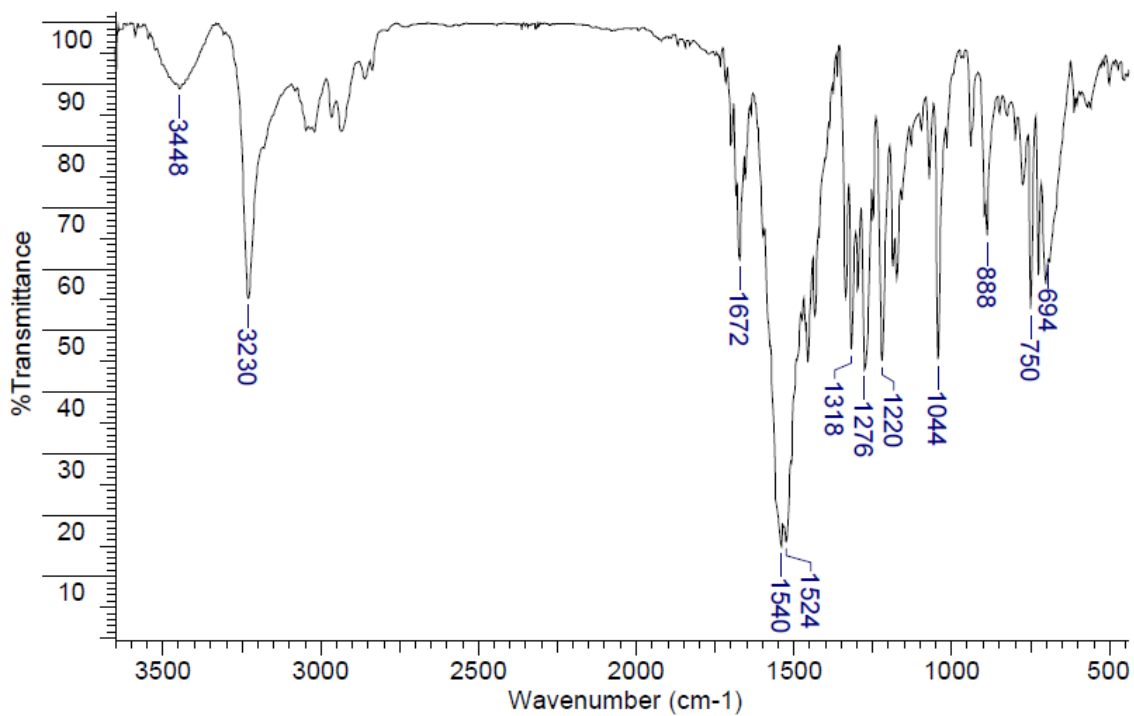
Figura 73. Espectro na região do IV (em KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol (**HBT-2-OMe\***)Figura 74. Espectro na região do IV (em KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol (**HBT-3-OMe**)

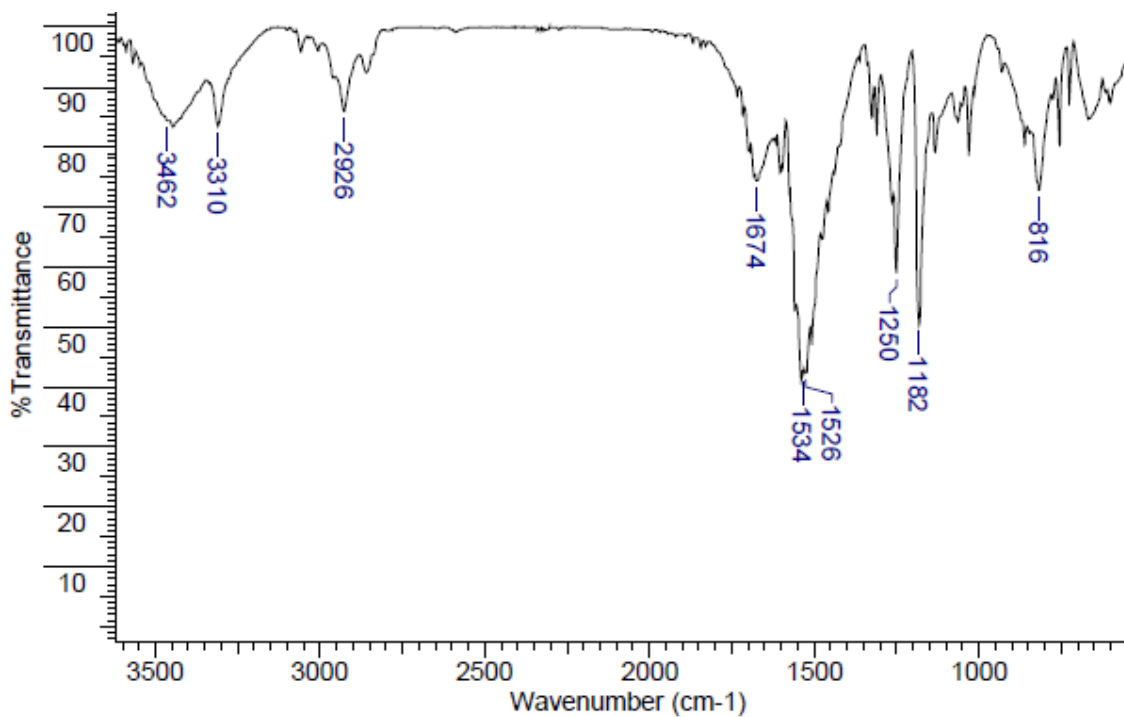
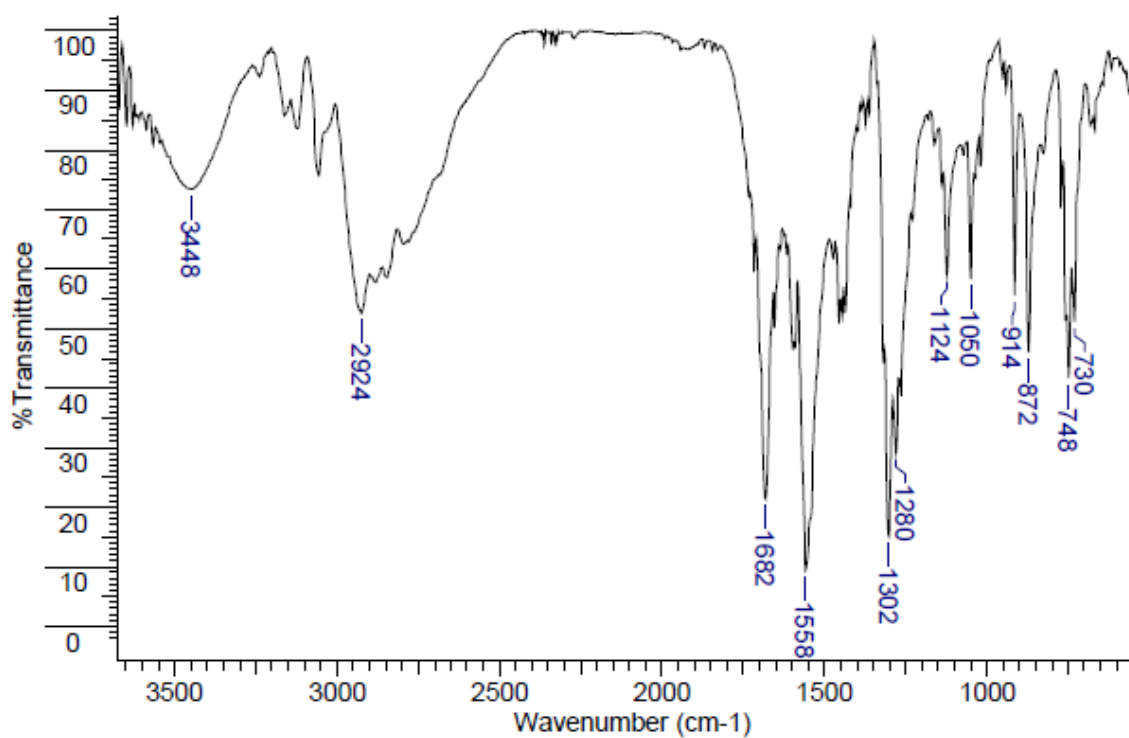
Figura 75. Espectro na região do IV (em KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol (**HBT-4-OMe**)Figura 76. Espectro na região do IV (em KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol (**HBT-2-Cl\***)



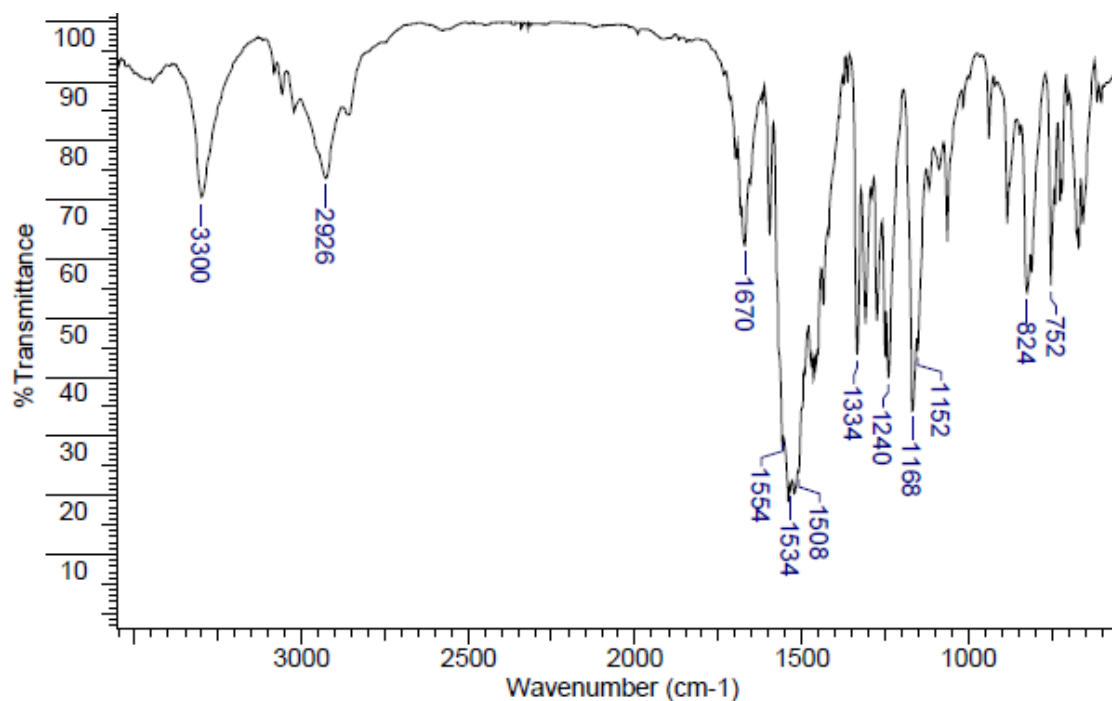
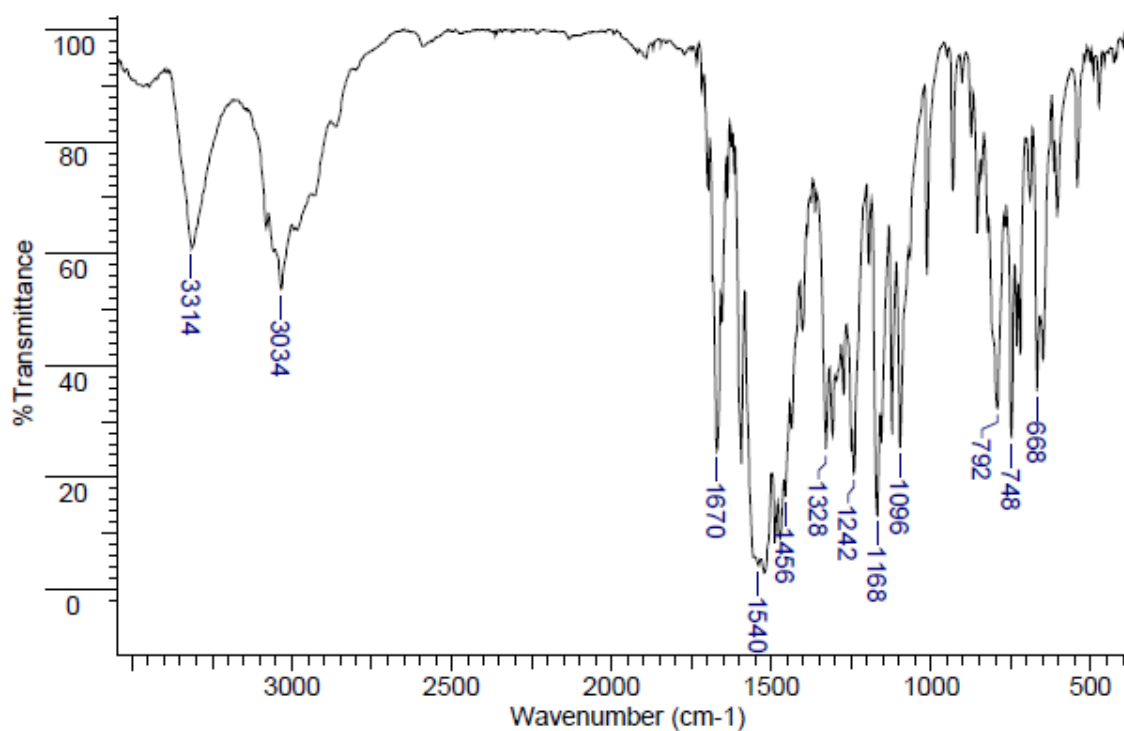
Figura 77. Espectro na região do IV (em KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) do híbrido benzoiltiureia-benzotiazol (**HBT-3-CI**)Figura 78. Espectro na região do IV (em KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) do híbrido benzoiltiureia-benzotiazol (**HBT-4-CI**)

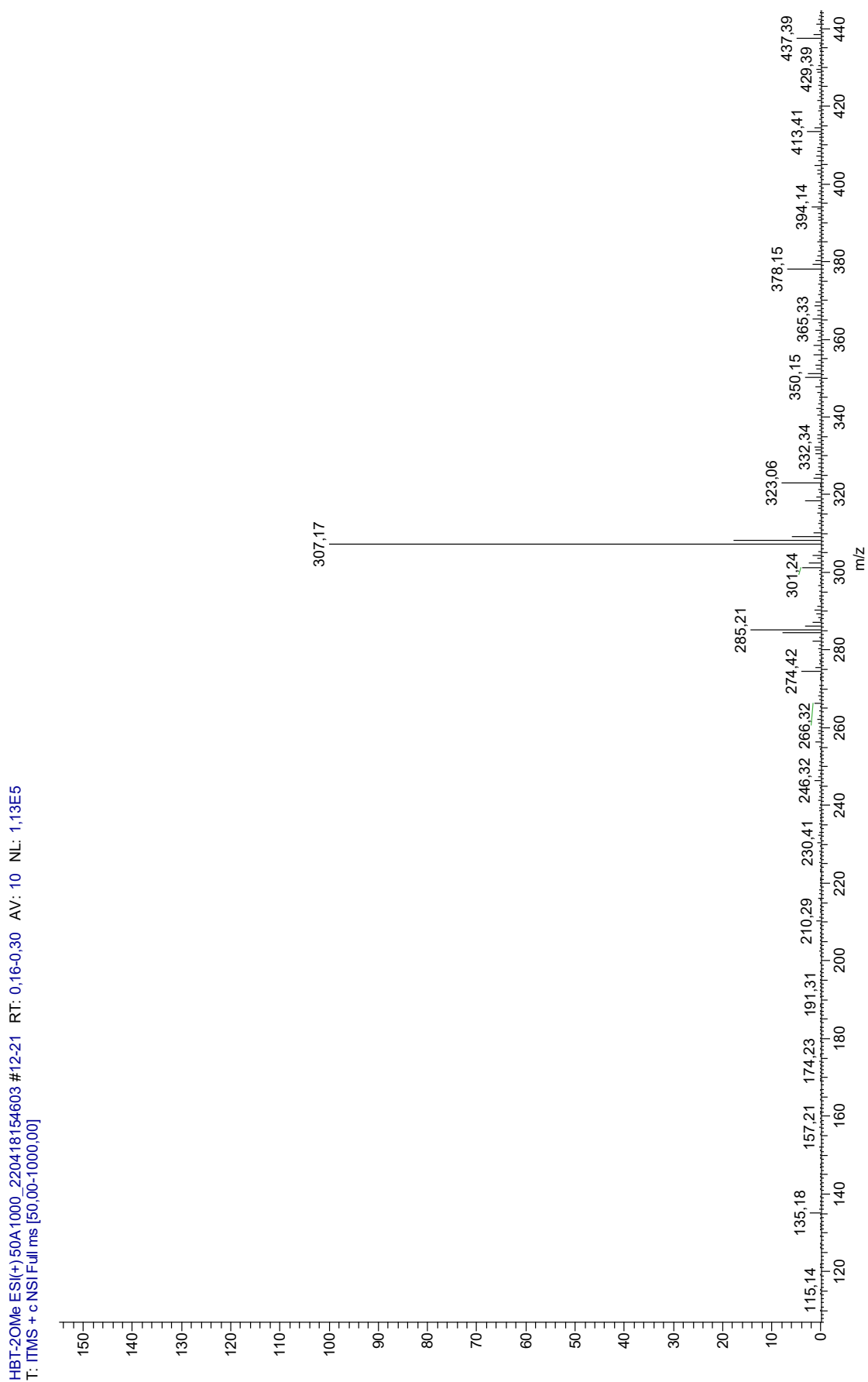
Figura 79. ESI(+)-MS do híbrido benzoiltiureia-benzotiazol (**HBT-2-OMe**)

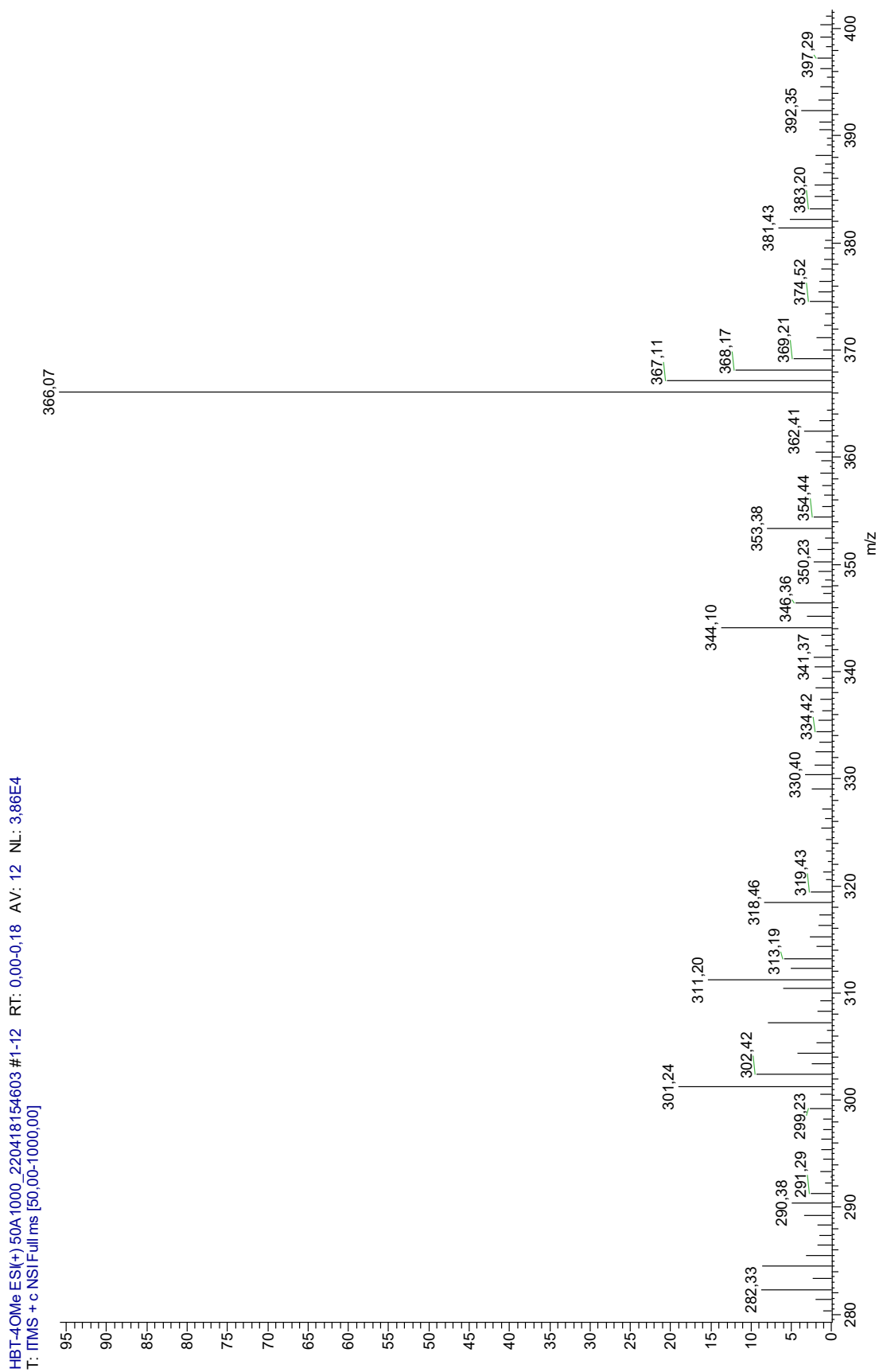
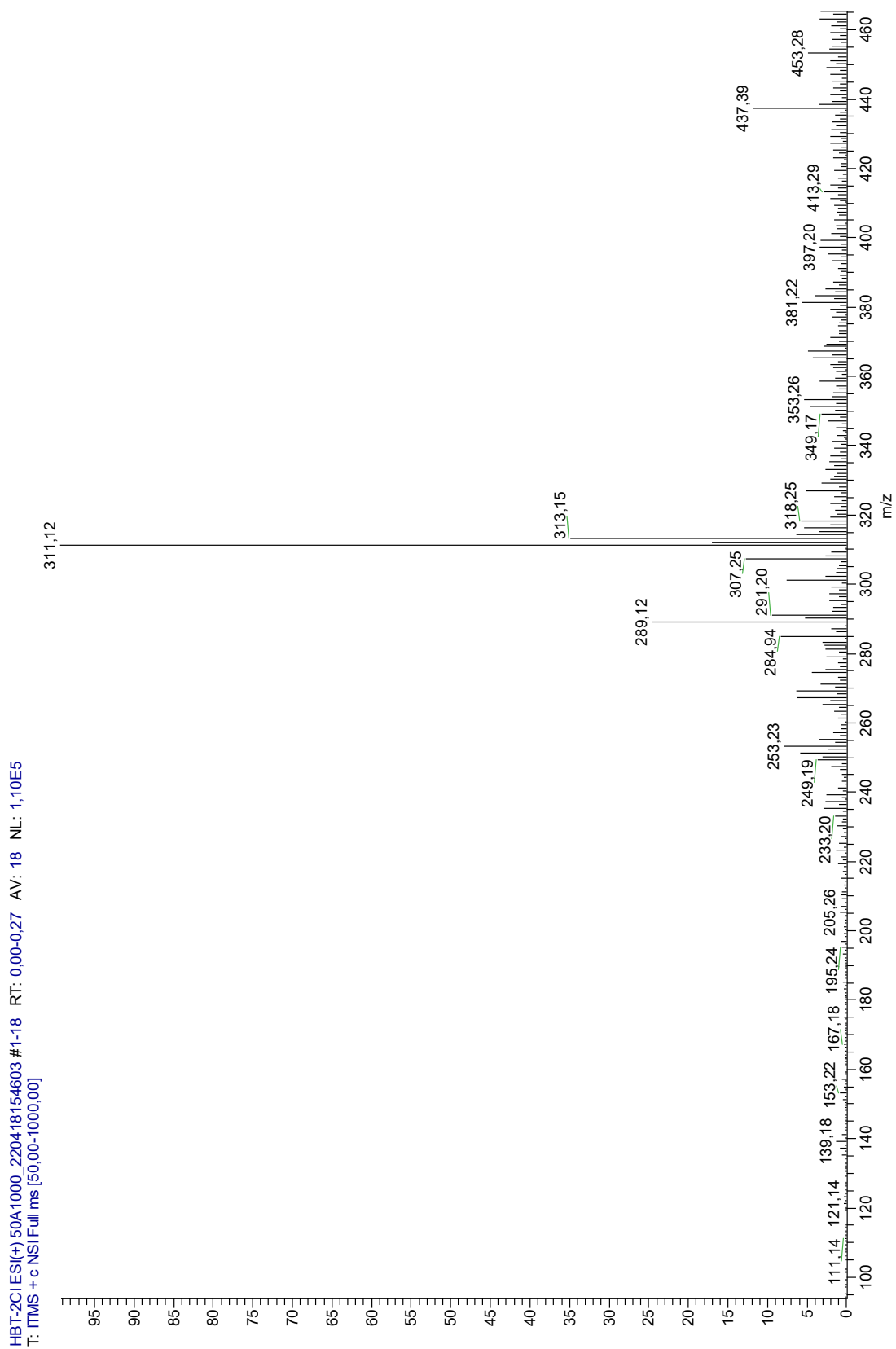
Figura 80. ESI(+)-MS do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol (**HBT-4-OMe**)

Figura 81. ESI(+)-MS do híbrido benzoiltioureia-benzotiazol (**HBT-2-CI**)

## Anexo 2 – Publicações

Journal of Advanced Research 13 (2018) 113–126



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Advanced Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jare](http://www.elsevier.com/locate/jare)

Review

Schiff bases and their metal complexes as urease inhibitors – A brief review <sup>☆</sup>

Ângelo de Fátima <sup>2,\*</sup>, Camila de Paula Pereira <sup>2</sup>, Carolina Raquel Said Dau Gonçalves Olímpio <sup>2</sup>, Breno Germano de Freitas Oliveira <sup>2</sup>, Lucas Lopardi Franco <sup>2,b</sup>, Pedro Henrique Corrêa da Silva <sup>2</sup>

<sup>2</sup> Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Alimentos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, 37130-001 Alfenas, MG, Brazil

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 22 January 2018  
Revised 22 March 2018  
Accepted 23 March 2018  
Available online 26 March 2018

**Keywords:**  
Schiff base  
Metal complex  
Urea  
Urease  
Urease inhibitor  
*Helicobacter pylori*  
*Candida albicans*

## ABSTRACT

Schiff bases, an aldehyde- or ketone-like compounds in which the carbonyl group is replaced by an imine or azomethine, are some of the most widely used organic compounds. Indeed, they are widely used for industrial purposes and also exhibit a broad range of biological activities, including anti-urease activity. Ureasases, enzymes that catalyze urea hydrolysis, have received considerable attention for their impact on living organisms' health, since the persistence of urease activity in human and animal cells can be the cause of some diseases and pathogen infections. This short review compiles examples of the most anti-urease Schiff bases ( $0.23 \mu\text{M} < \text{IC}_{50} < 37.00 \mu\text{M}$ ) and their metal complexes ( $0.03 \mu\text{M} < \text{IC}_{50} < 100 \mu\text{M}$ ). Emphasis is given to ureases of *Helicobacter pylori* and *Candida albicans*, although the active site of this class of hydrolases is conserved among living organisms.

© 2018 Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of Cairo University. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introduction

Schiff bases are a well-known class of compounds with the general structure  $\text{R}^1\text{R}^2\text{C}=\text{NR}^3$  (with  $\text{R}^3 \neq \text{H}$ ) (Fig. 1) [1], and they are named in honor to Hugo Schiff, the scientist who first synthesized

members of this class of substances in 1864 [2,3]. Schiff bases are some of the most widely used organic compounds. They serve as pigments and dyes, catalysts, intermediates in organic synthesis, and polymer stabilizers [4,5]. Schiff bases also exhibit a wide variety of biological activities, including antifungal, antibacterial, anti-tumor, anti-inflammatory, trypanocidal, anti-HIV, antimalarial, and anti-urease activities (reviewed by [1,6–11]). Indeed, the imine group present in these compounds is critical for their biological activities [12], and thus that moiety has been extensively explored for the development of new bioactive substances [13–17].

<sup>☆</sup> This work was made possible partly by the Network for the Development of Novel Urease Inhibitors ([www.mdnio.org](http://www.mdnio.org)).

Peer review under responsibility of Cairo University.

\* Corresponding author.

E-mail address: [ade.fatima@qui.ufmg.br](mailto:ade.fatima@qui.ufmg.br) (Â. de Fátima).

<https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.03.007>

2090-1232/© 2018 Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of Cairo University.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



## 2-(Pyridin-4yl)benzothiazole and Its Benzimidazole-Analogue: Biophysical and *in silico* Studies on Their Interaction with Urease and *in vitro* Anti-*Helicobacter pylori* Activities

Camila P. Pereira,<sup>a,b</sup> Ana C. F. de Lyra,<sup>c</sup> Breno G. F. Oliveira,<sup>a</sup> Igor J. S. Nascimento,<sup>c</sup>  
Edeildo F. da Silva-Júnior,<sup>c</sup> Thiago M. de Aquino,<sup>c</sup> Francesca Sisto,<sup>d</sup> Isis M. Figueiredo,<sup>c</sup>  
Felipe T. Martins,<sup>e</sup> Luzia V. Modolo,<sup>b</sup> Josué C. C. Santos<sup>b,\*</sup> and Ângelo de Fátima<sup>b,\*\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais,  
31270-901 Belo Horizonte-MG, Brazil

<sup>b</sup>Departamento de Botânica, Universidade Federal de Minas Gerais,  
31270-901 Belo Horizonte-MG, Brazil

<sup>c</sup>Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas,  
57072-900 Maceió-AL, Brazil

<sup>d</sup>Department of Biomedical, Surgery and Dental Sciences, Università degli Studi di Milano,  
20122 Milano, Italy

<sup>e</sup>Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, 74690-900 Goiânia-GO, Brazil

In this study, the interaction between benzothiazole (BTA, concentration of a drug required for 50% inhibition *in vitro* (IC<sub>50</sub>) = 0.77 mM) and benzimidazole (BIA, IC<sub>50</sub> = 2.14 mM) with urease was quantitatively assessed, using UV-Vis, molecular fluorescence, and circular dichroism. The results showed that both compounds interact with urease by a static fluorescence quenching mechanism with a non-fluorescent complex formation. The main forces responsible for stabilizing the supramolecular complex between BTA and urease were hydrophobic while, for BIA, van der Waals interactions and hydrogen bonds were the main ones. Urease conformation changes due to the interaction process were analyzed by circular dichroism and synchronous fluorescence. Besides, a competitive assay with substrate and inhibitors was used to evaluate the preferential urease site of interaction with BTA and BIA. Our experimental and theoretical studies supported that both, BTA and BIA, are mixed-inhibitors of ureases with a slight preference to the active site of such enzymes. Finally, both BTA and BIA showed to possess anti-*H. pylori* (one reference strain and six clinical isolates) activity, presenting minimal inhibitory concentration (MIC) values ranging from 38-150 and 20-164 μM, respectively. The urease inhibitors omeprazole and hydroxyurea showed MIC values in the range of 46-185 μM and 1683-> 3366 μM, respectively.

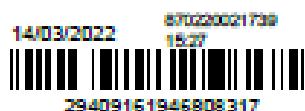
**Keywords:** urease, urease inhibitor, benzothiazole, benzimidazole, drug-protein interaction, spectroscopic techniques

### Introduction

Urease is a Ni-dependent enzyme widely synthesized by plants, fungi, bacteria, and some invertebrates.<sup>1,4</sup> In the presence of ureases, the conversion of urea to ammonia (NH<sub>3</sub>) and carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) is enhanced by one-hundred-trillion-fold.<sup>1,2,5,6</sup> Urease is a pathogenic factor for the bacteria *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis*,

*Staphylococcus saprophyticus*, and some plasmid-containing *Escherichia coli* strains known to trigger urinary tract infection, kidney stone formation, pyelonephritis, hepatic encephalopathy, and ultimately hepatic coma.<sup>1,6,10</sup> *H. pylori* can grow in the stomach (pH lower than 2.0) due to the ability to excrete ureases.<sup>1,11</sup> The increment of pH in the stomach due to NH<sub>3</sub> accumulation contributes to gastric inflammation and the formation of duodenal and gastric ulcers and gastric adenocarcinoma and lymphoma.<sup>1,3</sup> For these reasons, the development of urease inhibitors is an important tool for medical applications.<sup>12,14</sup>

\*e-mail: josue@iqh.ufal.br; adefatima.gsq@ufmg.br  
Editors handled this article: José Walkíria M. Carneiro



## Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2022 004683 8

### Dados do Depositante (71)

---

#### Depositante 1 de 1

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 17217985000104

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar - sala 2011

**Cidade:** Belo Horizonte

**Estado:** MG

**CEP:** 31270-901

**País:** Brasil

**Telefone:** (31) 3409-6430

**Fax:**

**Email:** patentes@ctit.ufmg.br

### Dados do Pedido

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (84):** COMPOSIÇÕES BIOESTIMULANTES DO DESENVOLVIMENTO VEGETAL E USO

**Resumo:** A presente tecnologia trata de composições biotestimulantes do crescimento vegetal compostas de troidantoinas obtidas a partir de aminoácidos, capazes de propiciar aumento no desempenho de culturas vegetais.

**Figura a publicar:** 3

**PETIÇÃOAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 14/03/2022 às 15:27, Petição 870220021730

# 12 Total Synthesis of Some Important Natural Products from Brazilian Flora

*Leonardo da Silva Neto<sup>a,b</sup>, Breno Germano de Freitas Oliveira<sup>a</sup>, Wellington Alves de Barros<sup>a</sup>, Rosemeire Brondi Alves<sup>a</sup>, Adão Aparecido Sabino<sup>a</sup>, and Ângelo de Fátima<sup>a</sup>*

<sup>a</sup>Grupo de Estudos em Química Orgânica e Biológica (GEQOB), Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais \*UFMG), Belo Horizonte, Brazil

<sup>b</sup>Instituto Federal Farroupilha, Alegrete, Brazil

## CONTENTS

|        |  |     |
|--------|--|-----|
| 12.1   | Introduction.....  | 305 |
| 12.2   | Total Synthesis of Brazilian Plant-Derived Natural Products.....               | 306 |
| 12.2.1 | Coumarins: A Privileged Pyrone-Phenyl in Natural Products.....                 | 306 |
| 12.2.2 | Flavonoids: A Dietary Natural Product with Health Benefits.....                | 308 |
| 12.2.3 | Alkaloids: Ubiquitous Bioactive Natural Products.....                          | 310 |
| 12.2.4 | Terpenes: A Diverse Class of Natural Products with Valuable Bioactivities..... | 314 |
| 12.2.5 | Lignans: Phenylpropane Derivatives Widely Distributed in Higher Plants.....    | 317 |
| 12.2.6 | Some Miscellaneous Synthetic Examples.....                                     | 318 |
| 12.3   | Concluding Remarks.....  | 322 |
|        | References.....  | 323 |

## 12.1 INTRODUCTION

Since ancient times, mankind has taken advantage of natural products to treat and/or prevent many diseases and dysfunctions, either as original compounds or after modifications (Lachance et al., 2012; Newman and Cragg, 2012). Indeed, nature contains a vast source of natural products that exhibit a plethora of biological activities. The diversity of chemical structure makes natural products very valuable to pharmaceutical industries and agricultural segments as well (Modolo et al., 2015a). Natural products from plants have been a great source of inspiration for improving the quality of human and animal life as disease therapeutics and for increasing food resources (Cragg and Newman, 2013; Dayan et al., 2009; de Fátima et al., 2008; de Fátima et al., 2014; Rates, 2001; Rice et al., 1998; Silva et al., 2014).

Brazil is one of the largest countries (8.5 million km<sup>2</sup>) in the world and the largest in all Latin America, in addition to a marine area of more than 4.5 million km<sup>2</sup>. In terms of natural resources, Brazil has five important continental biomes and the largest river system in the world, standing out










## Chemico-Biological Interactions

### Thiohydantoin and Hydantoin Derived from Amino Acids as Potent Urease Inhibitors Inhibitory Activity and Ligand-Target Interactions. --Manuscript Draft--

|                       |  |
|-----------------------|--|
| Manuscript Number:    | CHEMBIOINT-D-22-00318  |
| Article Type:         | Research Paper   |
| Section/Category:     | Biochemical toxicology   |
| Keywords:             | thiohydantoin; hydantoin; NMR; Molecular docking; C. erasiliformis; STD  |
| Corresponding Author: | Fernando Cesar de Macedo Jr<br>Universidade Estadual de Londrina<br>BRAZIL   |
| First Author:         | Priscila Goes Camargo, Doctor  |
| Order of Authors:     | Priscila Goes Camargo, Doctor<br>Marcell Fabrís, Master<br>Matheus Yoshimitsu Tabata Nakamae, Graduated<br>Breno Gerardo de Freitas Oliveira, Master<br>Camilo Henrique da Silva Lima, Doctor<br>Angelo de Fátima, Doctor<br>Marcelle de Lima Ferreira Bispo, Doctor<br>Fernando Cesar de Macedo Jr  |
| Abstract:             | <p>Ureasases are metalloenzymes with catalytic function of urea hydrolysis into ammonia and carbamate. Their occurrence includes plants, fungi, and bacteria and is well recognized as a virulence factor of ureolytic microorganisms due to the production of ammonia that favors colonization. The development of urease inhibitors has received considerable attention due to their impact on the health of living organisms. In the agro-industrial context, ureases are related to the loss of available nitrogen in the soil due to the hydrolysis of urea, the most widely used fertilizer. We report the investigation of hydantoin and thiohydantoin derived from L and D -amino acids as inhibitors against the <i>Canavalia ensiformis</i> urease (CEU). The biochemical <i>in vitro</i> assay against CEU revealed a promising inhibitory potential for most thiohydantoin with six of them showing %I higher than the reference inhibitor thiourea (58.5%). In addition, thiohydantoin derived from L -valine, 1b , as well as the hydantoin 2d , derived from L -methionine, were identified as the most potent inhibitors with %I = 90.5 and 85.0 respectively. Enzyme kinetic studies demonstrated a mixed and uncompetitive inhibition profile for these compounds with <math>K_i</math> values of 0.42 mM for 1b and 0.09 mM for 2d . These kinetic parameters, obtained from traditional colorimetric assay, were strictly related to the <math>K_D</math> values measured spectroscopically by the STD technique for the urease complex. STD was also used to evince the moieties of the ligands responsible for the binding with the enzyme. Molecular docking studies showed that the thiohydantoin and hydantoin rings can act as a pharmacophoric group due to their binding affinity by hydrogen bonding interactions with critical amino acid residues in the enzyme active and/or allosteric site. These findings agreed with the experimental <math>\alpha</math> values, demonstrating that 1b has affinity by free enzyme, and 2d derivative, an uncompetitive inhibitor, has great binding affinity at the allosteric site. The results for the thiohydantoin 1a , derived from D -valine, demonstrated a drastic stereochemical influence on inhibition, kinetics, and binding parameters in comparison to its enantiomer 1b .</p> |
| Suggested Reviewers:  | <p>Muhammad Iqbal Choudhary, Doctor<br/>Professor, University of Karachi<br/>iqbal.choudhary@uocs.edu<br/>Expert in the field</p> <p>Jamshed Iqbal, Doctor</p>   |

## Anexo 4 – Licenças

**Title:** Nonredox Nickel Enzymes  
**Author:** Michael J. Maroney, Stefano Ciurli  
**Publication:** Chemical Reviews  
**Publisher:** American Chemical Society  
**Date:** Apr 1, 2014  
 Copyright © 2014, American Chemical Society

Logged in as:  
 Breno Oliveira  
 Account #:  
 3001476425  
 LOGOUT

**PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE**

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

BACK

CLOSE WINDOW

Copyright © 2019 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#).  
 Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customer@copyright.com](mailto:customer@copyright.com)

## SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jul 30, 2019

This Agreement between Ms. Breno Oliveira ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

|  |   |
|--|---|
| License Number                         | 4639021210774   |
| License date                           | Jul 30, 2019  |
| Licensed Content Publisher             | Springer Nature   |
| Licensed Content Publication           | Nature Reviews Molecular Cell Biology   |
| Licensed Content Title                 | Living dangerously: how Helicobacter pylori survives in the human stomach   |
| Licensed Content Author                | Cesare Montecucco et al   |
| Licensed Content Date                  | Jun 1, 2001   |
| Type of Use                            | Thesis/Dissertation   |
| Requestor type                         | academico/university or research institute  |
| Format                                 | print   |
| Portion                                | figures/tables/illustrations  |
| Number of figures/tables/illustrations | 1   |
| Will you be translating?               | no  |
| Circulation/distribution               | <501  |
| Author of this Springer Nature content | no  |
| Title                                  | Síntese de derivados benzotiazóis e benzoimidazóis: avaliação da atividade anti-ureolítica para fins agrônômicos e medicinais                   |
| Institution name                       | n/a   |
| Expected presentation date             | Jul 2021  |
| Order reference number                 | Figure 2  |
| Portions                               | page 460  |
| Requestor Location                     | Ms. Breno Oliveira<br>Av. Presidente Antonio Carlos<br>6627<br><br>Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901<br>Brazil<br>Attn: Ms. Breno Oliveira |
| Total                                  | 0.00 USD  |

## ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jul 30, 2019

This Agreement between Ms. Breno Oliveira ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

|  |   |
|--|---|
| License Number                               | 4618221304432   |
| License date                                 | Jun 29, 2019  |
| Licensed Content Publisher                   | Elsevier  |
| Licensed Content Publication                 | Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy   |
| Licensed Content Title                       | Molecular structure, vibrational spectroscopic, first-order hyperpolarizability and HOMO, LUMO studies of 2-aminobenzimidazole                  |
| Licensed Content Author                      | S. Sudha,M. Karabacak,M. Kurt,M. Cinar,N. Sundaraganesan  |
| Licensed Content Date                        | Dec 15, 2011  |
| Licensed Content Volume                      | 84  |
| Licensed Content Issue                       | 1   |
| Licensed Content Pages                       | 12  |
| Start Page                                   | 184   |
| End Page                                     | 195   |
| Type of Use                                  | reuse in a thesis/dissertation  |
| Portion                                      | figures/tables/illustrations  |
| Number of figures/tables/illustrations       | 1   |
| Format                                       | both print and electronic   |
| Are you the author of this Elsevier article? | No  |
| Will you be translating?                     | No  |
| Original figure numbers                      | Fig 5, b  |
| Title of your thesis/dissertation            | Síntese de derivados benzotiazóis e benzoimidazóis: avaliação da atividade anti-ureolítica para fins agrônômicos e medicinais                   |
| Expected completion date                     | Jul 2021  |
| Estimated size (number of pages)             | 100   |
| Requestor Location                           | Ms. Breno Oliveira<br>Av. Presidente Antonio Carlos<br>6627<br><br>Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901<br>Brazil<br>Attn: Ms. Breno Oliveira |
| Publisher Tax ID                             | GB 494 6272 12  |
| Total  | <b>0.00 USD</b>   |

## ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jul 30, 2019

This Agreement between Ms. Breno Oliveira ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

|  |  |
|--|--|
| License Number                               | 4617741189076  |
| License date                                 | Jun 28, 2019   |
| Licensed Content Publisher                   | Elsevier   |
| Licensed Content Publication                 | Journal of Industrial and Engineering Chemistry  |
| Licensed Content Title                       | Quantum chemical and experimental investigations on inhibitory behavior of amino-imino tautomeric equilibrium of 2-aminobenzothiazole on steel corrosion in H2SO4 solution |
| Licensed Content Author                      | I. Danaee, M. Gholami, M. RashvandAvei, M.H. Maddahy   |
| Licensed Content Date                        | Jun 25, 2015   |
| Licensed Content Volume                      | 26   |
| Licensed Content Issue                       | n/a  |
| Licensed Content Pages                       | 14   |
| Start Page                                   | 81   |
| End Page                                     | 94   |
| Type of Use                                  | reuse in a thesis/dissertation   |
| Portion                                      | figures/tables/illustrations   |
| Number of figures/tables/illustrations       | 1  |
| Format                                       | both print and electronic  |
| Are you the author of this Elsevier article? | No   |
| Will you be translating?                     | No   |
| Original figure numbers                      | Fig. 6.  |
| Title of your thesis/dissertation            | Síntese de derivados benzotiazóis e benzoimidazóis: avaliação da atividade anti-ureolítica para fins agrônômicos e medicinais  |
| Expected completion date                     | Jul 2021   |
| Estimated size (number of pages)             | 100  |
| Requestor Location                           | Ms. Breno Oliveira<br>Av. Presidente Antonio Carlos<br>6627<br><br>Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901<br>Brazil<br>Attn: Ms. Breno Oliveira<br>GB 494 6272 12          |
| Publisher Tax ID                             |  |
| Total  | <b>0.00 USD</b>  |
| Terms and Conditions                         |  |

### INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

### GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.
3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:  
"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."
4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.