



UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA-IQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA-PPGQB

**Explorando as propriedades biofísicas, antiproliferativa, antioxidante
e de inibições enzimáticas de azometinas**

ARI SOUZA GUIMARÃES

Universidade Federal de Alagoas
Campus A. C. Simões
Tabuleiro dos Martins
57.072-970 – Maceió - AL

ARI SOUZA GUIMARÃES

**Explorando as propriedades biofísicas, antiproliferativa, antioxidante
e de inibições enzimáticas de azometinas**

Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências com ênfase em Química Orgânica.

Orientadora: Prof. Dr^a. Isis Martins Figueiredo

Coorientador: Prof. Dr^o. Dimas José da Paz Lima

Maceió-AL

2024

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

G963e Guimarães, Ari Souza.

Explorando as propriedades biofísicas, antiproliferativa, antioxidante e de inibições enzimáticas de azometinas / Ari Souza Guimarães. – 2024.

177 f. : il., grafs., tabs. color.

Orientadora: Isis Martins Figueiredo.

Co-orientador: Dimas José da Paz Lima.

Tese (doutorado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2024.

Inclui bibliografias.

1. Azometina. 2. *Schiff*, Bases de. 3. Aminoguanidina hidrazonas. 4. Pirazois. 5. Aminoas. 6. Antioxidantes. 7. Atividade antiproliferativa. 8. Urease. 9. Monofenol mono-oxigenase. 10. Fator de proteção solar. I. Título.

CDU: 66.095.34



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.@iqb.ufal.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **Ari Souza Guimarães** intitulada: **“Explorando as propriedades biofísicas, antiproliferativa, antioxidante e de inibições enzimáticas de azometinas”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 31 de janeiro de 2024, às 9h, na sala de reuniões do IQB.

Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
gov.br **ISIS MARTINS FIGUEIREDO**
Data: 07/02/2024 10:16:05-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Isis Martins Figueiredo
(PPGQB/IQB/UFAL) - Orientadora

Documento assinado digitalmente
gov.br **DIMAS JOSE DA PAZ LIMA**
Data: 05/02/2024 12:49:16-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Dimas Jose da Paz Lima
(PPGQB/IQB/UFAL) - Coorientador

Documento assinado digitalmente
gov.br **MARILIA OLIVEIRA FONSECA GOULART**
Data: 05/02/2024 12:44:54-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Marília Oliveira Fonseca de Goulart
(PPGQB/IQB/UFAL)

Documento assinado digitalmente
gov.br **EDEILDO FERREIRA DA SILVA JÚNIOR**
Data: 02/02/2024 09:15:13-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Edeildo Ferreira da Silva Júnior
(PPGQB/IQB/UFAL)

Documento assinado digitalmente
gov.br **LUZIA VALENTINA MODOLO**
Data: 01/02/2024 15:17:57-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Luzia Valentina Modolo
(ICB/UFGM)

Documento assinado digitalmente
gov.br **FERNANDA ANDREIA ROSA**
Data: 02/02/2024 10:01:50-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Fernanda Andreia Rosa
(UEM)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria (Nina) e Francisco (Chico), agricultores, semianalfabetos, que mesmo sem muita instrução, foram conhecimento, incentivo e sobretudo, amor. Vocês são os catalisadores da minha jornada, muito obrigado!

Aos meus irmãos e irmãs Adeildo, Alexandre, Adriely e Samara sobrinhas e sobrinhos Mayra, Valentina, Albert, Pedro, Ravi, João Abner e Francisco (está chegando haha) pela compreensão, paciência, amor e primordial apoio, vocês também são os catalisadores da minha jornada.

A minha irmã Samila, que tem sido minha mãe, cozinheira, faxineira, terapeuta, amiga, conselheira e companheira de surtos. Muito obrigado!

A minha cunhada Izabela, mulher sábia, dona dos melhores conselhos e grande incentivadora.

A minha companheira de doutorado e de vida, Saraliny França, muito obrigado por todo carinho, apoio, incentivo e compreensão.

A doutoranda Amanda Luise, que tem sido minha amiga, incentivadora, terapeuta, orientadora e companheira de surtos. Sua companhia tornou a caminhada mais leve. Muito obrigado!

As amigas Aryanna Sany e Janaina Oliveira, que foram minhas maiores incentivadoras quando pensei em desistir. Muito obrigado!

A minha orientadora prof. Dr^a Isis Martins Figueiredo, pelas orientações quando requisitado, todos os momentos de descontração e por ter me aceitado como orientando, o que me levou engajar-me no grupo de pesquisa LINQA, permitindo-me um maior amadurecimento pessoal e profissional.

Ao prof. Dr^o Josué Carinhanha Caldas Santos, por tamanho profissionalismo, pela confiança, apoio, orientação sempre quando requisitada, tenho muito respeito e admiração por sua pessoa.

Ao prof. Dr^o Dimas José da Paz Lima por ter me aberto a porta do LMC, por todas as dúvidas sanadas e orientações quando requisitado.

A Dr^a Verônica Diniz pelas conversas, apoio e ensinamentos. Obrigado, Verô!

A minha orientadora de graduação prof. Dr^a Silvia Helena Cardoso por ter aceito como orientando, mesmo tendo ciência de minhas limitações. Sua oportunidade foi primordial para minha formação. Obrigado!

A professora Mary Ann Foglio e a pesquisadora Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz pela realização dos estudos da atividade antiproliferativa.

As minhas companheiras de mestrado Camila e Roberta pela amizade, risadas, farras, sem vocês essa jornada não seria a mesma.

Aos companheiros Everton, Giclênio e Raul, o apoio de vocês durante o mestrado, culminaram até esse momento. Muito obrigado!

A amiga Maria das Graças (mestre dos magos) que em muitos momentos foi apoio e incentivo. Nossas conversas foram acalento em diversos momentos. Muito Obrigado!

A companheira de laboratório durante o mestrado, Marina Magalhães, muito obrigado por todos os ensinamentos.

Aos amigos Francisco, Jaelson, Reginaldo e Woodland, por todo o apoio, companheirismo e momentos de descontração durante a realização deste trabalho. Muito obrigado!

As alunas de graduação Emilly Sousa e Victorya Medeiros por toda ajuda e por me ensinar a exercer o dom da docência. Obrigado, meninas!

Ao doutorando Emeson 02 por a ajuda durante os realização de alguns experimentos.

A Maria Célia, pelas conversas e conselhos. Muito obrigado, Célia!

Aos os amigos do laboratório de instrumentação e desenvolvimento em química analítica (LINQA), Karol, Alessandra, Artur, Carla, Ellen, Emerson Freire, Fátima, Daniel Levi, Jéssica, João Honorato, Karly, Karine e Sângela por todo o apoio e momentos de descontração durante a realização deste trabalho, muito obrigado!

Aos os amigos do do Laboratório de química orgânica aplicada a materiais e compostos bioativos (LMC), Lucas, Luiz Paulo (Pato), Adrielle, Marcone, Ledja e Natália por todo o apoio, disponibilidade, ensinamento e momentos de descontração durante a realização deste trabalho, muito obrigado!

Aos amigos da Física, Pâmela, Júlio, Ícaro, Ana Maria e Alisson por todos os momentos de descontração quando eu estava à beira de pirar.

A Universidade Federal de Alagoas-UFAL, ao Instituto de Química e Biotecnologia-IQB a ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, pela oportunidade de crescimento científico e profissional.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq e aos demais órgãos de fomento, CAPES e FAPEAL pelo apoio financeiro.

E a todos que não foram citados, mas estão cientes de sua participação direta ou indireta na realização deste trabalho.

RESUMO

O grupo azometina (C=N) destaca-se devido oferecer oportunidade de criar uma ampla variedade de híbridos moleculares com estruturas diversas, manifestando propriedades biológicas notáveis, como atividade antifúngica, anticancerígena anti-inflamatória, antiviral, antioxidante entre outras. Neste sentido, levando em consideração a importância de moléculas bioativas com tais propriedades, nesse estudo, realizou-se a avaliação do perfil biológico de três classes de compostos híbridos moleculares da ligação C=N. Inicialmente, realizou-se a avaliação de aminoguanidinas hidrazonas, das quais, o derivado **AGH-3** com núcleo indol ofereceu a maior capacidade antioxidante com resultados comparáveis ao Trolox® em ensaios de eliminação de radicais DPPH[•], ABTS^{•+}, FRAP e [•]NO. Além disso, o **AGH-3** apresentou a maior atividade antiproliferativa contra células de câncer renal humano com GI₅₀ = 6,3 µM. Nos estudos biofísicos, pôde-se notar que o **AGH-3** interagiu com o ctDNA formando um complexo supramolecular fluorescente com um Kb=2,89×10³ M⁻¹, preferencialmente via intercalação. Os resultados demonstraram o potencial das aminoguanidinas hidrazonas como uma classe estratégica de compostos com atividade biológica multialvo. Posteriormente, foi avaliado o potencial de inibição de urease de uma classe de bases de *Schiff* derivadas de tiossemicarbazonas e híbridas com pirazóis. O derivado **312** apresentou a maior atividade (IC₅₀ = 24,72±1,09 µM), sendo comparável ao padrão Tioureia (teste de *Tukey*, $p \leq 0,05$), apresentando um tipo de inibição mista. Os estudos termodinâmicos demonstraram que a formação do complexo (**312**-urease) ocorre de forma espontânea ($\Delta G < 0$), sendo estabilizado a partir de interações hidrofóbicas (ΔH e $\Delta S > 0$). Os estudos via UV-vis sugerem que o **312** interage com o Ni(II), cofator da urease. Os estudos de *docking* molecular corroboraram com estudos experimentais, demonstrando que o **312** interage com resíduos de aminoácidos próximos ao sítio ativo da enzima, principalmente por meio de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, bem como, com os Ni(II) presentes no sítio ativo da enzima. O composto **312** também demonstrou uma inibição da urease em amostra de solo, sendo superior ao NBPT no S2(teste de *Tukey*, $p \leq 0,05$). Adicionalmente, esse composto demonstrou eficiência em inibir enzimas ureolíticas em amostras de urina. Os resultados ressaltam o potencial do composto **312** frente a várias aplicações biotecnológicas. Por fim, realizou-se a síntese, caracterização e aplicação de compostos análogos ao resveratrol e híbridos com o ácido lipoico, utilizando as bases de *Schiff* e aminas como estruturas modelos. Com isso, obteve-se os compostos com rendimentos que variaram de 49 a 98%, que foram caracterizados por RMN ¹H, ¹³C, Noesy e FTIR-ATR. O composto **6** apresentou um IC₅₀=22,91±0,90 µM de inibição da tirosinase e uma inibição do tipo mista, demonstrando uma atividade superior aos padrões ácido kójico e resveratrol (teste de *Tukey*, $p \leq 0,05$). Na avaliação de FPS-UVB, a ligação C=N teve influência significativa, destacando-se as bases de *Schiff*, com o composto **17** exibindo o maior valor de FPS (21,53 ± 0,74), superando o BZF-3 (teste de *Tukey*, $p \leq 0,05$). Além disso, os compostos demonstraram atividades antioxidantes promissoras, sendo o composto **7** notável no método ABTS^{•+} (IC₅₀ = 0,016 ± 0,0001 µM). Os estudos de ancoragem molecular evidenciaram que os compostos interagem com resíduos de aminoácidos próximo ao sítio ativo da enzima principalmente via interações de van der Waals e ligações de hidrogênio. Finalmente, esses resultados destacam o potencial bioativo dos compostos avaliados para serem explorados em estudos futuros.

Palavras-chave: Azometina, Bases de *Schiff*, Aminoguanidina hidrazonas, pirazóis, aminas, antioxidantes, atividade antiproliferativa, urease, tirosinase, Fator de proteção solar.

ABSTRACT

Azomethine group (C=N) stands out for providing the opportunity to create a wide variety of molecular hybrids with diverse structures, manifesting remarkable biological properties, such as antifungal, anticancer, anti-inflammatory, antiviral and antioxidant activity, among others. Thus, considering the importance of bioactive molecules with such properties, this study evaluated the biological profile of three classes of C=N molecular hybrid compounds. Initially, the evaluation of aminoguanidine hydrazones was carried out, of which the AGH-3 derivative with an indole nucleus offered the greatest antioxidant capacity with results comparable to Trolox® in DPPH•, ABTS•+, FRAP and •NO radical scavenging assays. In addition, **AGH-3** showed the greatest antiproliferative activity against human kidney cancer cells with $GI_{50} = 6.3 \mu\text{M}$. In the biophysical studies, it was noted that **AGH-3** interacted with ctDNA forming a fluorescent supramolecular complex with a $K_b = 2.89 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, preferably via an intercalator mechanism. The results demonstrated the potential of aminoguanidine hydrazones as a strategic class of compounds with multitarget biological activity. Subsequently, the urease inhibition potential of a class of Schiff bases derived from thiosemicarbazones and hybridized with pyrazoles. Derivative **312** showed the highest activity ($IC_{50} = 24.72 \pm 1.09 \mu\text{M}$), being comparable to the standard Thiourea (Tukey test, $p \leq 0.05$), showing a mixed type of inhibition. Thermodynamic studies have shown that the formation of the complex (**312**-urease) occurs spontaneously ($\Delta G < 0$) and is stabilized by hydrophobic interactions (ΔH and $\Delta S > 0$). UV-vis studies suggest that **312** interacts with Ni(II), a cofactor of urease. Molecular docking studies corroborated experimental studies, showing that **312** interacts with amino acid residues close to the enzyme's active site, mainly through hydrogen bonds and hydrophobic interactions, as well as with Ni(II) present in the enzyme's active site. Compound **312** also showed urease inhibition in soil samples, being superior to NBPT in S2 (Tukey test, $p \leq 0.05$). In addition, this compound was effective in inhibiting ureolytic enzymes in urine samples. The results highlight the potential of compound **312** for various biotechnological applications. Finally, compounds analogous to resveratrol and hybrids with lipoic acid were synthesized, characterized and applied, using Schiff bases and amines as model structures. This resulted in compounds with yields ranging from 49 to 98%, which were characterized by ^1H , ^{13}C , Noesy NMR and FTIR-ATR. Compound **6** showed an $IC_{50} = 22.91 \pm 0.90 \mu\text{M}$ of tyrosinase inhibition and mixed-type inhibition, demonstrating superior activity to the kojic acid and resveratrol standards (Tukey test, $p \leq 0.05$). In the SPF-UVB evaluation, the C=N bond had a significant influence, with Schiff bases standing out, with compound **17** exhibiting the highest SPF value (21.53 ± 0.74), surpassing BZF-3 (Tukey test, $p \leq 0.05$). In addition, the compounds showed promising antioxidant activities, with compound **7** being outstanding in the ABTS-+ method ($IC_{50} = 0.016 \pm 0.0001 \mu\text{M}$). Molecular docking studies showed that the compounds interact with amino acid residues near the enzyme's active site mainly via van der Waals interactions and hydrogen bonds. Finally, these results highlight the bioactive potential of the compounds evaluated to be explored in future studies.

Keywords: Azomethine, Schiff bases, aminoguanidine hydrazones, pyrazoles, amines, antioxidants, antiproliferative activity, urease, tyrosinase, sun protection factor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica das iminas (Bases de Schiff).	20
Figura 2. Representação esquemática de possíveis modos de ligação DNA-ligante. ...	30
Figura 3. A) Alguns exmplos de AGH's bioativos descritos na literatura. B) Modificação proposta no núcleo do sistema aminoguanidínico.	69
Figura 4. Estrutura dos derivados aminoguanidinas hidrazonas avaliados.	70
Figura 5. Gráficos que expressam a capacidade do derivado aminoguanidínico AGH-3 e o padrão Trolox® em sequestrar o radical $\cdot\text{NO}$. A) Concentração de nitrito formada em função do tempo de reação. B) Porcentagem de inibição em função do tempo.	72
Figura 6. Espectros de absorção no UV-vis dos diferentes sistemas. A) ctDNA e AGH-3 a 10 μM . B) Titulação espectrofotométrica do AGH-3 (10 μM) com diferentes concentrações do ctDNA. Condição: pH = 7,4 em Tris-HCl 50 mM com 100 mM NaCl a 30 °C.	77
Figura 7. Avaliação da interação AGH-3 -ctDNA por fluorescência molecular (condição: pH = 7,4, Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl) a 30 °C. A) Espectro do AGH-3 (10 μM) com adições crescentes (1, 10, 25, 50, 100, 150, 200 e 250 μM) de ctDNA. B) Gráfico de $1/(\Delta F)$ versus $1/[C_{\text{DNA}}]$ utilizado para a determinação de K_b	78
Figura 8. Avaliação do modo de interação AGH-3 -ctDNA (condição: pH=7,4, Tris-HCl 50 mmol L ⁻¹ , 100 mmol L ⁻¹ NaCl) a 30 °C. (A) Competição do AGH-3 com o complexo EB-ctDNA. (B) Competição do AGH-3 com o complexo HO-ctDNA. (C) Gráfico de Stern-Volmer para o AGH-3 . (D) Curva logarítmica para o cálculo da constante de ligação do AGH-3 com ctDNA.	82
Figura 9. Curva de desnaturação térmica do ctDNA livre e do complexo formados entre a macromolécula e o derivado aminoguanidínico hidrazona (AGH-3 -ctDNA).	85
Figura 10. Docking molecular entre o ligante AGH-3 e o DNA (PDB ID:1BNA). Formação do complexo (AGH-3 -DNA) e interação entre o ligante (AGH-3) e a macromolécula (DNA).	86
Figura 11. Estrutura e destaque dos principais grupos presentes nas moléculas e suas características. A. Núcleo básico dos compostos 307 – 312 . B. Núcleo básico dos compostos 313 e 317 . C. Substituintes presentes nos compostos 307 – 313 e 317	97
Figura 12. Percentual de inibição da urease <i>C. ensiformis</i> pelas bases de Schiff híbridas com pirazóis e derivadas de tiossemicarbazonas na concentração de 100 μM . Condições: Tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 30 °C.	98
Figura 13. (A) Hipérbole de Michaelis-Menten e (B) gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk para o composto 312 com a urease. Condições: urease 56 mU, Tampão fosfato 20 mM, pH 7. 4 30 °C.	100
Figura 14. Espectro de absorção no UV-vis para os três sistemas avaliados 312 (10 μM), urease (10 μM) e o 312 + urease. Condições: Tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, 30°C.	102
Figura 15. Espectro de absorção no UV-vis para os três sistemas avaliados nos experimentos com o cofator Ni (II). Condições: Tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, 30°C.	104

Figura 16. A. Complexo do 312 com a urease Jeak bean (<i>Canavalia ensiformis</i>) PDB ID:4GOA. B. Disposição do 312 no sitio ativo da enzima. C. Interações e resíduos envolvidos no processo de formação do complexo 312 -urease.	108
Figura 17. Avaliação da sensibilidade analítica em função do sistema tampão e pH. A. Tampão fosfato de potássio, pH 6,5, 7,4 e ,0. B. Tampão tris, pH 6,5, 7,4 e 8,0. Condições: Tampões 20 mM, 30°C.....	110
Figura 18. Avaliação da sensibilidade analítica em função do fator de diluição da amostra. Condição: Tampão tris 20 mM pH 7,4 30°C.	111
Figura 19. Valores médios de inibição da atividade ureolitica de ureases presentes em amostras de urina de doadores do sexo masculino e feminino por composto 312 e o padrões clássicos de inibição da urease, NBPT, TIO, AA e HU na concentração de 100 µM. Condição: Tampão tris 20 mM pH 7,4 30 °C.	112
Figura 20. Estratégia reacional dos compostos prospectados no trabalho.	120
Figura 21. Rotas sintéticas utilizadas para a síntese dos compostos e compostos sintetizados no trabalho. A. Rota sintética para as iminas (1 – 17) e aminas (18 – 19). B. Rotas adotadas para a síntese dos compostos (20 – 22). C. Compostos sintetizados no trabalho.	122
Figura 22. Gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk para os compostos mais ativos frente a inibição da tirosinase (<i>mushroom</i>). A. Composto 2 . B. Composto 6 . C. Composto 10 . D. Composto 11 . E. Composto 12 . F. Composto 13 . G. Composto 21 . H. Composto 22 . Condições: Tampão fosfato de potássio, 50 mM, pH 6,8.....	126
Figura 23. Redocking ligante cocrystalizado tropolona com a enzima tirosinase (azul - ligante cocrystalizado; Laranja- ligante ancorado).	138
Figura 24. Representação dos estudos in silico de docking molecular entre os compostos avaliados (1 – 22) e a tirosinase mushroom (PDB ID: 2Y9X). A. Complexo macromolécula composto 6 e ligante cocrystalizado. B. Composto 6 na região próxima ao sitio ativo da enzima, local onde se encontra o ligante co-cristalizado tropolona. C. Interações do composto 6 com os resíduos de aminoácidos presentes no bolsão ou próximo do sitio ativo da enzima.	139
Figura 25. Estrutura gráfica utilizada para calcular o IC ₅₀ dos inibidores padrões e dos compostos avaliados no trabalho. A. Gráfico para expressar o IC ₅₀ do composto 307 . B. Gráfico para expressar o IC ₅₀ do composto 308 . C. Gráfico para expressar o IC ₅₀ do composto 309 . D. Gráfico para expressar o IC ₅₀ do composto 310 . E. Gráfico para expressar o IC ₅₀ do composto 312 . F. Gráfico para expressar o IC ₅₀ do composto NBPT. G. Gráfico para expressar o IC ₅₀ do composto TIO. F. Gráfico para expressar o IC ₅₀ do composto HU. Condições: Tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, 30 °C.....	147
Figura 26. Figura x. Titulação espectrofotométrica da urease com o 312 (1 – 25 mM) em três temperaturas distintas (22, 30 e 38 °C). Condições: tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,4.....	147
Figura 27. Energia fitScore do processo de interação entre as bases de <i>Schiff</i> (307 – 313 e 317) com a urease Jeak bean (PDB ID:4GOA).	148
Figura 28. Curva padrão de cloreto de amônio. Condições: Tampão tris 20 mM, pH 7,4, 30 °C.	149
Figura 29. Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆) do composto 1	149

Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz – DMSO-d6) do composto 1 .	150
Figura 31. Espectro de Noesy (600 MHz – DMSO-d6) do composto 1 .	150
Figura 32. Espectro de RMN ^1H (150 MHz – DMSO-d6) do composto 2 .	151
Figura 33. Espectro de RMN ^{13}C (600 MHz – DMSO-d6) do composto 2 .	151
Figura 34. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – CDCl_3) do composto 3 .	152
Figura 35. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – CDCl_3) do composto 3 .	152
Figura 36. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – Acetona-d6) do composto 4 .	153
Figura 37. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – Acetona-d6) do composto 4 .	153
Figura 38. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – Acetona-d6) do composto 5 .	154
Figura 39. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – Acetona-d6) do composto 5 .	154
Figura 40. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – Acetona-d6) do composto 6 .	155
Figura 41. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – Acetona-d6) do composto 6 .	155
Figura 42. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – Acetona-d6) do composto 7 .	156
Figura 43. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – Acetona-d6) do composto 7 .	156
Figura 44. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – DMSO-d6) do composto 8 .	157
Figura 45. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – DMSO-d6) do composto 8 .	157
Figura 46.. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – DMSO-d6) do composto 9 .	158
Figura 47. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – DMSO-d6) do composto 9 .	158
Figura 48. Espectro de RMN ^1H (400 MHz – Acetona-d6) do composto 10 .	159
Figura 49. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz – Acetona-d6) do composto 10 .	159
Figura 50. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – Acetona-d6) do composto 11 .	160
Figura 51. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – Acetona-d6) do composto 11 .	160
Figura 52. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – Acetona-d6) do composto 12 .	161
Figura 53. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – Acetona-d6) do composto 12 .	161
Figura 54. Espectro de RMN ^1H (400 MHz – Acetona-d6) do composto 13 .	162
Figura 55. Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz – Acetona-d6) do composto 13 .	162
Figura 56. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – DMSO-d6) do composto 14 .	163
Figura 57. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – DMSO-d6) do composto 14 .	163
Figura 58. Espectro de RMN ^1H (400 MHz – Acetona-d6) do composto 15 .	164
Figura 59. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz – Acetona-d6) do composto 15 .	164
Figura 60. Espectro de RMN ^1H (400 MHz – Acetona-d6) do composto 16 .	165
Figura 61. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – Acetona-d6) do composto 16 .	165
Figura 62. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – Acetona-d6) do composto 17 .	166
Figura 63. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – Acetona-d6) do composto 17 .	166
Figura 64. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – CDCl_3) do composto 18 .	167
Figura 65. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz – CDCl_3) do composto 18 .	167
Figura 66. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – CDCl_3) do composto 19 .	168
Figura 67. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz – CDCl_3) do composto 19 .	168
Figura 68. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – CDCl_3) do composto 20 .	169
Figura 69. Espectro de RMN ^{13}C (600 MHz – CDCl_3) do composto 20 .	169
Figura 70. Espectro de RMN ^1H (400 MHz – Acetona-d6) do composto 21 .	170
Figura 71. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – Acetona-d6) do composto 21 .	170
Figura 72. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – Acetona-d6) do composto 22 .	171
Figura 73. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – Acetona-d6) do composto 22 .	171

Figura 74. Espectro de FTIR-ATR do composto 1	172
Figura 75. Espectro de FTIR-ATR do composto 2	172
Figura 76. Espectro de FTIR-ATR do composto 3	173
Figura 77. Espectro de FTIR-ATR do composto 18	173
Figura 78. Espectro de FTIR-ATR do composto 19	174
Figura 79. Espectro de FTIR-ATR do composto 20	174
Figura 80. Espectro de FTIR-ATR do composto 21	175
Figura 81. Espectro de FTIR-ATR do composto 22	175
Figura 82. Curvas analíticas dos compostos 1 – 22 e BZF-3 para posterior determinação do FPS-UVB.....	176

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reações que expressam o mecanismo de transferência de átomos de hidrogênio (HAT), transferência sequencial de elétrons com perda de prótons (SPLET) e de transferência de elétrons seguida de transferência de prótons (SET-PT) do antioxidante para a espécie reativa.	26
Esquema 2. Hidrólise da ureia na presença da enzima urease.	32
Esquema 3. Reações que expressam o processo catalítico da tirosinase.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos bioativos de origem natural e sintética que possuem propriedades antioxidantes e suas respectivas aplicações.....	23
Tabela 2. Métodos utilizados para a determinação da capacidade antioxidante.	28
Tabela 3. Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação nos comprimentos de ondas da região UVB.....	56
Tabela 4. Capacidade antioxidante dos derivados aminoguanidicos e dos padrões, medidas pelos métodos DPPH [•] , ABTS ^{•+} e FRAP.....	71
Tabela 5. Perfil antiproliferativo dos compostos AGH-1 - AGH-4 e da doxorubicina (controle positivo).	75
Tabela 6. Parâmetros de interação com ctDNA para alguns compostos semelhantes às AGH's avaliadas.....	79
Tabela 7. Valores das constantes de Stern-Volmer (K_{SV}), constante de ligação (K_b), número de sítios (n) e probabilidade intercalativa do modo de interação entre o AGH-3 e o ctDNA (ou sonda-ctDNA) para 25°C.....	84
Tabela 8. Concentração dos compostos e padrões capaz de inibir 50% a atividade enzimática da urease <i>C. ensiformis</i> (IC_{50}). Condições: Tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 30 °C.	99
Tabela 9. Parâmetros de cinéticos para o 312-urease. Condições: Condição: Tampão fosfato de sódio, 20 mM, pH 7.4.....	101
Tabela 10. Parâmetro de ligação e termodinâmicos do 312 e a urease jeak beans (<i>Canavalia ensiformis</i>). Condições: Tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, 22 - 38°C.	103
Tabela 11. Propriedades ADMET in silico avaliadas para as bases de Schiff híbridas com pirazois e derivadas de tiossemicarbazonas.....	106
Tabela 12. Valores médios de inibição de ureases do solo na presença do 312 e do NBPT. Condições: Tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, 30°C.....	109
Tabela 13. Dados de inibição da enzima tirosinase para os derivados iminicos, aminicos e híbridos lipoicos sintetizados e do padrão. Condições: tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,8 30 °C.....	124
Tabela 14. Parâmetros de cinéticos para os compostos 2 , 6 , 10 a 13 , 21 e 22 com a tirosinase. Condições: Condição: Tampão fosfato de potássio, 50 mM, pH 6,8.....	127
Tabela 15. Valores de Fator de Proteção Solar UVB (FPS-UVB) in vitro dos compostos 1 – 22 e do BZF-3 nas concentrações de 100 µM.	129
Tabela 16. Capacidade antioxidante das bases de Schiff, os derivados amínicos, dos híbridos lipoicos e dos padrões, medidas pelos métodos DPPH [•] , ABTS ^{•+} , complexação de Fe (II), FRAP e CUPRAC.	131
Tabela 17. Parâmetros físico-químicas, de toxicidade, permeabilidade cutânea e bioatividade dos compostos 1 – 22 e dos padrões.	136
Tabela 18. Características físico-químicas para as amostras de solos S1, S2, S3, S4.	148
Tabela 19. Parâmetros avaliados para os compostos e padrões avaliados frente ao método CUPRAC.	177

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
ADMET	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BE	Brometo de etídio
C _{AO}	Capacidade antioxidante
ctDNA	DNA <i>Calf Thymus</i>
CUPRAC	Capacidade antioxidante de redução de cobre
DCC	Dicicloexilcarboxiimida
DCM	Diclorometano
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	Radical 2,2-difenil-2-picrilidrazila
ET	Transferência de elétrons
F	Fluorescência
FDA	Food and Drug Administration
FPS	Fator de proteção solar
FPS-UVB	Fator de Proteção Solar na região do ultravioleta B (290-320 nm)
FRAP	Potencial de redução de íons Fe(III)
FTIR-ATR	Infravermelho com transformada de Fourier acoplado a reflexão total atenuada
GI ₅₀	Concentração mínima do fármaco capaz de gerar 50% de inibição do crescimento
HAT	Transferência de átomos de hidrogênio
HO	Hoechst
IC ₅₀	Concentração mínima do fármaco/composto capaz de gerar 50% de inibição da espécie em estudo.
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
K _b	Constante de ligação
K _{SV}	Constante de Stern Volmer
LC ₅₀	Concentração para levar a letalidade de 50% organismos.
Noesy	Efeito espectroscópico nuclear <i>Overhauser</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
Ppm	Partes por milhão
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RS	Espécies reativas
RUV	Radiação ultravioleta
SET	Transferência de um único elétron
TPTZ	2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina
TE	Equivalentes de Trolox
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
Vis	Visível

SUMÁRIO

1. Introdução	20
1.1. Bases de <i>Schiff</i> : estrutura e potencialidades	20
1.2 Antioxidantes, métodos de determinação e mecanismos	22
1.3. DNA, interação e implicações em processos antineoplásicos	29
1.4. Enzimas, mercado e implicações biotecnológicas.....	30
1.4.1. Urease	31
1.4.2. Tirosinase	33
1.5. Justificativa.....	35
2. Objetivo Geral	36
2.1. Objetivos Específicos	36
2.1.1. Seção 1- Derivados Aminoguanidina hidrazonas: estudos do perfil antioxidante, antineoplásico e interação com ctDNA	36
2.1.2. Seção 2- Estudos biofísicos de interação e inibição da urease utilizando bases de <i>Schiff</i> derivadas de tiossemicarbazonas híbridas com pirazóis	36
2.1.3. Seção 3 - Síntese e aplicação de análogos ao resveratrol e híbridos com o ácido lipoico baseados na estrutura de iminas e aminas	37
3. Referências	38
4. Experimental.....	45
4.1 Materiais e soluções.....	45
4.2 Equipamentos	47
4.3 Síntese e caracterização	47
4.3.1 Procedimento de síntese das bases de Schiff derivadas do resveratrol 1 - 17	47
4.3.2 Procedimento de síntese das aminas 18 – 19.....	52
4.3.3. Procedimento de síntese do intermediário híbrido lipoico 20	53
4.3.4. Procedimento de síntese dos híbridos lipoicos com bases de <i>Schiff</i> 21-22	54
4.4 Fator de Proteção Solar UVB <i>in vitro</i>	55
4.5. Determinação da capacidade antioxidante	56
4.5.1. Ensaio de sequestro do radical DPPH•	56
4.5.2. Ensaio de sequestro do radical ABTS• ⁺	56
4.5.3. Ensaio de redução de Fe (III) (FRAP) método 1.....	57
4.5.4 Ensaio de redução de Ferro (III) (FRAP) método 2	57
4.5.5 Ensaio de complexação de Ferro (II).....	57
4.5.6. Ensaio de redução de Cobre (II) – CUPRAC	58
4.5.7. Sequestro de óxido nítrico (•NO)	58
4.6. Procedimentos para estudos envolvendo a urease	58

4.6.1. Cinética clássica e inibição <i>in vitro</i>	58
4.6.2. Avaliação da interação urease-ligante usando UV-vis	59
4.6.3. Avaliação da inibição de ureases do solo	59
4.6.4. Avaliação da inibição de ureases em urina.....	60
4.7. Procedimentos para estudos envolvendo a Tirosinase (<i>mushroom</i>).....	60
4.7.1. Inibição <i>in vitro</i> da Tirosinase	60
4.7.2. Estudos cinéticos de inibição da tirosinase.....	61
4.8. Estudos teóricos.....	61
4.8.1. Determinação das propriedades ADME <i>in silico</i>	61
4.8.2. Preparação dos ligantes para realização do <i>docking</i> molecular.....	61
4.8.3. <i>Docking</i> molecular Aminoguanidina hidrazona	61
4.8.4. <i>Docking</i> molecular das bases de <i>Schiff</i> híbridadas com pirazóis e derivadas de tiossemicarbazonas	62
4.8.5. <i>Docking</i> molecular das bases de <i>Schiff</i> derivadas do resveratrol	62
4.9. Análise estatística	63
5. Referências	64
5. Seção 1- Derivados Aminoguanidina hidrazonas: estudos do perfil antioxidante, antineoplásico e interação com ctDNA	67
5. 1. Introdução.....	67
5. 3. Resultados e Discussão.....	70
5.3.1. Geral	70
5.3.2. Atividade antioxidante.....	70
5.3.3. Atividade antiproliferativa.....	73
5.3.4. Interação do AGH-3 com ctDNA.....	76
5.3.4.1. Estudos por UV-vis	76
5.3.4.2. Avaliação da interação de ctDNA-AGH-3 por fluorescência molecular	77
5.3.4.3. Estudos de competição por fluorescência.....	81
5.3.4.4. Estudos de desnaturação térmica do DNA	85
5.3.4.5. Estudos de <i>Docking</i> molecular	86
5.4. Conclusão	87
6. Referências	88
7. Seção 2- Estudos biofísicos de interação e inibição da urease utilizando bases de <i>Schiff</i> derivadas de tiossemicarbazonas híbridadas com pirazóis.....	95
7.1. Introdução.....	95
7.3. Resultados e discussão.....	97
7.2.1. Inibição <i>in vitro</i> da urease	97

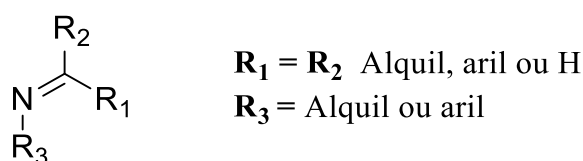
7.2.2. Mecanismo de inibição	99
7.3. Estudos biofísicos de interação	101
7.3.1. Avaliação do processo de interação via UV-vis.....	101
7.3.2. Avaliação da interação 312 no sitio ativo da urease.....	103
7.4. Estudos <i>in sílico</i>	104
7.4.2. <i>Docking</i> molecular.....	107
7.5. Inibição da urease em amostras de solo.....	108
7.6. Inibição de ureases em urina	109
8. Conclusão	113
9. Referências	114
10. Seção 3 - Síntese e aplicação de análogos ao resveratrol e híbridos com o ácido lipoico baseados na estrutura de iminas e aminas	119
10.1. Introdução.....	119
10.3. Resultados e discussão.....	121
10.3.1. Síntese e Caracterização	121
10.4. Ensaios de inibição <i>in vitro</i> da tirosinase (<i>mushroom</i>).....	123
10.4.1. <i>Screening</i> e IC ₅₀	123
10.4.2. Mecanismo de inibição.....	125
10.5. Atividade fotoprotetora UVB <i>in vitro</i>	129
10.6. Capacidade antioxidante.....	130
10.7. Estudos <i>in sílico</i>	135
10.7.1. Propriedades ADMET	135
10.7.2. <i>Redocking</i> molecular	138
10.7.3. <i>Docking</i> molecular.....	138
11. Conclusão	140
12. Perspectivas	140
13. Referências	141
14. Conclusão Geral	145
Anexos – Seção 4	147

1. Introdução

1.1. Bases de Schiff: estrutura e potencialidades

Descritas inicialmente pelo químico alemão Hugo Schiff em 1864, as bases de Schiff, também chamadas de iminas, são formadas por um carbono ligado por meio de uma dupla ligação ao nitrogênio (C=N). Esses compostos possuem fórmula geral $R_1R_2C=N-R_3$ (**Figura 1**), R_1 e R_2 podem ser um alquil, aril ou hidrogênio e o R_3 pode ser um grupo aril ou alquil (Khan *et al.*, 2023; Pervaiz *et al.*, 2024).

Figura 1. Estrutura básica das iminas (Bases de Schiff).



Fonte: Adaptado de (Khan *et al.*, 2023)

Esses compostos ganharam notoriedade devido à sua fácil preparação a partir de aldeídos/cetonas e aminas primárias de baixo custo e disponíveis comercialmente. As iminas formadas a partir de amoníaco não são estáveis e as formadas a partir de aminas, são mais estáveis, especialmente quando o átomo de nitrogênio tem um anel aromático como substituinte. Quando a base de Schiff é formada a partir de uma molécula aromática como a anilina, o composto resultante também é conhecido como anil (Moldoveanu, 2010). Nessa linha, também conhecida como azometina, a ligação C=N, se constitui como um dos grupos funcionais mais significativos para aplicações de moléculas orgânicas. Essa ligação possibilita o acesso rápido a extensas bibliotecas de híbridos moleculares estruturalmente diversos, que apresentam propriedades biológicas notáveis, tais como atividade antifúngica, antibacteriana, antimalárica, anti-inflamatória, antiviral, antioxidante e inibitório *in vitro* de células tumorais (DA Silva *et al.*, 2011; Da Silva *et al.*, 2017).

A presença do carbono eletrofílico e do nitrogênio nucleofílico na ligação -C=N- proporciona às bases de Schiff a capacidade de interagir com diversas espécies biológicas nucleofílicas e eletrofílicas, o que pode resultar na inibição de enzimas ou no comprometimento da replicação do DNA (Goudarzi *et al.*, 2023; Da Silva *et al.*, 2011). Dessa forma, as bases de Schiff mostram-se promissoras como compostos líderes para o desenvolvimento racional de novas pequenas moléculas citotóxicas e citostáticas, apresentando um mecanismo de ação que pode diferir daquele observado em agentes anticancerígenos clinicamente aprovados (Hameed *et al.*, 2016; Da Silva *et al.*, 2011;

Sztanke et al., 2013). Também foi sugerido que devido ao grupo reativo azometina, as bases de *Schiff* poderiam ser seletivamente hidrolisadas pelas células tumorais, alguns de seus resíduos serviriam como agentes alquilantes, enquanto as aminas livres atuariam simultaneamente como antimetabólitos (Billman e Schmidgall, 1970). Além disso, alguns estudos indicaram que as bases de *Schiff*, assim como seus complexos metálicos correspondentes, podem interagir diretamente com o DNA por meio de ligações não covalente (Elmali, 2022; Jagadesh Babu et al., 2023; Jagadesh Babu, Ayodhya e Shivaraj, 2023; Rambabu et al., 2016). Por outro lado, as bases de *Schiff* hidroxiladas também demonstraram eficácia como agentes antioxidantes (Polonini et al., 2013; Saranya et al., 2023; Yapar et al., 2022), bem como inibidores enzimáticos (Cui et al., 2012; Hamad et al., 2020; Jagadesh Babu, Ayodhya e Shivaraj, 2023; Mermer e Demirci, 2023; Zhang et al., 2024)

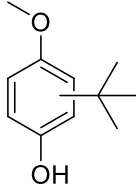
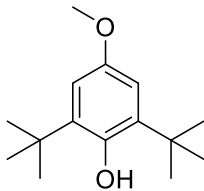
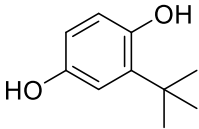
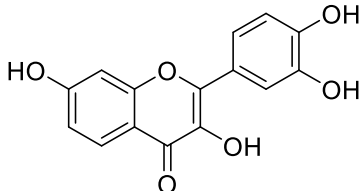
Nesse âmbito, vale destacar as hidrazonas, uma categoria de híbridos moleculares, em alguns casos, derivados de bases de *Schiff*, que se destacam pela presença da ligação azometina em sua estrutura. Para esses compostos, essa ligação é responsável por induzir um tautomerismo azo-hidrazo ($\text{H}_3\text{C}-\text{N}=\text{N}-\text{R} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{C}=\text{N}-\text{NH}-\text{R}$) quando em solução (Lima et al., 2023; Wang et al., 2024). Em virtude do equilíbrio com seu tautômero azo, as hidrazonas apresentam uma ampla variedade de aplicações, sendo frequentemente empregadas como agentes anticancerígenos (Abdalla et al., 2023; El-Lateef et al., 2023; Şenkardeş et al., 2024), anti-leishmanicida (Aquino, de et al., 2021; Romero et al., 2017; Upegui Zapata et al., 2020), antioxidante (Adjissi et al., 2022; Aslanhan et al., 2023) entre diversas outras.

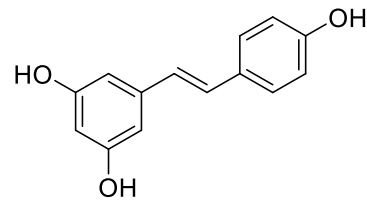
Diante das versatilidades das bases de *Schiff* e seus híbridos moleculares, pode-se notar implicações biotecnológicas significativas, as quais podem incluir: desenvolvimento de agentes terapêuticos, antioxidantes e agentes de proteção celular, marcadores em diagnóstico médico, veículos de liberação controlada, sensores e biossensores, engenharia de proteínas e enzimas entre outras. Em resumo, as bases de *Schiff* oferecem uma ampla gama de possibilidades em setores biotecnológicos, abrindo caminho para aplicações inovadoras em áreas da saúde, da medicina, na agricultura entre diversos outros campos relacionados. Nesse contexto, dada tantas potencialidades para os compostos que apresentam a função azometina, torna-se essencial explorar compostos que contenham essas ligações para o desenvolvimento de novas substâncias bioativas, tais como: agentes antioxidantes, anticancerígenos, inibidores enzimáticos, entre diversas outras possibilidades.

1.2 Antioxidantes, métodos de determinação e mecanismos

Antioxidantes são moléculas que quando presentes em pequenas concentrações inibem ou impedem a oxidação de outras moléculas, como lipídios, carboidratos, proteínas, DNA e outros substratos oxidáveis *in vitro* e *in vivo* (Gulcin, 2020). Compostos antioxidantes podem retardar o processo de peroxidação lipídica, a partir da eliminação de radicais, mitigando esse processo que é uma das principais razões para a deterioração de alimentos e produtos farmacêuticos durante processamento e armazenamento (Barbosa-Pereira *et al.*, 2013; Gulcin, 2020). No corpo humano, os antioxidantes protegem o organismo dos efeitos deletérios de radicais livres e de outras espécies reativas (RS). Além disso, essas substâncias retardam o progresso de muitas doenças crônicas, bem como, a peroxidação lipídica, processo responsável pela destruição de diversos ácidos graxos, bem como, pela perda das trocas metabólicas e, em última condição, à morte celular (Lv *et al.*, 2022). Neste sentido, nos últimos anos, vem aumentando o interesse em identificar novos compostos antioxidantes que possam ser explorados nos problemas supracitados. Dos antioxidantes reportados na literatura, dois se destacam, os de origem sintética e os de origem naturais, sendo esses últimos, em muitos casos, utilizados como modelos para a síntese de compostos com atividades antioxidantes aprimoradas e outras propriedades químicas e físicas de interesse. Como exemplos de antioxidantes sintéticos têm-se o BHT (hidroxitolueno butilado), BHA (hidroxianisol butilado), TBHQ (terc-butilhidroquinona) entre outros, sendo esses muito utilizados como aditivos de alimentos, polímeros e óleos, bem como padrões em estudos antioxidantes. Por outro lado, para antioxidantes naturais há uma vasta gama, incluindo apigenina, curcumina, resveratrol entre outros, em sua maioria provindos de frutas e vegetais (Yehye *et al.*, 2015). A **Tabela 1** sumariza alguns dos diversos compostos antioxidantes que estão disponíveis no mercado.

Tabela 1. Compostos bioativos de origem natural e sintética que possuem propriedades antioxidantes e suas respectivas aplicações.

Composto	Classe Química	Mecanismo de ação	Origem	Aplicação	Referência
 BHA	Fenólico	-	Sintética	Antioxidante em comidas, atividade antimicrobiana	(Carocho e Ferreira, 2013; Yehye <i>et al.</i> , 2015)
 BHT	Fenólico	-	Sintética	Antioxidante em comidas	(Carocho e Ferreira, 2013; Yehye <i>et al.</i> , 2015)
 TBHQ	Fenólico	-	Sintética	Antioxidante em comidas, embalagens	(Carocho e Ferreira, 2013; Yehye <i>et al.</i> , 2015)
 Quercetina	Flavonóide	Bloqueio dos PI3K/AKT	Natural	Atividade antioxidante e efeitos hepatoprotetivos	(Liu <i>et al.</i> , 2020)

**Resveratrol**

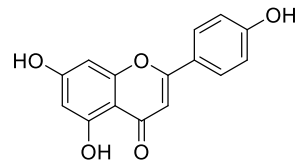
Estilbeno

Inibição do ativador do apoptose p53, inibição de sinais de sobrevivência celular.

Natural

Atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena entre outras

(Farkhondeh *et al.*, 2020)

**Apigenina**

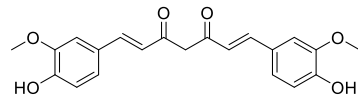
Flavonóide

Inibição da COX-2 em processos inflamatórios

Natural

Atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica, entre outras

(Wang *et al.*, 2014)

**Curcumina**

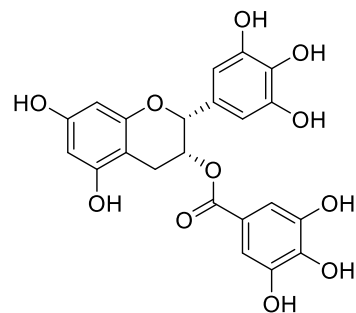
Curcuminóide

Iniciação da apoptose, obstrução do NF- κ B, instigação desregulamentação de citocinas pró-inflamatórias (IL-8, IL-6 e TNF α)

Natural

Atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena, antiangiogênica

(Belenahalli Shekarappa *et al.*, 2019)

**Epigallocatequina - 3 - galato**

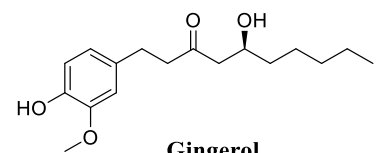
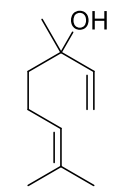
Catequina

Resistência a drogas com reversão antioxidants

Natural

Atividade antioxidante, anticancerígena, protetor de DNA efeito neuroprotetor, Anti-HIV

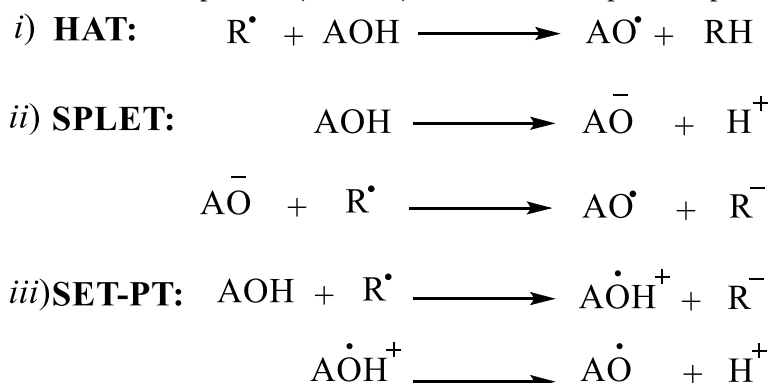
(Zhang *et al.*, 2019)

 Gingerol	Guaiacol	Inibição do caminha da NF-κB	Natural	Propriedades antioxidantes e antiinflamatórias	(Hu <i>et al.</i> , 2019)
 Linalol	Monoterpeno	Inibição da cadeia respiratória da enzima desidrogenase	Natural	Atividade antioxidante, antiproliferativa, citotóxica antibactericida, inseticida entre outras	(Fahmi <i>et al.</i> , 2019)

Fonte: Autor, 2024.

Os antioxidantes podem retardar ou inibir o processo de oxidação por um ou mais mecanismos, no geral essas espécies podem ser classificadas como primários ou secundários. O grupo dos antioxidantes primários podem atuar por três mecanismos: *i*) transferência de átomos de hidrogênio (HAT), *ii*) transferência sequencial de elétrons com perda de prótons (SPLET) e, *iii*) transferência de elétrons seguida de transferência de prótons (SET-PT) (Gulcin, 2020; Kitouni *et al.*, 2023) (**Esquema 1**). Os antioxidantes secundários por sua vez atuam frente ao processo de auto-oxidação, um processo que ocorre quando certas moléculas, como lipídios e proteínas, reagem com algumas espécies ou substâncias e formam radicais livres. Os antioxidantes secundários podem expressar atividade a partir de cinco mecanismos, a saber: *i*) a partir da iniciação da peroxidação, *ii*) quelação de íons metálicos, *iii*) desativação do ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), prevenindo a formação de peróxidos, *iv*) desativando a reação auto-oxidativa em cadeia e/ou *v*) reduzindo as concentrações de O_2 (Brewer, 2011; Yehye *et al.*, 2015).

Esquema 1. Reações que expressam o mecanismo de transferência de átomos de hidrogênio (HAT), transferência sequencial de elétrons com perda de prótons (SPLET) e de transferência de elétrons seguida de transferência de prótons (SET-PT) do antioxidante para a espécie reativa.



Fonte: Adaptado de (Gulcin, 2020; Kitouni *et al.*, 2023).

Diversos métodos são usados para avaliar as atividades antioxidantes de compostos naturais e sintéticos, em alimentos ou sistemas biológicos (Alam, Bristi e Rafiquzzaman, 2013). De forma geral, as metodologias se baseiam na capacidade de sequestro de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) específicos, na habilidade de sequestrar radicais não biológicos e na capacidade redutora da amostra frente a agentes oxidantes (Magalhães *et al.*, 2008). Dependendo das reações envolvidas, os ensaios para determinar a capacidade antioxidante podem ser classificados em dois tipos: ensaios baseados em reações HAT ou ET (transferência de elétrons)

(Gulcin, 2020; Oliveiraa e Santos, 2020). A **Tabela 2** sumariza as principais particularidades de alguns métodos de determinação da capacidade antioxidante.

Tabela 2. Métodos utilizados para a determinação da capacidade antioxidante.

Método	Espécie reativa determinada	Técnica	Mecanismo	Vantagens e desvantagens
DPPH•	DPPH• (RNS)	UV-vis $\lambda_{\text{abs}} = 515 \text{ nm}$	ET/HAT	Rápido, simples e de instrumentação disponível a grande parte dos laboratórios. O DPPH é comercial. Compostos que absorvem na mesma região são difíceis de avaliar pelo método (ex.: carotenoides). Antioxidantes volumosos reagem lentamente, ou sequer reagem com o radical, devido ao impedimento estérico
TEAC	ABTS• ⁺⁺ (RNS)	UV-vis $\lambda_{\text{abs}} = 735 \text{ nm}$	ET/HAT	Reage com diversos compostos antioxidantes (30 min) e pode ser utilizado em uma ampla faixa de pH. Amostras complexas comprometem o ponto final. Oxidação prévia durante 16 h para formar a espécie radicalar.
FRAP (azul da prússia)	-	UV-vis $\lambda_{\text{abs}} = 700 \text{ nm}$	ET	Metodologia simples, rápida, barata e reproduzível. Empregada para avaliação da capacidade antioxidante de diversas amostras. Baseado na capacidade de redução de íons Fe(III), entretanto, as condições experimentais do sistema (pH, força iônica, complexo de Fe(II) não simulam as condições fisiológicas.
FRAP (Fe-TPTZ)	-	UV-vis $\lambda_{\text{abs}} = 596 \text{ nm}$	ET	Rápido, simples, robusto, de baixo custo. Pode ser automatizado ou manual. No entanto, o ponto final da reação entre o complexo de ferro com alguns compostos polifenólicos pode durar horas para ser atingido, comprometendo a aplicação do método. Além disso, compostos tiólicos como a glutatona tendem a não reduzir o complexo formado.
CUPRAC	-	UV-vis $\lambda_{\text{abs}} = 450 \text{ nm}$	ET	Esse método pode ser utilizado para determinar a capacidade antioxidante em todas as classes de compostos, incluindo tióis. A cinética é rápida, entretanto, antioxidantes volumosos e amostras complexas reagem lentamente (30-60 min) com o complexo de cobre.

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; TEAC: Capacidade antioxidante medida em equivalente Trolox; FRAP: Capacidade antioxidante redutor férrico; CUPRAC: Capacidade antioxidante de redução de ion cobre; RNS: Espécie reativa de nitrogênio; UV-vis: Ultravioleta-visível; HAT: Transferência de átomos de hidrogênio; ET: Transferência de elétrons;

Fonte: Adaptado de Oliveira, (2021).

Considerando todas as informações apresentadas, os avanços na biologia do câncer indicam que os radicais livres desempenham duas funções cruciais em relação a essa condição neoplásica. Por um lado, podem agir promovendo a apoptose das células cancerígenas e estimular a resposta imunológica, enquanto, por outro lado, também têm a capacidade de induzir a imunossupressão no microambiente tumoral, chegando a desencadear o processo de carcinogênese (Zhang *et al.*, 2021), sendo necessário um controle a partir do uso de substâncias antioxidantes.

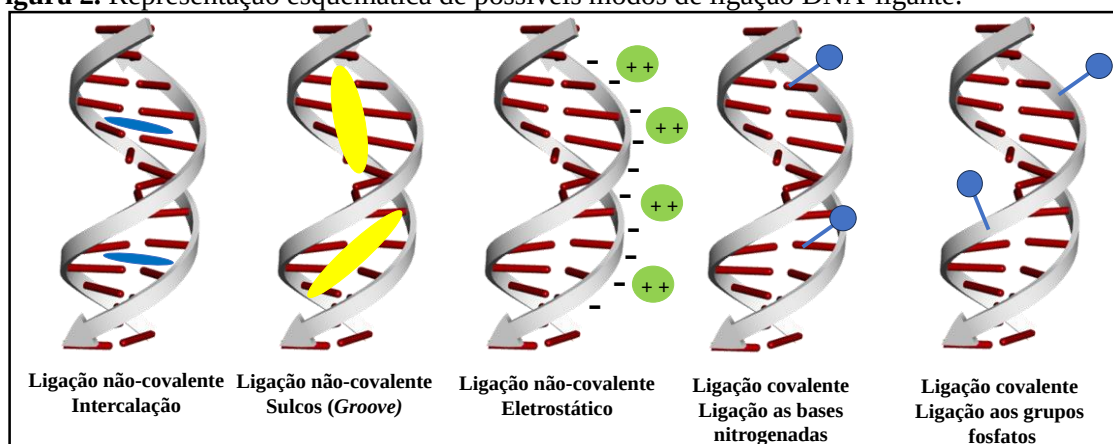
1.3. DNA, interação e implicações em processos antineoplásicos

Tendo em vista que muitos agentes anticancerígenos manifestam suas atividades por meio de interações com macromoléculas biológicas, como o ácido desoxirribonucleico (DNA) (Bergamo, Dyson e Sava, 2018; E. Graves e M. Velea, 2000), compreender esse processo torna-se de extrema importância para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

O DNA desempenha um papel de suma importância em processos biológicos, sendo esse o repositório da informação genética, em que sua integridade e estabilidade é essencial à vida. Sujeito a diversos ataques provenientes do meio ambiente, qualquer dano resultante a essa macromolécula, se não for reparado, desencadeará mutações e possivelmente doenças como câncer (Da Silva *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2016; Yehye *et al.*, 2015). Assim, por estar envolvido nos processos de expressão gênica, a avaliação de processos de interação dessa macromolécula com compostos orgânicos ou inorgânicos tem sido utilizada como uma abordagem terapêutica de diversas moléculas com atividades biológicas importantes, como antibióticos, drogas anti-inflamatórias, antivirais e anticancerígenas (Andrezálová e Országhová, 2021; Bischoff e Hoffmann, 2002).

As ligações entre o DNA e compostos orgânicos ou inorgânicos podem ocorrer de duas maneiras: *i)* a partir do modo de ligação reversível e, *ii)* irreversível. Também denominada de ligação não covalente, os modos de ligações reversíveis podem ocorrer por meio de três interações possíveis: interações eletrostáticas, as interações nos sulcos (*groove*) do DNA, ou por meio da intercalação nos pares de base da macromolécula (Barra e Netto, 2015; Oguzcan *et al.*, 2022; Rehman *et al.*, 2015). Quanto ao modo de ligação irreversível, também denominado de ligação covalente, esse ocorre por meio da ligação direta ligante-DNA por suas bases nitrogenadas ou pelo grupo fosfato (**Figura 2**).

Figura 2. Representação esquemática de possíveis modos de ligação DNA-ligante.



Fonte: Adaptado de Barros e Netto, 2015.

As interações que surgem a partir de ligações covalentes são caracterizadas por uma elevada energia, resultando em uma forma de ligação irreversível entre o complexo ligante-receptor. Essa característica torna rara a dissociação do complexo, proporcionando a formação de espécies que atuam impedindo a replicação celular (Barone *et al.*, 2013). O complexo formado via modo de ligação não covalente, por outro lado, é desfeito com uma maior facilidade e a espécie ou molécula alvo ao interagir com o DNA pode alterar a conformação, provocar tensão torsional e interromper/inibir o processo de interação DNA-proteína nos processos biológicos (Muhamadejevs *et al.*, 2021).

Desta forma, os estudos de interação DNA-ligante são de suma importância para a compreensão dos mecanismos de interações e, também para o provimento de informações que venham a contribuir para o desenvolvimento de novos compostos quimioterápicos, controle da expressão gênica e no planejamento de novos fármacos para esta finalidade ou diversas outras (Braga *et al.*, 2022; Da Silva, *et al.*, 2018; Khajeh *et al.*, 2018).

Nesse contexto, devido à significativa influência que exercem em várias áreas, outra categoria de macromoléculas que está recebendo considerável atenção em pesquisas são as enzimas.

1.4. Enzimas, mercado e implicações biotecnológicas

As enzimas são biomoléculas, em muitos casos proteínas, contituídas por aminoácidos ligados entre si em uma ou mais cadeias polipeptídicas e desempenham uma função fundamental no desenvolvimento e na manutenção da vida. A função primordial das enzimas é agir como catalisadores biológicos, acelerando as taxas de reações

químicas, tornando-as suficientemente rápidas (Cutlan *et al.*, 2020; Robinson, 2015). Partindo dessas informações, a indústria explora o uso de proteínas em diversos setores.

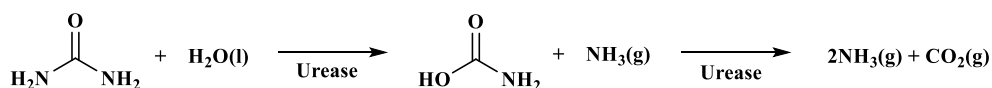
As enzimas desempenham um papel fundamental em diversas esferas, abrangendo tanto a indústria quanto a população em geral. Este setor experimenta um crescimento contínuo, com um mercado global avaliado em 5,8 bilhões de dólares em 2021 e uma projeção de alcançar 10,2 bilhões de dólares até 2031 (Sajeev, 2022). Esse crescimento é impulsionado por diversas tendências, como a crise derivada da pandemia do COVID-19, o aumento e envelhecimento da população global, a redução das áreas agricultáveis, o processo de urbanização e a expansão de mercados consumidores emergentes, entre outros fatores. Como resultado, a utilização de enzimas em setores como produção de alimentos, bebidas, nutracêuticos, medicamentos, diagnóstico de doenças, nutrição animal, biocombustíveis, detergentes e outros produtos está destinada a experimentar um aumento significativo (Azeem *et al.*, 2014). Entretanto, é crucial que esses avanços sejam alcançados seguindo princípios que promovam uma sociedade equilibrada e saudável, conforme preconizado pela ONU e seus países membros em 2015 através dos 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS). Isso implica considerar a redução das emissões de dióxido de carbono (CO_2), a preservação da qualidade da água e o aprimoramento da eficiência na produção de alimentos, entre outros objetivos (Organização das Nações Unidas (ONU) Brasil, 2015).

Como visto, as enzimas são utilizadas para acelerar reações em diversos setores industriais, gerando várias vantagens para a sociedade, entretanto, a função essencial das enzimas também pode resultar em alguns danos. Nesse contexto, destacam-se a urease e a tirosinase, enzimas associadas a questões que têm despertado o interesse de muitos pesquisadores.

1.4.1. Urease

A urease (EC 3.3.1.5), uma metaloenzima da classe das amidohidrolases que possui dois átomos de níquel em seu sítio ativo. Amplamente sintetizada por plantas, fungos e bactérias, essa enzima desempenha um papel crucial. Sua principal função consiste na catálise da hidrólise da ureia (NH_2CONH_2) para formar amônia (NH_3) e dióxido de carbono (CO_2) (**esquema 2**) aumentando a velocidade de hidrólise de 10^{14} a 10^{17} vezes em comparação a reação não catalisada (Kappaun *et al.*, 2018; Tavares *et al.*, 2021, 2022).

Esquema 2. Hidrólise da ureia na presença da enzima urease.



Fonte: Adaptado de (Ciurli et al., 1999; Svane et al., 2020).

Uma reação química aparentemente simples, porém, com efeitos significativos em diversos setores da sociedade, abrangendo desde o agrícola até o clínico e econômico. Essa reação, considerada uma resposta natural à presença de ureia, destaca-se pela ação de enzimas ureolíticas. A velocidade da hidrólise do substrato está diretamente relacionada à perda de nitrogênio por volatilização no solo, contribuindo para o aumento do pH em sistemas *in vivo* devido à presença de amônia. Esse fenômeno, por sua vez, desempenha um papel crucial na saúde humana e animal, tornando-se um fator de influência significativo (Kappaun *et al.*, 2018; Tavares *et al.*, 2022).

Empregada mundialmente como fertilizante para o solo, a ureia representa uma fonte significativa de nitrogênio para as plantas. No entanto, a presença de urease no ambiente contribui para uma diminuição na eficácia da fertilização com esse composto nitrogenado, resultando na perda de amônia para a atmosfera por meio de volatilização (Song *et al.*, 2022; Tavares *et al.*, 2021, 2022, 2023).

Não tão distante, a patogenia de diversas condições clínicas em humanos ou animais está, em grande parte, associada à ação de enzimas ureolíticas produzidas por fungos e bactérias. A bactéria *Proteus mirabilis*, uma espécie gram-negativa, é responsável pela formação de cálculos urinários em seres humanos. Esse processo ocorre devido à alcalinização da urina, facilitada pela presença da urease produzida por essa bactéria. O aumento do pH no trato urinário contribui para a patogênese da pielonefrite, uma inflamação renal que resulta em infecção e incrustação do cateter no sistema urinário.(Milo *et al.*, 2021; Mobley, Island e Hausinger, 1995). A bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), por sua vez, coloniza a mucosa do estômago de metade da população mundial, aumentando significativamente o risco de problemas gástricos úlceras e câncer. A urease produzida pela *H. pylori*, constitui cerca de 10% da proteína celular total, permitindo a sobrevivência bacteriana no estômago, devido a uma condição de neutralização induzida, uma vez que, a amônia gerada a partir da hidrólise da ureia, permite que esta bactéria colonize o estômago, mesmo que o meio seja ácido (Burkitt *et al.*, 2017; Fischbach e Malfertheiner, 2018; Tavares *et al.*, 2022). No que se refere a *H. pylori*, estima-se que a prevalência global de infecção por essa bactéria em humanos é de

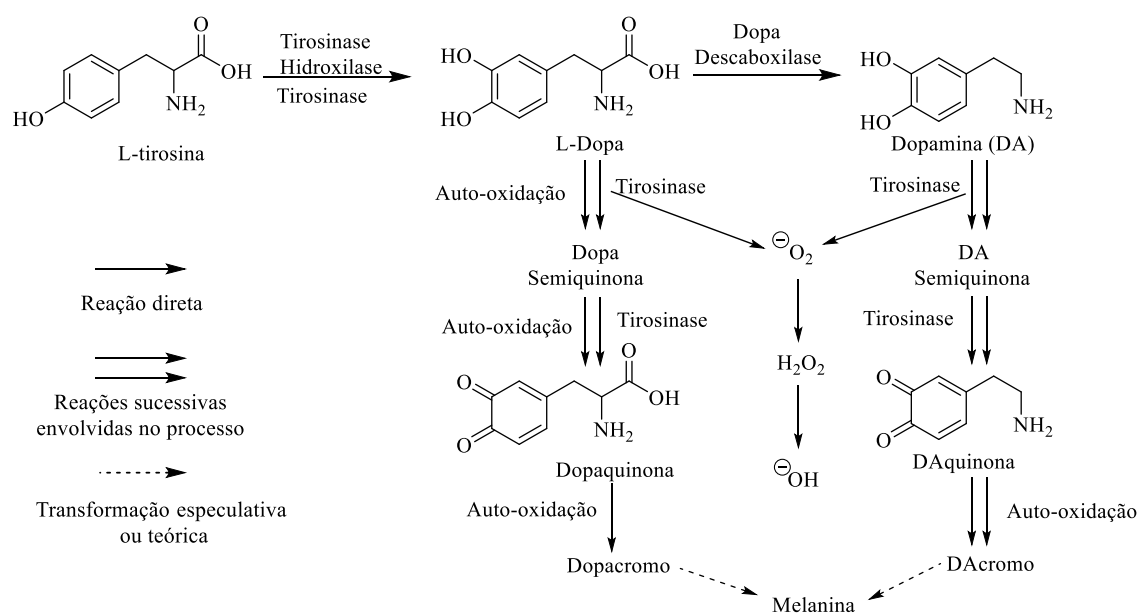
~ 50%, com grandes variações em todo o mundo devido a condições socioeconômicas e de higiene. Nos Estados Unidos e no Canadá varia de 20 a 50%, enquanto no Brasil essa infecção afeta 50 a 90% da população total (Burkitt *et al.*, 2017; Hu, Zhu e Lu, 2017; Tavares *et al.*, 2022).

1.4.2. Tirosinase

A tirosinase (EC 1.14.18.41) é uma metaloenzima da classe das oxidases que possui dois átomos de cobre em seu sítio ativo e existe amplamente em todos os tipos de organismos de plantas e mamíferos (Ma *et al.*, 2019; Nairn, Cresswell e Nairn, 2015). Essa enzima participa principalmente em duas reações, podendo catalisar a oxidação de monofenóis em *orto*-difenois e posterior oxidação em *o*-quinonas correspondentes, na presença de oxigênio molecular. Essas reações são processos chave na biossíntese da melanina, pigmento que confere a cor ao cabelo, à pele e aos olhos e que exerce uma função fundamental na proteção da pele dos mamíferos contra os raios ultravioletas (Jung Park *et al.*, 2024; Ketata *et al.*, 2019).

No processo de síntese da melanina, a tirosinase catalisa tanto a hidroxilação da tirosina para L-DOPA, quanto a subsequente oxidação da L-DOPA em dopaquinona. Além disso, sob certas circunstâncias, a tirosinase pode oxidar dopamina (DA) para formar pigmentos de melanina, provavelmente através de DA quinona (Hasegawa, 2010) (**esquema 3**). Em ambas as vias, há formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), bem como, a formação de metabólitos de alta toxicidade particular de cada via. A via que utiliza a dopamina como substrato leva à morte celular apoptótica em concomitante com o aumento da produção de DA intracelular e ROS, seguida pela formação de grânulos pigmentados mimetizando aqueles contendo neuromelanina que são vistos nas células nigrais, comuns em processos neurodegenerativos (Hasegawa, 2010). Quanto à via que utiliza a tirosina e/ou L-dopa como substratos, está associada à formação dos polímeros eumelanina e feomelanina estando esse último associado ao câncer de pele devido ao seu efeito fototóxico (Hasegawa, 2010).

Esquema 3. Reações que expressam o processo catalítico da tirosinase.



Fonte: Adaptado de Hasegawa (2010).

Neste contexto, expressões anormais de tirosinase podem desencadear diversas dermatoses humanas, incluindo albinismo, vitiligo, melasma, manchas da idade, hiperpigmentação entre outras (Dehghani *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2019). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA) e a Sociedade Brasileira de Dermatologia, a prevenção do câncer de pele e outras neoplasias desencadeadas por fatores diversos, incluindo a exposição excessiva à RUV, se dá por meio do uso adequado de agentes fotoprotetores ou filtros solares. Filtros solares são preparações cosméticas que têm em sua composição agentes fotoprotetores e esses atuam minimizando os efeitos deletérios dos raios UV por meio da absorção, reflexão ou difusão dos raios solares incidentes na pele. De um modo geral, os fotoprotetores podem ser substâncias orgânicas ou inorgânicas, em que os compostos inorgânicos agem via reflexão dos raios UV e os orgânicos por meio da absorção desses (Guaratini *et al.*, 2009). Dentre as normas que regulam a utilização de protetores solares, destaca-se a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 30 de 1º de janeiro de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012) que regulamenta de forma técnica protetores solares em cosméticos e dá outras providências, a qual institui que os protetores solares devem ter como requisito um fator de proteção solar (FPS) de no mínimo 6 (ANVISA, 2012). Já nos Estados Unidos, a Food and Drug Administration (FDA), agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos, regulamenta que para agir como um FPS-UVB, um composto deve ter um FPS de no mínimo 15 para ser utilizado em loções cosméticas (FDA, 2017).

Neste sentido, por atuarem de maneira preventiva no tecido cutâneo, os fotoprotetores minimizam a taxa excessiva de raios UV, que favorecem o desenvolvimento de ROS que são alguns dos fatores que acarretam a ruptura da cadeia do DNA e posteriormente em processos cancerígenos. Além disso, atrelados à atividade de inibição da tirosinase, compostos que apresentam tais propriedades apresentam grande relevância para as áreas da terapêutica clínica, bem como, na indústria de alimentos e cosméticos (Wang *et al.*, 2019).

Dessa forma, a compreensão e a superação de problemas principalmente os que estão associados à ação de enzimas, são essenciais para otimizar as aplicações biotecnológicas, promovendo avanços significativos na eficiência e na sustentabilidade desses processos.

1.5. Justificativa

Com base nas concepções mais recentes sobre tratamentos terapêuticos para o câncer e diante dos problemas ocasionados por algumas enzimas específicas, bem como, impulsionados pela notável versatilidade das bases de *Schiff*, as quais apresentam aplicações biotecnológicas abrangentes em setores diversos, como farmacêutico, cosmetológico, alimentício e agrícola, torna-se crucial realizar pesquisas sintéticas e moleculares para replicar as propriedades previamente mencionadas para bases de *Schiff* e seus híbridos moleculares. Além disso, é de suma importância explorar substâncias capazes de expressar essas atividades frente a múltiplos alvos, uma vez que, apesar dos avanços rápidos na descoberta de fármacos, a busca por compostos multialvos tem se destacado como uma abordagem terapêutica promissora (Yehye *et al.*, 2015; Zhang; Yang; Tang, 2006).

2. Objetivo Geral

Explorar o perfil biológico de três distintas classes de compostos derivadas de bases de *Schiff*.

2.1. Objetivos Específicos

2.1.1. Seção 1- Derivados Aminoguanidina hidrazonas: estudos do perfil antioxidante, antineoplásico e interação com ctDNA

- i) Avaliar a capacidade antioxidante dos compostos **AGH-1 – AGH-4** frente aos métodos DPPH•, ABTS•⁺, FRAP e inibição do radical NO;
- ii) Determinar o IC₅₀ de inibição dos compostos para as espécies radicalares avaliadas;
- iii) Avaliar a atividade antiproliferativa frente a diferentes linhagens celulares tumorais dos **AGH-1 – AGH-4**;
- iv) Avaliar a interação dos compostos mais promissores com ctDNA, empregando as técnicas de fluorescência molecular e UV-vis;
- v) Determinar o modo de ligação ligante-ctDNA por meio de estudos de competição com sondas;
- vi) Realizar estudo de desnaturação térmica para confirmar o modo de ligação ligante-ctDNA;
- vii) Realizar estudos de *docking* molecular para auxiliar na avaliação do modo de ligação ligante-ctDNA.

2.1.2. Seção 2- Estudos biofísicos de interação e inibição da urease utilizando bases de *Schiff* derivadas de tiossemicarbazonas híbridas com pirazóis

- i) Avaliar o potencial e mecanismo de ação das bases de *Schiff* híbridas com pirazóis e derivadas de tiossemicarbazonas frente a urease Jeak Beans;
- ii) Determinar o IC₅₀ de inibição da urease dos compostos mais ativos;
- iii) Determinar contante de ligação (K_b) do composto a enzima;
- iv) Avaliar a interação do composto mais ativo com a urease por meio de espectrometria de absorção molecular;
- v) Realizar estudos das propriedades ADMET;
- vi) Realizar estudos *docking* molecular para auxiliar na avaliação do modo de ligação ligante-urease.
- viii) Avaliar o potencial de inibição do composto mais ativo frente às ureases do solo;

viii) Avaliar o potencial de inibição do composto mais ativo frente à urease em amostras de urina.

2.1.3. Seção 3 - Síntese e aplicação de análogos ao resveratrol e híbridos com o ácido lipoico baseados na estrutura de iminas e aminas

- i)** Sintetizar e caracterizar compostos derivados das bases de *Schiff* e aminas análogas ao resveratrol e conjugadas ao ácido lipoico;
- ii)** Avaliar o potencial de inibição da tirosinase *mushroom in vitro* dos derivados sintetizados;
- iii)** Avaliar os parâmetros cinéticos K_m (Constante de Michaelis–Menten) e $V_{m\acute{a}x}$ (Valor máximo da velocidade inicial);
- iv)** Determinar o modo de inibição enzimática dos compostos;
- v)** Determinar a atividade fotoprotetora ultravioleta B (FPS-UVB) *in vitro* dos compostos sintetizados;
- vi)** Avaliar a capacidade antioxidante dos compostos sintetizados frente aos métodos DPPH $\bullet$, ABTS $\bullet^+$, FRAP, CUPRAC e Complexação de Ferro (II);
- vii)** Realizar estudos *in silico* dos compostos sintetizados.

3. Referências

- ABDALLA, E. M. *et al.* Synthesis, characterization, DNA binding, DFT, anticancer, antibacterial, and the effect of gamma irradiation of novel Co(II), Ag (I), and Cd (II) complexes with hydrazone derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 27, n. 6, p. 101770, nov. 2023.
- ADJISSI, L. *et al.* Synthesis, characterization, DFT, antioxidant, antibacterial, pharmacokinetics and inhibition of SARS-CoV-2 main protease of some heterocyclic hydrazones. **Journal of Molecular Structure**, v. 1270, p. 134005, dez. 2022.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RDC nº 30, de 1 de junho de 2012**. Disponível em < <https://cosmeticsonline.com.br/ct/painel/fotos/assets/uploads/regulatorios/bef6e-RDC-30.pdf> > acesso em 19 de dezembro de 2018.
- ALAM, MD. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, MD. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143–152, abr. 2013.
- ANDREZÁLOVÁ, L.; ORSZÁGHOVÁ, Z. Covalent and noncovalent interactions of coordination compounds with DNA: An overview. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 225, p. 111624, dez. 2021.
- AQUINO, T. M. DE *et al.* Synthesis, Antileishmanial Activity and in silico Studies of Aminoguanidine Hydrazones (AGH) and Thiosemicarbazones (TSC) Against Leishmania chagasi Amastigotes. **Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 151–169, 17 fev. 2021.
- ASLANHAN, Ö. *et al.* Design, synthesis, antioxidant and anticholinesterase activities of novel isonicotinic hydrazide-hydrazone derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 1279, p. 135037, maio 2023.
- AZEEM, B. *et al.* **Review on materials & methods to produce controlled release coated urea fertilizer** *Journal of Controlled Release* Elsevier, , 10 maio 2014.
- BARBOSA-PEREIRA, L. *et al.* Development of antioxidant active films containing tocopherols to extend the shelf life of fish. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 236–243, maio 2013.
- BARONE, G. *et al.* DNA-binding of nickel(II), copper(II) and zinc(II) complexes: Structure–affinity relationships. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, n. 19–20, p. 2848–2862, out. 2013.
- BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Antitumour Complexes and DNA Interactions and their Tools of Analysis: an Approach to Metalointercalators. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 1998–2016, 2015.
- BELENAHALLI SHEKARAPPA, S. *et al.* A systems biology approach to identify the key targets of curcumin and capsaicin that downregulate pro-inflammatory pathways in human monocytes. **Computational Biology and Chemistry**, v. 83, p. 107162, dez. 2019.

BERGAMO, A.; DYSON, P. J.; SAVA, G. The mechanism of tumour cell death by metal-based anticancer drugs is not only a matter of DNA interactions. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 360, p. 17–33, abr. 2018.

BILLMAN, J. H.; SCHMIDGALL, R. L. Preparation and Antitumor Activity of Some Schiff Bases of 2'-Amino-4', 5'-Dichlorobenzenesulfonanilide and 2'-Amino-p-Toluenesulfonanilide. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 59, n. 8, p. 1191–1194, ago. 1970.

BISCHOFF, G.; HOFFMANN, S. DNA-Binding of Drugs Used in Medicinal Therapies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 3, p. 321–348, 1 fev. 2002.

BRAGA, T. C. *et al.* Synthesis, anticancer activities and experimental-theoretical DNA interaction studies of 2-amino-4-phenyl-4H-benzo[h]chromene-3-carbonitrile. **European Journal of Medicinal Chemistry Reports**, v. 4, p. 100030, abr. 2022.

BREWER, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 221–247, jul. 2011.

BURKITT, M. D. *et al.* **Helicobacter pylori-induced gastric pathology: Insights from in vivo and ex vivo models** DMM Disease Models and Mechanisms Company of Biologists Ltd, , 1 fev. 2017.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15–25, jan. 2013.

CIURLI, S. *et al.* Structural properties of the nickel ions in urease: novel insights into the catalytic and inhibition mechanisms. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 190–192, p. 331–355, set. 1999.

CUI, Y. *et al.* Synthesis, structures and urease inhibition studies of Schiff base metal complexes derived from 3,5-dibromosalicylaldehyde. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 323–331, dez. 2012.

CUTLAN, R. *et al.* Using enzyme cascades in biocatalysis: Highlight on transaminases and carboxylic acid reductases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1868, n. 2, p. 140322, fev. 2020.

DAS, S.; SILVA, CRISTIANE J DA; *et al.* Highly functionalized piperidines: Free radical scavenging, anticancer activity, DNA interaction and correlation with biological activity. **Journal of Advanced Research**, v. 9, p. 51–61, 2018.

DAS, S.; SILVA, CRISTIANE J. DA; *et al.* Highly functionalized piperidines: Free radical scavenging, anticancer activity, DNA interaction and correlation with biological activity. **Journal of Advanced Research**, v. 9, p. 51–61, jan. 2018.

DEHGHANI, Z. *et al.* Veratric acid derivatives containing benzylidene-hydrazine moieties as promising tyrosinase inhibitors and free radical scavengers. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 12, p. 2644–2651, jun. 2019.

E. GRAVES, D.; M. VELEA, L. Intercalative Binding of Small Molecules to Nucleic Acids. **Current Organic Chemistry**, v. 4, n. 9, p. 915–929, 1 set. 2000.

EL-LATEEF, H. M. A. *et al.* Design, synthesis and tubulin polymerization inhibition activity of newly synthesized hydrazone-linked to combretastatin analogues as potential anticancer agents. **Journal of Molecular Structure**, v. 1292, p. 136190, nov. 2023.

ELMALI, F. T. Synthesis, characterization and DNA binding properties of Schiff base derivatives and Ru(II) complexes. **Journal of Molecular Structure**, v. 1261, p. 132900, ago. 2022.

FAHMI, A. *et al.* Phytochemicals, antioxidant activity and hepatoprotective effect of ginger (*Zingiber officinale*) on diethylnitrosamine toxicity in rats. **Biomarkers**, v. 24, n. 5, p. 436–447, 4 jul. 2019.

FARKHONDEH, T. *et al.* The therapeutic effect of resveratrol: Focusing on the Nrf2 signaling pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 127, p. 110234, jul. 2020.

FDA. Sunscreen: How to Help Protect Your Skin from the Sun.

FISCHBACH, W.; MALFERTHEINER, P. Helicobacter-pylori-Infektion: Indikationen zu Eradikation, Diagnostik und Therapie. **Deutsches Arzteblatt International**, v. 115, n. 25, p. 429–436, 22 jun. 2018.

GOUDARZI, A. *et al.* Unprecedented bi- and trinuclear palladium(II)-sodium complexes from a salophen-type Schiff base: Synthesis, characterization, thermal behavior, and in vitro biological activities. **Journal of Molecular Structure**, v. 1272, p. 134224, jan. 2023.

GUARATINI, T. *et al.* Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 717–721, 2009.

GULCIN, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 3, p. 651–715, 16 mar. 2020.

HAMAD, A. *et al.* Development of sulfonamide-based Schiff bases targeting urease inhibition: Synthesis, characterization, inhibitory activity assessment, molecular docking and ADME studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 102, p. 104057, set. 2020.

HAMEED, A. B. *et al.* Pregnancy-Related Cardiovascular Deaths in California. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 71, n. 2, p. 63–65, fev. 2016.

HASEGAWA, T. Tyrosinase-Expressing Neuronal Cell Line as in Vitro Model of Parkinson's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 3, p. 1082–1089, 12 mar. 2010.

HU, S. *et al.* 8-Gingerol regulates colorectal cancer cell proliferation and migration through the EGFR/STAT/ERK pathway. **International Journal of Oncology**, 3 dez. 2019.

HU, Y.; ZHU, Y.; LU, N. H. **Novel and effective therapeutic regimens for helicobacter pylori in an era of increasing antibiotic resistance** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* Frontiers Media S.A., , 5 maio 2017.

JAGADESH BABU, K. *et al.* Synthesis, anticancer, antibacterial, antifungal, DNA interactions, ADMET, molecular docking, and antioxidant evaluation of novel Schiff base and their Co(II), Ni(II) and Cu(II) complexes. **Results in Chemistry**, v. 6, p. 101121, dez. 2023.

JAGADESH BABU, K.; AYODHYA, D.; SHIVARAJ. Comprehensive investigation of Co(II), Ni(II) and Cu(II) complexes derived from a novel Schiff base: Synthesis, characterization, DNA interactions, ADME profiling, molecular docking, and in-vitro biological evaluation. **Results in Chemistry**, v. 6, p. 101110, dez. 2023.

JUNG PARK, Y. *et al.* Thiazol-4(5H)-one analogs as potent tyrosinase inhibitors: Synthesis, tyrosinase inhibition, antimelanogenic effect, antioxidant activity, and in silico docking simulation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 98, p. 117578, jan. 2024.

KAPPAUN, K. *et al.* **Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – A review** *Journal of Advanced Research* Elsevier B.V., , 1 set. 2018.

KETATA, E. *et al.* Anti-melanogenesis potential of a new series of Morita-Baylis-Hillman adducts in B16F10 melanoma cell line. **Bioorganic Chemistry**, v. 84, p. 17–23, mar. 2019.

KHAJEH, M. A. *et al.* Spectroscopic profiling and computational study of the binding of tschimgine: A natural monoterpene derivative, with calf thymus DNA. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 192, p. 384–392, mar. 2018.

KHAN, MD. A. R. *et al.* A review on synthesis, characterizations, and applications of Schiff base functionalized nanoparticles. **Results in Chemistry**, v. 6, p. 101160, dez. 2023.

KITOUNI, S. *et al.* Antioxidant activity of new synthesized imine and its corresponding α -aminophosphonic acid: Experimental and theoretical evaluation. **Journal of Molecular Structure**, v. 1281, p. 135083, jun. 2023.

LIMA, N. P. K. *et al.* AS CLÁSSICAS HIDRAZONAS COMO REVELADORES DE IMPRESSÕES DIGITAIS: UMA PROPOSTA DE QUÍMICA ORGÂNICA EXPERIMENTAL. **Química Nova**, v. 46, n. 2, p. 215–221, 2023.

LIU, F. *et al.* A new cocrystal of isoniazid-quercetin with hepatoprotective effect: The design, structure, and in vitro/in vivo performance evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 144, p. 105216, mar. 2020.

LV, R. *et al.* Advances in the activity evaluation and cellular regulation pathways of food-derived antioxidant peptides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 122, p. 171–186, abr. 2022.

MA, X. *et al.* Lucigenin fluorescent assay of tyrosinase activity and its inhibitor screening. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 280, p. 41–45, fev. 2019.

MAGALHÃES, L. M. *et al.* Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n. 1, p. 1–19, abr. 2008.

MERMER, A.; DEMIRCI, S. Recent advances in triazoles as tyrosinase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 259, p. 115655, nov. 2023.

MILO, S. *et al.* A small-molecular inhibitor against *Proteus mirabilis* urease to treat catheter-associated urinary tract infections. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

MOBLEY, H. L. T.; ISLAND, M. D.; HAUSINGER, R. P. **Molecular Biology of Microbial Ureases** MICROBIOLOGICAL REVIEWS. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/mr>>.

MOLDOVEANU, S. C. Chapter 13 Pyrolysis of Amines and Imines. *Em*: [s.l: s.n.]. p. 349–364.

MUHAMADEJEVS, R. *et al.* DNA-binding activities of compounds acting as enzyme inhibitors, ion channel blockers and receptor binders. **Chemico-Biological Interactions**, v. 348, p. 109638, out. 2021.

NAIRN, R.; CRESSWELL, W.; NAIRN, J. Mushroom tyrosinase: A model system to combine experimental investigation of enzyme-catalyzed reactions, data handling using R, and enzyme-inhibitor structural studies. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 43, n. 5, p. 370–376, 10 set. 2015.

OGUZCAN, E. *et al.* Spectroscopic and molecular modeling methods to investigate the interaction between psycho-stimulant modafinil and calf thymus DNA using ethidium bromide as a fluorescence probe. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 270, p. 120787, abr. 2022.

OLIVEIRAA, W. S.; SANTOS, J. C. C. Determination of total antioxidant capacity using thiamine as a natural fluorescent probe. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 12, p. 2479–2490, 2020.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU) BRASIL. **Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável**.

PERVAIZ, M. *et al.* An overview of Aniline-Based Schiff base metal Complexes: Synthesis, characterization and biological activities - a review. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 159, p. 111851, jan. 2024.

PLANO NACIONAL DE FERTILIZANTES 2050 Uma Estratégia para os Fertilizantes no Brasil. . [s.l: s.n.].

POLONINI, H. C. *et al.* Photoprotective activity of resveratrol analogues. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 4, p. 964–968, 15 fev. 2013.

RAMBABU, A. *et al.* DNA interaction, antimicrobial studies of newly synthesized copper (II) complexes with 2-amino-6-(trifluoromethoxy)benzothiazole Schiff base ligands. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 165, p. 147–156, dez. 2016.

REHMAN, S. U. *et al.* Studying non-covalent drug-DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 576, p. 49–60, 2015.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry**, v. 59, p. 1–41, 15 nov. 2015.

ROMERO, A. H. *et al.* Design, synthesis, structure-activity relationship and mechanism of action studies of a series of 4-chloro-1-phthalazinyl hydrazones as a potent agent against *Leishmania braziliensis*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 127, p. 606–620, fev. 2017.

SAJEEV, S. S. O. **Enzymes Market by Type (Protease, Carbohydrase, Lipase, Polymerase and Nuclease, Others), by Source (Microorganisms, Plants, Animals), by Reaction Type (Hydrolase, Oxidoreductase, Transferase, Lyase, Other Reaction Types), by Application (Food and Beverages, Household Care, Bioenergy, Pharmaceutical and Biotechnology, Feed, Other Applications): Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2021-2031**. Pune, India : [s.n.].

SARANYA, G. *et al.* Greener and rapid synthesis of benzal-based Schiff base ligands as an efficient antibacterial, antioxidant, and anticancer agent. **Synthetic Communications**, v. 53, n. 4, p. 316–331, 16 fev. 2023.

ŞENKARDEŞ, S. *et al.* Design, synthesis and molecular modeling studies of thiosemicarbazide & thiazolyl-hydrazone derivatives as potential anticancer agents and topoisomerase inhibitors. **Journal of Molecular Structure**, v. 1302, p. 137488, abr. 2024.

SILVA, C. M. DA *et al.* **Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities** **Journal of Advanced Research**, jan. 2011.

SILVA, C. M. DA *et al.* Studies on free radical scavenging, cancer cell antiproliferation, and calf thymus DNA interaction of Schiff bases. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 172, p. 129–138, 1 jul. 2017.

SILVA, M. M. *et al.* Interaction of β -carboline with DNA: Spectroscopic studies, correlation with biological activity and molecular docking. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 9, p. 1558–1568, 2016.

SONG, W. Q. *et al.* Synthesis, evaluation and mechanism exploration of 2-(N-(3-nitrophenyl)-N-phenylsulfonyl)aminoacetohydroxamic acids as novel urease inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 78, 15 dez. 2022.

SVANE, S. *et al.* Inhibition of urease activity by different compounds provides insight into the modulation and association of bacterial nickel import and ureolysis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 8503, 22 maio 2020.

SZTANKE, K. *et al.* An insight into synthetic Schiff bases revealing antiproliferative activities in vitro. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 13, p. 3648–3666, jul. 2013.

TAVARES, M. C. *et al.* Paper-based analytical device with colorimetric detection for urease activity determination in soils and evaluation of potential inhibitors. **Talanta**, v. 230, 1 ago. 2021.

_____. Interaction and inhibition mechanism of urease in vitro and soil system by a natural benzylisothiocyanate isolated from *Moringa oleifera*. **Industrial Crops and Products**, v. 178, 1 abr. 2022.

_____. The influence of N-alkyl chains in benzoyl-thiourea derivatives on urease inhibition: Soil studies and biophysical and theoretical investigations on the mechanism of interaction. **Biophysical Chemistry**, v. 299, 1 ago. 2023.

UPEGUI ZAPATA, Y. A. *et al.* Mode of action of a formulation containing hydrazones and saponins against leishmania spp. Role in mitochondria, proteases and reinfection process. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 13, p. 94–106, 1 ago. 2020.

WANG, J. *et al.* Anti-Inflammatory Effects of Apigenin in Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory in Acute Lung Injury by Suppressing COX-2 and NF- κ B Pathway. **Inflammation**, v. 37, n. 6, p. 2085–2090, 24 dez. 2014.

WANG, R. *et al.* Functionality study of lignin as a tyrosinase inhibitor: Influence of lignin heterogeneity on anti-tyrosinase activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 107–113, maio 2019.

WANG, Y. *et al.* Hydrazone derivatives in agrochemical discovery and development. **Chinese Chemical Letters**, v. 35, n. 3, p. 108207, mar. 2024.

YAPAR, G. *et al.* Synthesis, Biological Activities, Antioxidant Properties, and Molecular Docking Studies of Novel Bis-Schiff Base Podands as Responsive Chemosensors for Anions. **Journal of Molecular Structure**, v. 1266, p. 133530, out. 2022.

YEHYE, W. A. *et al.* Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 295–312, ago. 2015.

ZHANG, M. *et al.* Nanotechnology enabled reactive species regulation in biosystems for boosting cancer immunotherapy. **Nano Today**, v. 36, p. 101035, fev. 2021.

ZHANG, W. *et al.* Bioactivity and computational studies on the induction of urease inhibition by three Cu(II) complexes with a fluorinated Schiff base and different secondary ligands. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 159, p. 111780, jan. 2024.

ZHANG, WENJI *et al.* The effects and mechanisms of epigallocatechin-3-gallate on reversing multidrug resistance in cancer. **Trends in Food Science & Technology**, v. 93, p. 221–233, nov. 2019.

4. Experimental

4.1 Materiais e soluções

Todos os reagentes empregados neste trabalho apresentam grau analítico de pureza ($\geq 95\%$), sendo empregados diretamente sem processo de purificação prévia. Nas reações para preparação dos compostos **1-22** foram utilizados os seguintes reagentes: Anilina, 3,5-dimetoxianilina, 4-hidroxibenzaldeído, 2,4-diidro-benzaldeído, 2,3-diidro-benzaldeído, 3,4-diidro-benzaldeído, 3,5-diidro-benzaldeído, 4-detoxibenzaldeído, 3-nitrofenol, 4-nitrofenol, ácido ($\pm$)- α -lipoico, N,N-diciclocaboimida (DCC), 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆), clorofórmio deuterado (CDCl₃) acetona deuterado (Acetona-d₆), da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). A urease comercial Jack bean (*Canavalia ensiformis*), tirosinase (*mushroom*), 3,4-Diidroxi-L-fenilalanina, ureia, ácido acetohidroxâmico (AA), hipoclorito de sódio, nitroprussiato de sódio, salicilato de sódio, dihidrogenofosfato de sódio (NaH₂PO₄), tioureia (TIO), hidroxiiureia (HU), N-(n-butil)triamida tiofosfórica (NBPT), NiSO₄ foram obtidos na Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Os demais reagentes empregados neste estudo apresentaram grau de pureza analítica ($\geq 95\%$).

Os solventes hexano (Chemco), acetato de etila da Dinâmica (São Paulo, Brasil) e diclorometano Êxodo científica (São Paulo, Brasil) passaram prévio processo de destilação. O metanol (Chemco, São Paulo, Brasil), ácido clorídrico, ácido acético glacial Dinâmica (São Paulo, Brasil).

Nos ensaios antioxidantes foram empregados os compostos: ácido 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS), radical 2,2-difenil-2-picrilidrazila (DPPH[•]), 2,4,6-tripiridil-triazina (TPTZ), ácido hidratado monossódico 3-(2-piridil) - 5,6-difenil-1,2,4-triazina-p, p'-dissulfônico (Ferozina), neocuproína, cloreto férrico (FeCl₃), ácido caféico, ácido ferrúlico, quercetina e Trolox[®] da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), sulfato ferroso (FeSO₄.7H₂O) da Reagen Quimibrás (Rio de Janeiro, Brasil), Sulfato cúprico (CuSO₄.5H₂O). Nos estudos biofísicos de interação empregou-se Tris-HCl, brometo de etídio (EB), Hoechst 33258 (HO) e o ctDNA (*Calf thymus*) tipo I em fibras da Sigma-Aldrich (Missouri, USA), enquanto o persulfato de potássio (K₂S₂O₈) foi da Merck (Darmstadt, Germany).

A solução estoque de DPPH[•] foi preparada dissolvendo-se 12 mg do radical comercial em 50 mL de metanol. O radical da solução estoque ABTS^{•+} (1 mmol L⁻¹) foi preparada por dissolução direta de 26 mg ABTS em água, então 3,0 mL de K₂S₂O₈ 1

mmol L⁻¹ foram adicionados e o volume foi completado para 10 mL com água deionizada. Após 16 h de incubação ao abrigo da luz, a solução foi diluída para 25 mL com tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH = 7,2) (GRANJA et al., 2018; OLIVEIRA; SANTOS, 2020).

O estoque de TPTZ foi preparado pesando-se 0,0781 g do reagente, o qual foi dissolvido em metanol e transferido para um balão volumétrico de 25 mL sendo o volume ajustado com o mesmo solvente orgânico. O estoque de cloreto férrico foi preparado pesando-se 0,081 g do reagente e solubilizando-o em uma solução de HCl 10 mmol L⁻¹, em que o volume final da solução foi ajustado para 25 mL em um balão volumétrico.

A solução estoque de ferrozina, pesou-se 0,062 g e solubilizou-se o reagente com metanol, a mistura foi adicionada a um balão de 25 mL e o volume ajustado com o mesmo solvente orgânico. O estoque de sulfato ferroso foi preparado pesando-se 0,017 g, solubilizando-o em água e ajustando-o o volume para 100 mL em um balão volumétrico.

A solução estoque de neocuproína foi preparada pesando-se 0,078 g do reagente, o qual foi dissolvido em metanol e transferida para um balão volumétrico de 50 mL, sendo o volume completado com o mesmo solvente orgânico. O estoque de sulfato de cobre foi preparado pesando-se 0,249 g do reagente, solubilizando-o em água e transferindo-se a solução para um balão volumétrico de 100 mL e ajustando o volume com mesmo solvente.

A solução estoque de ctDNA foi preparada dissolvendo 10 mg do ácido nucléico sólido em 10 mL de tampão Tris-HCl sendo agitada durante 12 horas em ambiente livre de luz e posteriormente armazenando a 4°C. A concentração da solução estoque de ctDNA foi determinada usando absorção no UV a 260 nm usando o coeficiente de extinção (ϵ) de 6600 L mol⁻¹ a 25 °C. A pureza da solução de ctDNA foi avaliada monitorando a razão de absorbância em 260 nm para aquela em 280 nm. Assim, quando a solução deu uma razão de $A_{260}/A_{280} > 1,8$, então, o ctDNA estava suficientemente livre de contaminação protéica (DAS et al., 2018).

A solução estoque das bases de *Schiff* híbridas com pirazóis e derivadas de tiossemicarbazidas foram preparadas dissolvendo diretamente os compostos em etanol. Neste sentido, foram preparadas soluções de trabalho dos compostos, uma solução estoque de urease e cisteína em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4 $\pm$ 0,1).

Os derivados aminoguanidinas hidrazonas (**AGH1** – **AGH4**) empregados para os estudos antioxidantes, antiproliferativos e de interação com o ctDNA foram sintetizados, caracterizados e cedidos pelo Profº João Xavier de Araújo Júnior do Instituto de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas.

As bases de *Schiff* derivadas de tiossemicarbazona e híbridas com pirazóis (**307** – **313** e **317**) empregados para os estudos de inibição da urease em diferentes sistemas foram sintetizados, caracterizados e cedidos pelo Prof. Fernanda Andréia Rosa do departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá.

4.2 Equipamentos

As caracterizações de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H e ^{13}C) foram realizadas em um equipamento Bruker (modelo Ascend 600 MHz) (Massachusetts, EUA). As medidas de infravermelho foram realizadas em um aparelho Shimadzu modelo IR PRESTINGE-21 (Japão) usando a técnica reflexão total atenuada (ATR). As medidas de pH foram feitas usando um pHmetro Gehaka (modelo PG1800, Brasil). As medidas de absorção molecular foram realizadas em espectrofotômetro de varredura Micronal (modelo AJX-6100PC, Brasil) com feixe duplo equipado com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. As titulações espectrofluorimétricas foram realizadas em espectrofluorímetro Shimadzu (modelo RF-5301PC, Japão) equipado com lâmpada Xe (150 W) e utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

4.3 Síntese e caracterização

As reações das bases de *Schiff* derivadas do resveratrol (**1-17**) foram realizadas em balões de 25 mL imersos em um banho de glicerina. As reações foram monitoradas usando cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de gel de sílica (50 mm) pré-revestido com um indicador fluorescente. Os rendimentos referem-se a compostos cromatograficamente e espectroscopicamente puros. Os desvios químicos de RMN são relatados em ppm usando o pico tetrametilsilano (TMS) como referência. Os dados de RMN ^1H são apresentados como segue: deslocamento químico δ (ppm), multiplicidade (s = simpleto, d = duplete, dd = duplo duplete, t = tripleto, m = multiplete), constante de acoplamento J (Hz) e integração. Os compostos também foram caracterizados por infravermelho utilizando reflexão total atenuada (FTIR-ATR) e os resultados foram relatados em centímetro recíproco (cm^{-1}).

4.3.1 Procedimento de síntese das bases de Schiff derivadas do resveratrol 1 - 17

Em um balão de fundo redondo de 25 mL foram adicionados 3 mmol do aldeído (1 eq.) e 4 mL de metanol (P.A.). Posteriormente, adicionou-se a solução 3 mmol de anilina (1 eq.). A mistura reacional foi aquecida em banho de glicerina com agitação

magnética e refluxo, por um período de 2-4:30 h. A reação foi acompanhada por CCD [eluyente: hexano/acetato de etila (8:2)] até o consumo do aldeído. Ao término da reação, o produto sólido foi filtrado à pressão reduzida e lavado com etanol gelado (5 x 15 mL) (Liu et al., 2007; Ghosh; Ray, 2017). Por fim, os produtos foram pesados e caracterizados por RMN ^1H , ^{13}C (**Figura 29 – 63** em anexo) e IV (**Figura 74 – 76** em anexo).

1: 4-((fenilimino)metil)fenol. Aspecto físico: sólido branco; FM: $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}$; MM: 197,08 g/mol; rend.: 50 %. FTIR-ATR (cm^{-1}): 3448 ($\nu\text{O-H}$); 3049 - 2472 ($\nu\text{C-H}$); 1606 ($\nu\text{C} = \text{N}$ imina); 1581, 1514, 1446, 1385, 1288, 1248 ($\nu\text{C} = \text{C}$ aromático); 1163 ($\nu\text{C} - \text{O}$); 983, 939 ($\delta\text{C-C}$); 843, ($\delta_{\text{as}}\text{C-H}$ Aromático 1,4-substituído), 840, 639, 546 ($\delta\text{C-H}$). RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 10,17 (s, 1H), 8,45 (s, 1H), 7,78 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 7,39 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,20 (d, $J = 7,7$ Hz, 3H), 6,89 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H). RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 161,09, 160,51, 152,45, 131,15, 129,61, 127,96, 125,80, 121,34, 116,10.

2: 4-((fenilimino)metil)benzeno-1,3-diol. Aspecto físico: sólido laranja; FM: $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_2$; MM: 213,08 g/mol; rend.: 49%. FTIR-ATR (cm^{-1}): 3398-3056 ($\nu\text{O-H}$); 1621 ($\nu\text{C} = \text{N}$ imina); 1591, 1504, 1448, 1292, 1251 ($\nu\text{C} = \text{C}$ aromático); 1192 ($\nu\text{C} - \text{O}$); 1095, 1005 ($\delta\text{C-C}$); 900-843 ($\delta_{\text{as}}\text{C-H}$ Aromático 1,2,4-substituído), 806, 760, 694, 509 ($\delta\text{C-H}$). RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 13,57 (s, 1H), 10,31 (s, 1H), 8,80 (s, 1H), 7,46 – 7,41 (m, 4H), 7,35 (dd, $J = 8,4, 1,1$ Hz, 2H), 7,29 – 7,24 (m, 1H), 6,41 (dd, $J = 8,4, 2,3$ Hz, 1H), 6,31 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H). RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 163,54, 163,13, 162,95, 148,58, 134,94, 129,89, 126,70, 121,53, 112,51, 108,34, 102,84.

3: N-benzilidenoanilina. Aspecto físico: sólido laranja translúcido; FM: $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}$; MM: 181,09 g/mol; rend.: 88%. FTIR-ATR (cm^{-1}): 3055-2886 ($\nu\text{C-H}$); 1944-1705 (*overtone* C-H aromático monosubstituído); 1628 ($\nu\text{C} = \text{N}$ imina); 1582, 1450, 1443, 1366, 1312 ($\nu\text{C} = \text{C}$ aromático); 1173, 1165, 1005 ($\delta\text{C-C}$); 910-864 ($\delta_{\text{as}}\text{C-H}$ Aromático monosubstituído), 756, 687, 532, 432 ($\delta\text{C-H}$). RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 8,49 (s, 1H), 7,94 (d, $J = 5,2$ Hz, 2H), 7,52 (s, 3H), 7,42 (t, 2H), 7,26 (t, $J = 15,6, 7,7$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 160,54, 152,11, 136,39, 131,30, 129,17, 128,83, 128,79, 125,83, 120,88.

4: 4-(((4-hidroxifenil)imino)metil)benzeno-1,3-diol. Aspecto físico: Amarelo pálido; FM: $C_{13}H_{11}NO_3$; MM: 229,24 g/mol; rend.: 55,7%. FTIR-ATR (cm^{-1}): 3149 (ν O-H); 3029-2813 (ν C-H); 2125-1852 (*overtone* C-H aromático 1,2,4-trissubstituído); 1616 (ν C = N imina); 1598, 1512, 1455, 1381 (ν C = C aromático); 1251, 1171, 1119 (δ C-C); 858-818 (δ_{as} C-H Aromático 1,4-dissubstituído), 784, 722, 637, 596, 467 (δ C-H). 1H NMR (600 MHz, Acetona) δ (ppm): 13,69 (s, 1H), 9,06 (s, 1H), 8,72 (s, 1H), 8,52 (s, 1H), 7,37 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7,26 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6,90 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6,45 (dd, $J = 8.4, 2.2$ Hz, 1H), 6,38 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (151 MHz, Acetona) δ (ppm): 164,36, 162,69, 160,98, 157,28, 141,65, 134,87, 123,02, 116,85, 113,83, 108,30, 103,52.

5: 4-((fenil)imino)metil)benzeno-1,2,3-diol. Aspecto físico: Sólido laranja; FM: $C_{13}H_{11}NO_3$; MM: 229,24 g/mol; rend.: 81,1%. FTIR-ATR (cm^{-1}): 3246 (ν O-H); 1858, 1782 (*overtone* C-H aromático 1,2,3,4-tetrassubstituído); 1614 (ν C = N imina); 1585-1257 (ν C = C aromático); 1148 (ν C - O); 1068 (δ C-C); 989-867 (δ_{as} C-H Aromático 1,2,3,4-substituído), 773 - 483 (δ C-H). 1H NMR (600 MHz, Acetona) δ (ppm): 8,75 (s, 1H), 7,44 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H), 7,37 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H), 7,27 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 7,00 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 6,50 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (151 MHz, Acetona) δ (ppm): 163,73, 152,59, 150,58, 149,08, 133,20, 130,30, 127,16, 125,27, 121,80, 113,64, 108,49.

6: 4-(benzilidenoamino)fenol. Aspecto físico: Sólido branco; FM: $C_{13}H_{11}NO$; MM: 197,24 g/mol; rend.: 53,8%. FTIR-ATR (cm^{-1}): 3279 (ν O-H); 3024 - 2585 (ν C-H); 1620 (ν C = N imina); 1836, 1728, 1682 (*overtone* C-H aromático 1,4-dissubstituído), 1589, 1504, 1450, 1358, 1335, 1219, 1248 (ν C = C aromático); 1153 (ν C - O); 994, 936 (δ C-C); 861-799, (δ_{as} C-H Aromático 1,4-dissubstituído). 1H NMR (600 MHz, Acetona) δ (ppm): 8,75 (s, 1H), 8,61 (s, 2H), 7,94 (dd, $J = 6,6, 2,9$ Hz, 4H), 7,52 - 7,47 (m, 7H), 7,23 (d, $J = 8,7$ Hz, 4H), 6,89 (d, $J = 8,7$ Hz, 4H). ^{13}C NMR (151 MHz, Acetona) δ (ppm): 157,10, 156,41, 143,65, 137,02, 130,71, 128,63, 128,34, 122,34, 115,70.

7: 5-(((4-hidroxifenil)imino)metil)benzeno-1,3-diol. Aspecto físico: Sólido branco acizentado; FM: $C_{13}H_{11}NO_3$; MM: 229,24 g/mol; rend.: 82,3%. FTIR-ATR (cm^{-1}): 3209 (ν O-H); 3055-2911 (ν C-H); 1908-1738 (*overtone* C-H aromático 1,3,5-trissubstituído); 1623 (ν C = N imina); 1589, 1504, 1497, 1489, 1358 (ν C = C aromático); 1273, 1203, 1141, 1074 (δ C-C); 871-864, 779 (δ_{as} C-H Aromático 1,3,5-trissubstituído),

784 - 475 (δ C- H). ^1H NMR (600 MHz, Acetona) δ 8,76 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 7,18 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 6,94 (s, 1H), 6,87 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 6,48 (s, 1H), ^{13}C NMR (151 MHz, Acetona). δ (ppm): 159,75, 158,35, 157,16, 144,63, 139,89, 123,17, 116,58, 107,73, 106,20.

8: 4-((4-hidroxibenzilideno)amino)fenol. Aspecto físico: Sólido vermelho; FM: $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_2$; MM: 213,24 g/mol; rend.: 88%. FTIR-ATR (cm^{-1}): 3225 (ν O-H); 3024-2569 (ν C-H); 1736, 1690 (*overtone* C-H aromático 1,4-dissubstituído); 1618 (ν C = N imina); 1587, 1499, 1446, 1366 (ν C = C aromático); 1264, 1234, 1162, 1100 (δ C-C); 825 (δ_{as} C-H Aromático 1,4-dissubstituído), 741 - 471 (δ C- H). ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 10,03 (s, 1H), 9,42 (s, 1H), 8,44 (s, 1H), 7,73 (d, J = 8,5 Hz, 3H), 7,12 (d, J = 8,6 Hz, 3H), 6,86 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 6,78 (d, J = 8,6 Hz, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ (ppm): 157,35, 156,13, 143,71, 130,62, 128,39, 122,58, 116,11, 116,04.

9: 4-(((4-hidroxifenil)imino)metil)benzeno-1,2-diol. Aspecto físico: Sólido vermelho; FM: $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_3$; MM: 229,24 g/mol; rend.: 82%. FTIR-ATR (cm^{-1}): 3402 (ν O-H); 2915-2672 (ν C-H); 1605 (ν C = N imina); 1591, 1504, 1436, 1389 (ν C = C aromático); 1264, 1207, 1153, 1104 (δ C-C); 764 - 462 (δ C- H). ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 9,40 (s, 1H), 8,36 (s, 1H), 7,36 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 7,13 (dd, 1H), 6,80 (dd, J = 29,5, 8,3 Hz, 1H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ (ppm) 157,53, 156,08, 149,12, 146,04, 143,70, 128,91, 122,56, 122,38, 116,11, 115,91, 114,42.

10: 3-(((3-hidroxifenil)imino)metil)benzeno-1,2-diol. Aspecto físico: Sólido vermelho; FM: $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_3$; MM: 229,24 g/mol; rend.: 81%. FTIR-ATR (cm^{-1}): 3232 (ν O-H); 3062-2870 (ν C-H); 2082, 1882, 1713 (*overtone* C-H aromático 1,2,3-trissubstituído); 1620 (ν C = N imina); 1589, 1543, 1489, 1443, 1358 (ν C = C aromático); 1242, 1204, 1134, 1096 (δ C-C); 725, 687 (*overtone* C-H aromático 1,2,3-trissubstituído); 625 - 447 (δ C- H). ^1H NMR (400 MHz, Acetona) δ 8,84 (s, 1H), 7,29 (t, J = 7,9 Hz, 1H), 7,10 (dd, J = 7,8, 1,5 Hz, 1H), 7,02 - 6,95 (m, 1H), 6,92 - 6,87 (m, 2H), 6,85 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 6,83 - 6,80 (m, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, Acetona) δ (ppm): 164,47, 159,34, 150,57, 150,36, 146,68, 131,16, 124,05, 120,03, 119,72, 119,24, 114,96, 113,27, 109,02.

11: 3-(((4-hidroxifenil)imino)metil)benzeno-1,2-diol. Aspecto físico: Sólido vermelho; FM: $C_{13}H_{11}NO_3$; MM: 229,24 g/mol; rend.: 95%. FTIR-ATR (cm^{-1}): 3232 ($\nu O-H$); 3062-2870 ($\nu C-H$); 2082, 1882, 1713 (*overtone* C-H aromático 1,2,3-trissubstituído); 1620 ($\nu C = N$ imina); 1589, 1543, 1497, 1450, 1358 ($\nu C = C$ aromático); 1242, 1204, 1134, 1072 ($\delta C-C$); 725, 687 (*overtone* C-H aromático 1,2,3-trissubstituído); 625 - 416 ($\delta C-H$). 1H NMR (600 MHz, Acetona) δ 8,85 (s, 2H), 7,36 (d, $J = 8,8$ Hz, 3H), 7,06 (dd, $J = 7,8, 1,4$ Hz, 1H), 6,99 – 6,92 (m, $J = 12,7, 7,3, 1,8$ Hz, 4H), 6,82 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (151 MHz, Acetona) δ 161,60, 157,91, 150,27, 146,61, 140,86, 123,62, 123,37, 120,28, 119,58, 118,66, 116,95.

12: 4-(((3-hidroxifenil)imino)metil)benzeno-1,3-diol. Aspecto físico: Sólido amarelo; FM: $C_{13}H_{11}NO_3$; MM: 229,24 g/mol; rend.: 53,1%. FTIR-ATR (cm^{-1}): 3138 ($\nu O-H$); 2983-2909 (*overtone* C-H aromático 1,2,4-trissubstituído); 1624 ($\nu C = N$ imina); 1591, 1520, 1483, 1444, 1292, 1256 ($\nu C = C$ aromático); 1175 ($\nu C - O$); 1119-1078 ($\delta C-C$); 943-841 ($\delta_{as}C-H$ Aromático 1,2,4-substituído), 793, 750, 682, 530 ($\delta C-H$). 1H NMR (600 MHz, Acetona) δ 13,57 (s, 1H), 8,73 (s, 1H), 7,43 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,25 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H), 6,80 (dt, $J = 8,2, 7,2$ Hz, 4H), 6,49 (dd, $J = 8,4, 2,2$ Hz, 1H), 6,41 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (151 MHz, Acetona) δ 163,79, 162,54, 162,31, 158,37, 150,14, 134,51, 130,11, 113,35, 112,70, 112,22, 107,98, 107,62, 102,61.

13: 3-((4-hidroxibenzilideno) amino) fenol. Aspecto físico: Sólido amarelo; FM: $C_{13}H_{11}NO_2$; MM: 213,24 g/mol; rend.: 49,6%. FTIR-ATR (cm^{-1}): 3233 ($\nu O-H$); 2993-2561 ($\nu C-H$); 1612 ($\nu C = N$ imina); 1583, 1508, 1446, 1375 ($\nu C = C$ aromático); 1268, 1211, 1171, 1140 ($\delta C-C$); 830 ($\delta_{as}C-H$ Aromático 1,4-dissubstituído), 764 - 422 ($\delta C-H$). 1H NMR (400 MHz, Acetona) δ 8,42 (s, 1H), 7,82 (dt, 1H), 7,27 – 7,10 (m, $J = 6,2, 3,6, 0,9$ Hz, 1H), 6,96 (dt, 1H), 6,72 – 6,62 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, Acetona) δ 160,47, 159,29, 158,12, 154,09, 130,62, 129,76, 128,62, 115,57, 112,34, 111,93, 107,83.

14: 5-((fenilimino)metil)benzeno-1,3-diol. Aspecto físico: Sólido rosa claro; FM: $C_{13}H_{11}NO_2$; MM: 213,24 g/mol; rend.: 85,5%. FTIR-ATR (cm^{-1}): 3349 ($\nu O-H$); 3070-2530 ($\nu C-H$); 1620 ($\nu C = N$ imina); 1586, 1496, 1450, 1412 1313 ($\nu C = C$ aromático); 1208, 1171, 1003 ($\delta C-C$); 846, 762 ($\delta_{as}C-H$ Aromático 1,3,5-trissubstituído), 678 - 463

(δ C-H). ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 9,53 (s, 1H), 8,40 (s, 1H), 7,40 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 7,23 (t, J = 9,4 Hz, 1H), 6,81 (d, 1H), 6,37 (s, 1H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 161,33, 159,14, 151,95, 138,35, 129,63, 126,29, 121,42, 107,21, 106,24.

15: 4-(((3-hidroxifenil)imino)metil)benzeno-1,2-diol. Aspecto físico: Sólido rosa claro; FM: $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_3$; MM: 229,24 g/mol; rend.: 69%. FTIR-ATR (cm^{-1}): 3349 (ν O-H); 3070-2530 (ν C-H); 1620 (ν C = N imina); 1586, 1496, 1481, 1404, 1366 (ν C = C aromático); 1313, 1208, 1171, 1103 (δ C-C); 762 - 463 (δ C-H). ^1H NMR (400 MHz, Acetona) δ 8,35 (s, 1H), 7,52 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,28 (dd, J = 8,2, 2,0 Hz, 1H), 7,23 – 7,15 (m, 1H), 6,93 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 6,71 – 6,64 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, Acetona) δ 159,45, 158,12, 153,98, 148,89, 145,42, 129,75, 122,83, 115,15, 114,12, 112,30, 111,91, 107,79.

16: 4-((fenilimino)metil)benzeno-1,2-diol. Aspecto físico: Sólido amarelo pálido; FM: $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_2$; MM: 213,24 g/mol; rend.: 89,3%. FTIR-ATR (cm^{-1}): 3501 (ν O-H); 2971-2693 (ν C-H); 1605 (ν C = N imina); 1574, 1512, 1489, 1458, 1381 (ν C = C aromático); 1286, 1234, 1180, 1153 (δ C-C); 812 - 445 (δ C-H). ^1H NMR (400 MHz, Acetona) δ 8,39 (s, 1H), 7,55 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,42 – 7,34 (m, 1H), 7,30 (dd, J = 8,1, 1,9 Hz, 1H), 7,19 (ddd, J = 4,9, 3,8, 1,1 Hz, 1H), 6,94 (d, J = 8,1 Hz, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, Acetona) δ 159,73, 152,56, 148,87, 145,42, 129,02, 125,21, 122,88, 120,77, 115,16, 114,16.

17: 3-((fenilimino)metil)benzeno-1,2-diol. Aspecto físico: Sólido vermelho; FM: $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_2$; MM: 213,24 g/mol; rend.: 54,1%. FTIR-ATR (cm^{-1}): 3325 (ν O-H); 3047-2831 (ν C-H); 2075, 1867, 1682 (*overtone* C-H aromático 1,2,3-trissubstituído); 1612 (ν C = N imina); 1558, 1450, 1366 (ν C = C aromático); 1273, 1211, 1072 (δ C-C); 687, 613 (*overtone* C-H aromático 1,2,3-trissubstituído); 556 - 445 (δ C-H). ^1H NMR (600 MHz, Acetona) δ 13,50 (s, 1H), 8,89 (s, 1H), 7,76 (s, 1H), 7,48 (t, J = 7,8 Hz, 3H), 7,43 (dd, J = 8,4, 1,1 Hz, 3H), 7,35 – 7,30 (m, 1H), 7,11 (dd, J = 7,8, 1,4 Hz, 1H), 7,00 (dd, J = 7,9, 1,5 Hz, 1H), 6,85 (t, J = 7,8 Hz, 1H). ^{13}C NMR (151 MHz, Acetona) δ 164,72, 150,48, 149,12, 146,61, 130,36, 127,84, 124,08, 122,12, 120,11, 119,78, 119,31.

4.3.2 Procedimento de síntese das aminas 18 – 19

Em um balão de fundo redondo de 25 mL foram adicionados 0,51 mmol da imina (1 eq.), 0,51 mmol de NaBH_4 e 2,5 mL de metanol (P.A.). A mistura reacional foi agitada

à temperatura ambiente durante 30 min e acompanhada por CCD [eluyente: hexano/acetato de etila (8:2)] até o consumo do material de partida. Posteriormente, a mistura reacional foi neutralizada com uma solução saturada de NaHCO_3 . A solução resultante foi extraída com acetato de etila (3 x 20 mL) e concentrada à pressão reduzida (Liu et al., 2007; Ghosh; Ray, 2017). Por fim, os produtos foram pesados e caracterizados por RMN ^1H , ^{13}C (**Figura 64 – 67** em anexo) e FTIR-ATR (**Figura 77 – 78** em anexo).

18: Aspecto físico: Óleo amarelo; FM: $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}$; MM: 199,10 g/mol; rend.: 91%. FTIR-ATR (cm^{-1}): 3393 ($\nu\text{O-H}$); 3338 ($\nu\text{N-H}$); 3022 ($\nu\text{N-H}$ no plano dobrado); 2926 - 2606 ($\nu\text{C-H}$); 2097 – 1886 (*overtone* aromático 1,4-disubstituído); 1593, 1501, 1437, 1358, 1327, 1230 ($\nu\text{C=C}$ aromático); 1171 ($\nu\text{C-O}$); 1096, 989 ($\delta\text{C-C}$); 820 ($\delta_{\text{as}}\text{C-H}$ Aromático 1,4-substituído), 744-499 ($\delta\text{C-H}$). RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.24 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 7,18 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H), 7,10 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 6,80 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 6,78 – 6,68 (m, $J = 25,1, 16,9, 9,2$ Hz, 2H), 6,64 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 4,22 (d, $J = 19,9$ Hz, 2H). RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 154,84, 148,18, 131,59, 129,28, 129,04, 128,17, 117,66, 115,49, 112,98, 47,89.

19: Aspecto físico: Sólido marrom; FM: $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}$; MM: 183,10 g/mol; rend.: 92,6%. FTIR-ATR (cm^{-1}): 3406 ($\nu\text{N-H}$); 3053-2849 ($\nu\text{C-H}$); 1944-1688 (*overtone* aromático monosubstituído); 1597, 1501, 1481, 1427, 1325, 1261-1248 ($\nu\text{C=C}$ aromático); 1177, 1095, 1065, 1028 ($\delta\text{C-C}$); 981, 964 ($\delta_{\text{as}}\text{C-H}$ aromático monosubstituído), 744, 692, 503, 451 ($\delta\text{C-H}$). RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7,39 – 7,32 (m, 4H), 7,27 (t, $J = 7,1$ Hz, 1H), 7,17 (t, $J = 7,9$ Hz, 2H), 6,71 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 6,64 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H), 4,33 (s, 2H). RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 148,18, 139,46, 129,25, 128,62, 127,51, 127,22, 117,59, 112,88, 48,37.

4.3.3. Procedimento de síntese do intermediário híbrido lipoico 20

Em um balão de fundo redondo de 25 mL foram adicionados 1 mmol do ácido ($\pm$)- α -lipoico, (206 mg), 1 mmol do 4-hidroxibenzaldeído (122 mg), 1,1 mmol de DCC (227 mg), 0,1 mmol de DMAP (12 mg) e 5 mL de diclorometano anidro (DCM). A reação foi agitada *overnight* à temperatura ambiente em atmosfera inerte. Posteriormente, a mistura reacional foi filtrada, lavada com acetona e concentrado à pressão reduzida. Posteriormente, o resíduo foi purificado por coluna cromatográfica (Hexano/Acetato 9:1)

(GODOY-REYES et al., 2019). Por fim, o produto foi pesado e caracterizados por RMN ^1H , ^{13}C (**Figura 68 – 69** em anexo) e FTIR-ATR (**Figura 79** em anexo).

20: Aspecto físico: Óleo amarelo; FM: $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_3\text{S}_2$; MM: 310,07 g/mol; rend.: 52%. FTIR-ATR (cm^{-1}): 2932, 2847, 2729 (νCHO); 1759 ($\nu\text{-CO-O-éster}$); 1699 (νCHO); 1599 - 1013 ($\nu\text{C} = \text{C}$ aromático); 1177 (varomático-CO-O-alifático éster); 1095, 1065, 1028 ($\delta\text{C-C}$); 981, 905 ($\delta_{\text{as}}\text{C-H}$ aromático 1,4-disubstituído), 858-623 ($\delta_{\text{as}}\text{C-H}$); 509 ($\delta\text{S-S}$). RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 10,00 (s, 1H), 7,93 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,27 (d, $J = 3,3$ Hz, 2H), 3,64 – 3,56 (m, $J = 12,7$, 6,3 Hz, 1H), 3,23 – 3,10 (m, 2H), 2,62 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 2,53 – 2,46 (m, $J = 12,4$, 6,3 Hz, 1H), 1,97 – 1,90 (m, $J = 13,6$, 6,9 Hz, 1H), 1,87 – 1,68 (m, 4H), 1,66 – 1,51 (m, 2H). RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 190,82, 171,20, 155,41, 134,02, 131,19, 122,33, 56,27, 40,25, 38,52, 34,58, 34,15, 28,66, 24,53.

4.3.4. Procedimento de síntese dos híbridos lipoicos com bases de Schiff 21-22

Em um *vial* de 10 mL foram adicionados 0,16 mmol do composto **20** (aldeído) (1 eq.) e 1 mL de etanol (P.A.). Posteriormente, adicionou-se a solução 0,16 mmol de anilina (1 eq.). A mistura reacional foi aquecida em banho de glicerina com agitação magnética, por um período de 2-3 h. A reação foi acompanhada por CCD [**eluente**: hexano/acetato de etila (8:2)] até o consumo do aldeído. Ao término da reação, o produto sólido foi filtrado e lavado sucessivas vezes com éter etílico e n-hexano. Por fim, os produtos foram pesados e caracterizados por RMN ^1H , ^{13}C (**Figura 70 – 73** em anexo) e FTIR-ATR (**Figura 80 – 81** em anexo).

21: 4-(((3-hidroxifenil)imino)metil)fenil-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanoato. Aspecto físico: Sólido amarelo pálido; FM: $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{S}_2$; MM: 401,54 g/mol; rend.: 49,5%. FTIR-ATR (cm^{-1}): 3348 ($\nu\text{O-H}$); 3055, 2909, 2847 (νCH); 1751 ($\nu\text{-CO-O-éster}$); 1620 ($\nu\text{C} = \text{N}$ imina); 1605 – 1018 ($\nu\text{C} = \text{C}$ aromático); 1203 (varomático-CO-O-alifático éster); 1095, 1052, 1011 ($\delta\text{C-C}$); 943, 916 ($\delta_{\text{as}}\text{C-H}$ aromático 1,4-disubstituído), 858-623 ($\delta_{\text{as}}\text{C-H}$); 600–700 ($\delta\text{C-S}$); 537 ($\delta\text{S-S}$). ^1H NMR (400 MHz, Acetona) δ 8,61 (s, 1H), 8,46 (s, 1H), 8,07 – 7,84 (m, 2H), 7,32 – 7,16 (m, 4H), 6,96 – 6,82 (m, 2H), 3,76 – 3,53 (m, 2H), 3,30 – 3,03 (m, 2H), 2,66 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 2,52 (dtd, $J = 12,1$, 6,6, 5,4 Hz, 1H), 1,95 (td, $J = 13,6$, 6,9 Hz, 1H), 1,86 – 1,52 (m, 5H). ^{13}C NMR (151 MHz, Acetona) δ 171,23, 156,35,

155,97, 153,02, 143,70, 134,59, 130,81, 129,36, 122,58, 122,35, 122,09, 120,56, 115,72, 56,28, 40,04, 38,20, 34,43, 33,61, 24,41, 24,33.

22. 4-(((4-hidroxifenil)imino)metil)fenil-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanoato. Aspecto físico: Sólido verde pálido; FM: $C_{21}H_{23}NO_3S_2$; MM: 401,54 g/mol; rend.: 59,6%. FTIR-ATR (cm^{-1}): 3364 (ν O-H); 3063, 2909, 2847 (ν CH); 1751 (ν -CO-O- éster); 1605 (ν C = N imina); 1605 – 1019 (ν C = C aromático); 1203 (varomático-CO-O-alifático éster); 1098, 1055, 1019 (δ C-C); 953, 919 (δ_{as} C-H aromático 1,4-disubstituído), 887-694 (δ_{as} C-H); 600–700 (δ C-S); 540 (δ S-S). 1H NMR (600 MHz, Acetona) δ 8,60 (s, 1H), 8,39 (s, 1H), 7,97 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,24 (dd, J = 19,8, 7,8 Hz, 4H), 6,88 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 3,65 (dd, J = 26,8, 20,7 Hz, 1H), 3,24 – 3,09 (m, 2H), 2,65 (t, J = 6,9 Hz, 2H), 2,51 (dd, J = 12,3, 5,9 Hz, 1H), 1,95 (dd, J = 12,5, 6,5 Hz, 1H), 1,86 – 1,51 (m, 6H). ^{13}C NMR (151 MHz, Acetona) δ 172,15, 157,26, 156,89, 153,94, 144,63, 135,51, 130,28, 123,27, 123,01, 116,64, 57,20, 40,96, 39,12, 35,34, 34,53, 25,33.

4.4 Fator de Proteção Solar UVB *in vitro*

Inicialmente mediu-se espectrofotometricamente curvas analíticas dos compostos avaliando-se incrementos de 5 a 250 μ mol L $^{-1}$ dos derivados iminicos, amínicos e dos híbridos lipoicos (2 mL) no máximo de absorção de cada molécula. Posteriormente, os compostos tiveram suas absorvâncias determinadas em triplicatas, nas concentrações de 100 μ mol L $^{-1}$, utilizando-se etanol absoluto como solvente na faixa de 260 a 400 nm. O FPS-UVB foi então determinado empregando-se a **Equação 1** (Guimarães, 2017; Araújo et. al., 2014).

$$FPS \text{ espectrofotométrico} = FC \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot Abs(\lambda) \quad \text{Equação (1)}$$

FC = fator de correção (igual a 10); $EE(\lambda)$ = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda λ ; $I(\lambda)$ = intensidade da luz solar no comprimento de onda λ ; $Abs(\lambda)$ = medida espectrofotométrica da absorvância da solução da amostra no comprimento de onda (λ); os valores de $EE(\lambda) \times I(\lambda)$ são dados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação nos comprimentos de ondas da região UVB.

λ (nm)	EE (λ) x I (λ)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180

Fonte: Adaptado de Guimarães, 2019.

4.5. Determinação da capacidade antioxidante

4.5.1. Ensaio de sequestro do radical DPPH•

Para avaliar a capacidade de sequestro do radical DPPH•, 100 μ L da espécie radicalar (608 μ mol L⁻¹) foram misturados com diferentes incrementos da solução de referência ou da amostra (1 - 200 μ mol L⁻¹), e o volume final foi ajustado para 2,0 mL usando uma solução aquometanólica a 30% (v/v). Após 30 min de incubação, a medida espectrofotométrica foi realizada em 527 nm. O valor de IC₅₀ foi determinado usando uma regressão linear entre a concentração em μ mol L⁻¹ (eixo das abcissas) e a inibição percentual (%I) (eixo das ordenadas), usando a equação $\%I = (1 - (A_{AO}/A_{ref})) \times 100$. Neste caso, A_{AO} é a absorvância da amostra e A_{ref} é a absorvância do controle negativo (100 μ L de solução DPPH• + 1900 μ L da solução aquometanólica 30% (v/v)) (Granja et al., 2018; Oliveira; Santos, 2021).

4.5.2. Ensaio de sequestro do radical ABTS•+

Para realizar o método radical ABTS•+, procedeu-se da seguinte forma: adicionou-se a um tubo eppendorf de 2 mL, 88 μ L da solução do radical, diferentes incrementos da solução padrão ou da amostra (0,025 - 100 μ mol L⁻¹) e avolumou-se o tubo com água deionizada. Após 15 min, realizou-se a medição espectrofotométrica em 734 nm. O valor de IC₅₀ foi determinado usando uma regressão linear entre a concentração em μ mol L⁻¹ (eixo das abcissas) e a inibição percentual (%I) (eixo das ordenadas), usando a equação $\%I = (1 - (A_{AO}/A_{ref})) \times 100$. Em que, A_{AO} é a absorvância da amostra e A_{ref} é a absorvância do controle negativo (88 μ L de solução ABTS•+ + 1912 mL de água deionizada) (Granja Et Al., 2018; Oliveira; Santos, 2020).

4.5.3. Ensaio de redução de Fe (III) (FRAP) método 1

A avaliação da capacidade de redução de Fe(III) foi realizada a partir da adição de 0,75 mL das soluções das amostras ou dos padrões, 1,25 mL da solução $K_3[Fe(CN)_6]$ a 1,0% (m/v) previamente diluída em tampão fosfato pH 6,0 e, 1,25 mL de água ultrapura. A mistura foi incubada por 20 min a 50 °C. Em seguida, adicionou-se 1,25 mL de ácido tricloacético 10% (v/v) e 0,5 mL de $FeCl_3$ a 0,1% (m/v) para a formação do complexo denominado azul da Prússia (cromóforo), o qual apresenta máxima absorvância em 700 nm (Gülçin et al., 2010). A solução de referência (branco analítico) foi preparada a partir da substituição do padrão ou da amostra por água ultrapura (Gulcin et al., 2010).

4.5.4 Ensaio de redução de Ferro (III) (FRAP) método 2

A capacidade redutora de ferro (FRAP) desse método é baseada na redução do complexo TPTZ- Fe^{3+} a seu complexo reduzido (TPTZ- Fe^{2+}) na presença da espécie antioxidante (MALACARIA, 2022). O reagente FRAP foi preparado adicionando as soluções de TPTZ (10 mM), $FeCl_3$ (5 mM) e tampão acetato (pH 3,6, 0,3M) em uma proporção de 1:1:10 respectivamente. Em seguida, adicionou-se 1 mL do reagente FRAP, os compostos na concentração de $10 \mu mol L^{-1}$, ajustou-se o volume de 2 mL com água deionizada e as soluções foram incubadas a 37 °C por meia hora. Por fim, as absorvâncias das amostras foram medidas em 593 nm (Cakmak; Gulcin, 2019; Malacaria, 2022).

4.5.5 Ensaio de complexação de Ferro (II)

Para realizar o método procedeu-se da seguinte forma: em um tubo de 2 mL adicionou-se nessa ordem, 100 μL de $FeCl_2$ (0,6 mM), incrementos dos padrões e compostos ($5-200 \mu mol L^{-1}$) e 100 μL de ferrozina (5 mM), por fim, ajustou-se o volume final do tubo com metanol. Em seguida, as soluções foram agitadas vigorosamente por 15 min em ambiente escuro. Finalmente, a absorvância das soluções foi medida espectrofotometricamente em 562 nm. O percentual (%) de quebra do complexo ferrozina- Fe^{2+} foi obtido usando uma regressão linear entre a concentração em $\mu mol L^{-1}$ (eixo das abcissas) dos padrões/compostos e a quelação percentual de percentual Fe^{2+} (%) (eixo das ordenadas), usando a equação $\%Q = (1 - (A_{AO}/A_{ref})) \times 100$. Em que, A_{AO} é a absorvância da amostra e A_{ref} é a absorvância do controle negativo (100 μL de $FeCl_2$ + 100 μL de ferrozina + metanol) (Cakmak; Gulcin, 2019; Sari et al., 2017).

4.5.6. Ensaio de redução de Cobre (II) – CUPRAC

Para realizar o ensaio de redução de cobre, inicialmente fêz-se curvas analíticas dos padrões e dos compostos, para isso, em tubos eppendorf de 2 mL, adicionou-se, nesta ordem: 480 µL de solução de CuSO₄ (10 mM), 480 µL de neocuproína solução (7,5 mM), 480 µL de tampão acetato pH 7,0 (1,0 M), incrementos dos padrões e dos compostos (1 a 5 µmol L⁻¹) e ajustou-se o volume final do tubo com água deionizada. Posteriormente, os compostos tiveram suas absorvâncias determinadas em triplicatas, na concentração de 2 µmol L⁻¹. As soluções foram incubadas por 30 min, à temperatura ambiente e por fim, foram realizadas as medidas de absorvâncias em 450 nm. O Trolox[®] foi utilizado como padrão do ensaio e, os resultados foram expressos em equivalentes desse composto (TEAC) (Eglence-Bakir, 2021)

4.5.7. Sequestro de óxido nítrico (•NO)

Para avaliação do sequestro do radical •NO adicionou-se 0,5 mL da solução de nitroprussiato de sódio 5,0 mmol L⁻¹ diluída em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,0) e 2,5 mL das amostras ou padrões empregados. O volume final foi ajustado para 5,0 mL com água ultrapura e a solução resultante foi incubada à temperatura ambiente por 150 min (MAIA et al., 2010). O sinal de referência (branco) foi obtido a partir de uma solução semelhante a anterior, no entanto, a amostra ou padrão foi substituído por água ultrapura. Em intervalos de 30 min alíquotas de 1,0 mL das amostras incubadas foram coletadas e misturadas a 1,0 mL do reagente de Griess. O cromóforo gerado a partir da reação de diazonização da sulfanilamida com nitrito de sódio em meio ácido, seguido acoplamento com o naftiletilenodiamino foi medido por espectrofotometria em 546 nm.

4.6. Procedimentos para estudos envolvendo a urease

4.6.1. Cinética clássica e inibição *in vitro*

Os ensaios de inibição *in vitro* foram realizados usando a urease Jack bean (*Canavalia ensiformis*) com base na reação do indofenol (Weatherburn, 1967). Para isso, 56 mU de urease (em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0) e 100 µM de cada inibidor foram incubados por 15 min seguindo com adição de 3,16 mM de ureia, por 15 min para processamento da reação em 940 µL de volume final. A concentração de NH₄⁺ foi determinada em 700 nm após 30 min de incubação com 34 µL da solução A (salicilato de sódio 1% (v/v) e nitroprussiato de sódio 5 mg L⁻¹) e 26 µL da solução B (NaOH 0,5 %

(m/v) e NaOCl 0,1 % (v/v). Repetiu-se esse procedimento adicionando concentrações crescentes dos inibidores para o posterior cálculo de IC_{50} . Assim, os experimentos foram realizados em triplicata ($n = 3$) e o IC_{50} foi calculado com base no método gráfico de intersecção entre a abscissa (concentração do inibidor) e a ordenada (% inibição) (Tavares et al., 2021, 2023).

Para a cinética enzimática, utilizou-se condições semelhantes às de inibição, mantendo-se as concentrações e volumes da enzima e da solução A e B iguais, bem como, o volume final e os tempos de incubação após cada passo. Assim, foram preparadas curvas mantendo-se fixa a concentração da enzima e do inibidor (17 a 22 μ M). Posteriormente, para cada curva foram adicionadas quantidades crescentes de ureia (0,25 a 3 mM), as soluções A e B e realizado a medida em 700 nm. O ensaio foi avaliado a partir do gráfico de Lineweaver-Burk que leva em consideração o $1/V$ (inverso das velocidade) vs $1/[S]$ (inverso da concentração do substrato) em mM^{-1} .

4.6.2. Avaliação da interação urease-ligante usando UV-vis

As medidas da absorvância foi realizada para o derivado **312** (10 μ M), urease (10 μ M) e a respectiva mistura para avaliar a formação do complexo. Nessa linha, a interação com o níquel foi realizada avaliando os sistemas: Ni(II) 10 μ M, **312** (10 μ M) e Ni(II): **312** 1:1. Os espectros UV-vis foram registrados na faixa de 220 a 500 nm. Além disso, foram realizados titulação espectrofotométrica da urease (2 μ M) com **312** (0 - 25 μ M), em três temperaturas (22, 30 e 38 °C) para obter os parâmetros termodinâmicos e de interação. Todos os ensaios biofísicos de interação foram realizados em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7.4.

4.6.3. Avaliação da inibição de ureases do solo

A inibição da atividade de enzimas ureolíticas na microbiota do solo foi conduzida conforme a metodologia adaptada por Tavares et al. (2022), empregando amostras de quatro solos (S1, S2, S3 e S4). Para isso, 1 g de cada solo foi transferido para um Erlenmeyer contendo 50 mL de tampão acetato de sódio pH $5,5 \pm 0,1$ e a solução foi adicionado 125 μ M da base de *Schiff* ou do NBPT. Posteriormente, as soluções foram agitadas por 30 minutos a uma velocidade de 650 rpm em uma mesa agitadora. Em seguida, foram retirados 500 μ L de cada suspensão, transferidos para tubos Falcon e adicionados 200 μ L de ureia 80 mM ou 200 μ L de tampão (como controle), mantendo-se

a agitação constante por 2 horas. Após esse período, 2 mL de KCl foram adicionados a cada tubo, e o sistema foi agitado por mais 30 minutos. Por fim, as suspensões foram centrifugadas a 2900 rpm por 10 minutos, separando o sobrenadante do resíduo. A concentração de N-NH_4^+ foi determinada a 650 nm, utilizando 150 μL do sobrenadante centrifugado, 150 μL de água ultrapura, e incubando por 30 minutos com 150 μL da solução A e 60 μL da solução B.

4.6.4. Avaliação da inibição de ureases em urina

A inibição da atividade de enzimas ureolíticas em amostras de urina foi realizada utilizando a metodologia de Tavares et al. (2022), com alterações. Inicialmente realizou-se otimização dos seguintes parâmetros: Tampão, pH e fator de diluição. Posteriormente, 2,5 μL de amostras de urina de dois doadores (masculino e feminino) foi incubada com 100 μM dos inibidores por 5 min. Posteriormente, adicionou 34 μL da solução A (salicilato de sódio 1% (v/v) e nitroprussitado de sódio 5 mg L^{-1}) e 26 μL da solução B (NaOH 0,5 % (m/v) e NaOCl 0,1 % (v/v) e ajustou-se o volume final para 1000 μL com tampão tris-HCl 20 mM pH 7,4. A concentração de NH_4^+ foi determinada em 650 nm após 30 min de incubação. Os estudos com amostras biológicas estão amparados na liberação junto ao comitê de ética da Universidade Federal de Alagoas para estudos com amostras biológicas (CAAE: 58121322.7.0000.5013).

4.7. Procedimentos para estudos envolvendo a Tirosinase (*mushroom*)

4.7.1. Inibição *in vitro* da Tirosinase

A inibição enzimática dos compostos avaliados foi determinada usando a L-DOPA como substrato, de acordo com a literatura com algumas modificações (alsantali et al, 2022). Em tubos de 2 mL, 20 U/mL de tirosine (*mushroom*) foram incubados com 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dos padrões/compostos a 25 °C por 5 min. Em seguida, adicionou-se 0,5 mM L-DOPA e o volume foi ajustado para 450 μL com tampão fosfato de potássio (pH 6,8, 50 mM). As absorvâncias das amostras foram medidas em 475 nm após a adição do substrato e após nova incubação em 25 °C por 30 min. O percentual inibição da tirosinase a atividade foi determinada usando a seguinte equação: $I (\%) = (1 - \Delta A_{\text{amostra}} / \Delta A_{\text{controle}}) \times 100\%$. Na qual, $\Delta A_{\text{amostra}}$ refere-se à variação da absorvância da amostra e $\Delta A_{\text{controle}}$ é a variação da absorvância do controle negativo. Todos os ensaios foram realizados em

triplicadas e o ácido kójico foi usado como controle positivo (He et al., 2021; Sepehri et al., 2022).

4.7.2. Estudos cinéticos de inibição da tirosinase

O estudo cinético do tipo de inibição enzimática foi realizado em várias concentrações dos compostos mais ativos ($4 - 32 \mu\text{mol L}^{-1}$) e L-dopa (0,1, 0,25, 0,5, 0,75 e 1,5 mM) como substrato. O tempo de pré-incubação dos pontos das curvas foi o mesmo utilizado no protocolo de inibição da tirosinase e as medidas cinéticas foram realizadas em 475 nm. O ensaio foi avaliado a partir do gráfico de Lineweaver-Burk que leva em consideração o $1/V$ (inverso da velocidade) vs $1/[S]$ (inverso da concentração do substrato) em mM^{-1} (Sepehri et al., 2022; Alsantali et al., 2022).

4.8. Estudos teóricos

4.8.1. Determinação das propriedades ADME *in silico*

As propriedades ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) *in silico* dos compostos foram determinadas utilizando o *website* ADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>) (Daiana; Michielin; Zoete, 2017) e o software OSIRISDataWARRIOR versão 05.02.01 (Sander et al., 2015).

4.8.2. Preparação dos ligantes para realização do *docking* molecular

Os compostos foram desenhados usando o software ChemDraw (ChemDraw, Versão 15.1. PerkinElmer Informatics, Inc., Massachusetts, EUA, 2016), convertidos em arquivos tridimensionais MDL Molfile (.mol) e tiveram suas microespécies mais abundantes no pH trabalhado para cada macromolécula avaliados (Marvin Sketch, Budapeste, Hungria). Posteriormente, as microespécies foram otimizadas usando o método AM1, no software MOPAC (Colorado, USA), gerando o input na interface gráfica Mercury 4.3.1 (Massachusetts, USA).

4.8.3. *Docking* molecular Aminoguanidina hidrazona

A estrutura da macromolécula de DNA (PDB ID: 1BNA) foi obtido do Banco de Dados de Proteínas (PDB). Posteriormente, todos os ligantes, íons e moléculas de água que estavam presentes na estrutura original da biomolécula referente ao arquivo PDB foram removidos manualmente, adicionados átomos de hidrogênio polar, calculadas cargas atômicas parciais, bem como a designação AD4 dos átomos e no final as estruturas

foram convertidas para o formato pdbqt usando o AUTODOCK TOOLS v. 1.5.6 (Trott; Olson, 2009). Todos os cálculos de docking foram realizados utilizando o software Autodock vina (TROTT; OLSON, 2009) e os resultados de saída (*output*) foram renderizados no software Discovery Studio Visualizer (BIOVIA. Dassault Systèmes. In Discovery Studio Visualizer. v21.1.0.20298; Dassault Systèmes: San Diego, CA, EUA, 2021) e UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004).

4.8.4. Docking molecular das bases de Schiff híbridadas com pirazóis e derivadas de tiosemicarbazonas

Os estudos de *docking* molecular foram conduzidos empregando as estruturas tridimensionais da urease Jeak bean (*Canavalia ensiformis*) complexada com fluoreto (PDB ID: 4GOA), utilizando o Gold versão 2023.3.0 (Jones et al., 1997) e a função de pontuação Gold Score. O algoritmo genético (AG) foi configurado com uma eficiência de busca de 100%. A bolsa de ligação (sítio ativo) da enzima, onde o fluoreto está complexado, serviu como ponto de referência, e os compostos avaliados no estudo foram ancorados dentro de um raio de 10 Å. Por fim, os dados foram processados utilizando os softwares UCSF Chimera (Califórnia, EUA) e Discovery Studio Visualizer. v21.1.0.20298; Dassault Systèmes: San Diego, CA, EUA, 2021).

4.8.5. Docking molecular das bases de Schiff derivadas do resveratrol

Os estudos de *docking* molecular foram conduzidos empregando a estrutura tridimensional da tirosinase (*mushroom*) complexada com tropolona (PDB ID: 2Y9X), utilizando o Gold versão 2023.3.0 (Jones et al., 1997) e a função de pontuação Gold Score. O algoritmo genético (AG) foi configurado com uma eficiência de busca de 100%. A bolsa de ligação (sítio ativo) da enzima, onde a tropolona está complexado, serviu como ponto de referência, e os compostos avaliados no estudo foram ancorados dentro de um raio de 10 Å. Por fim, os dados foram processados utilizando os softwares UCSF Chimera (Califórnia, EUA) e Discovery Studio Visualizer. v21.1.0.20298; Dassault Systèmes: San Diego, CA, EUA, 2021).

4.9. Análise estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (SD) considerando medições em triplicata ($n = 3$). Como teste de hipótese se empregou a análise de variância (ANOVA) e quando necessário teste de Tukey ($p = 0.05$). As avaliações estatísticas foram realizadas empregando o software OriginPro 9.0 (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, USA).

5. Referências

- ALSANTALI, R. I. et al. Flavone-based hydrazones as new tyrosinase inhibitors: Synthetic imines with emerging biological potential, SAR, molecular docking and drug-likeness studies. **Journal of Molecular Structure**. 1251. 131933. 2022.
- ARAÚJO, C. R. M. et al. Síntese e Determinação in vitro do FPS-UVB de Oximas Derivadas do Lapachol. **Rev Virtual Quím**. 6. 6. 1702-1712. 2014.
- CAKMAK, K. C.; GULCIN, I. Anticholinergic and antioxidant activities of usnic acid an activity-structure insight. **Toxicology Reports**. 6 (2019) 1273–1280. 2019.
- DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, druglikeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**. 7, 42717. 2017.
- DAS SILVA et al. Highly functionalized piperidines: Free radical scavenging, anticancer activity, DNA interaction and correlation with biological activity. **Journal of Advanced Research**. 9. 51–61. 2018.
- Dassault Systèmes BIOVIA. *Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017*. Dassault Systèmes; San Diego, CA, USA: 2017.
- EGLENCE-BAKIR, S. New nickel(II) complexes containing N₂O₂ donor thiosemicarbazones: Synthesis, characterization and antioxidant properties. **Journal of Molecular Structure**. 1246. 131121. 2021.
- Eric F. Pettersen, Thomas D. Goddard, Conrad C. Huang, Gregory S. Couch, Daniel M. Greenblatt, Elaine C. Meng, Thomas E. Ferrin. UCSF Chimera—a visualisation system for exploratory research and analysis, **J. Comput. Chem**. 25 (13) (2004) 1605–1612.
- GHOSH, M; RAY, J. K. Ten years advancement in the synthetic applications of 2-bromocyclohexenecarbaldehydes and 2-bromobenzaldehydes and derived substrates under palladium-catalyzed cross-coupling conditions. **Tetrahedron**. 73. 3731-3799. 2017.
- GODOY-REYES, T. M. et al. A Colorimetric Probe for the Selective Detection of Norepinephrine Based on a Double Molecular Recognition with Functionalized Gold Nanoparticles. **ACS Appl. Nano Mater**. 2. 1367–1373. 2019.

GRANJA, B. S. et al. Exploring MBTH as spectrophotometric probe for total phenolic compounds determination in beverage samples. **Analytical Methods**, 10. 2197-2204. 2018.

GUIMARÃES, A. S. Compostos Naftoquinônicos: atividade biológica, fotoprotetora e estudos de interação com ctDNA. Dissertação de mestrado. 2019.

GULCIN, I. et al. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**. 48. 2227-2238. 2010.

HE, M. et al. Design, synthesis, molecular modeling, and biological evaluation of novel kojic acid derivatives containing bioactive heterocycle moiety as inhibitors of tyrosinase and antibrowning agents. **Food Chemistry**. 362. 130241. 2021.

JONES, G. *et al.* Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking 1 Edited by F. E. Cohen. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727–748, abr. 1997.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 46. 3–26. 2001.

LIU, P. et al. Synthesis of heterocycles via ligand-free palladium catalyzed reductive Heck cyclization. **Tetrahedron Letters**. 48. 2307–2310. 2007.

MAIA, R. M. et al. Avaliação do sequestro do óxido nítrico (NO) pelo extrato metanólico da alga *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) Howe. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 20. 4. 2010. 489-493.

MALACARIA, L. et al. Aluminum(III), iron(III) and copper(II) complexes of luteolin: Stability, antioxidant, and anti-inflammatory properties. **Journal of Molecular Liquids**. 345 (2022) 117895.

MOPAC2016, J.P. James, Stewart, Stewart computational chemistry, Colorado Springs, CO, USA, <http://openMOPAC.net> 2016.

O. Trott, A.J. Olson, Software news and update AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a New scoring function, efficient optimization and

multithreading, **Journal Computacional Chemistry**. 31. (2010). 455–461.
<https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.

OLIVEIRA, W. S.; SANTOS, J. C. C. Santos. Determination of Total Antioxidant Capacity Using Thiamine as a Natural Fluorescent Probe. **Journal Brazilian Chemical Society**. 31. 12. 2479-2490. 2021.

SANDER, T. et al. DataWarrior: An Open-Source Program For Chemistry Aware Data Visualization And Analysis. **Journal Chemical Information and Modeling**. 55. 460–473. 2015.

SARI, Y. et al. Novel *N*-propylphthalimide- and 4-vinylbenzyl-substituted benzimidazole salts: Synthesis, characterization, and determination of their metal chelating effects and inhibition profiles against acetylcholinesterase and carbonic anhydrase enzymes. **Journal Biochemistry Molecular Toxicologic**. 2. 2009. 1-11. 2017.

SEPEHRI, N. et al. Design, synthesis, biological evaluation, and molecular docking study of thioxo-2,3-dihydroquinazolinone derivative as tyrosinase inhibitors. **Journal of Molecular Structure**. 1253. 132283. 2022.

TAVARES, M. C. *et al.* Paper-based analytical device with colorimetric detection for urease activity determination in soils and evaluation of potential inhibitors. **Talanta**, v. 230, 1 ago. 2021.

____. The influence of N-alkyl chains in benzoyl-thiourea derivatives on urease inhibition: Soil studies and biophysical and theoretical investigations on the mechanism of interaction. **Biophysical Chemistry**, v. 299, 1 ago. 2023.

VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of medicinal chemistry**, 45. 12. 2615–23. 2002.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 971–974, 1 jul. 1967.

5. Seção 1- Derivados Aminoguanidina hidrazonas: estudos do perfil antioxidante, antineoplásico e interação com ctDNA

5. 1. Introdução

As aminoguanidinas hidrazonas (AGH's) possuem amplo espectro de aplicações biológicas devido as suas características mistas, quanto às propriedades eletrônicas e capacidade de formar ligações de hidrogênio com diferentes sistemas (Da Silva et al., 2020). Assim, para os derivados aminoguanidínicos são reportadas diferentes atividades biológicas como anticâncer (SONG et al., 2019), antioxidante (Andrade et al., 2015), antimicrobiana (Sidoryk et al., 2017), inibidores de iNOS (Paesano et al., 2004), atividade antimalárica e antitubercular (Zamperini et al, 2017; Pasero 2018; Kim et al., 2021), entre outras. Nessa linha, destaca-se o **Guanabenz (1) (Figura 2A)** um agonista do receptor AGH $\alpha 2$ -adrenérgico utilizado como agente anti-hipertensivo, desde a década de 1970 (Baum et al., 1970). Além disso, essa substância tem despertado interesse devido a outras propriedades que tem demonstrado, como neuroprotetor em fotorreceptores (Li et al., 2019), adjuvante no tratamento da toxoplasmose crônica (Martynowicz et al., 2019; Martynowicz; Doggett; Sullivan Jr., 2020), modulador de canais iônicos sensíveis a ácidos (ASICs) com o objetivo de controlar doenças inflamatórias como a artrite reumatóide (Callejo et al., 2020), atua mitigando a hepatotoxicidade induzida por paracetamol (Xie et al., 2020), além de promover a sensibilização das células do glioblastoma à ação do agente antineoplásico sunitinibe (Ho et al., 2021), mostrando assim que esse composto pode servir de base para o desenvolvimento de substâncias ativas em diversos modelos biológicos. Um exemplo clássico desse desenvolvimento é o derivado monoclorado do guanabenz, denominado **Sephin-1 (2) (Figura 2A)**, que tem despertado interesse como neuroprotetor, principalmente pela ausência dos efeitos adrenérgicos (Ruiz et al., 2020). Além disso, o derivado **2** demonstrou outras funções, incluindo, atividade antiviral (Fusade-Boyer et al., 2019), modulação dos canais iônicos sensíveis a ácido, promovendo o bloqueio da dor induzida nesses canais por essa espécie química, mecanismo útil para o controle da dor em casos de doenças inflamatórias (Callejo et al., 2020).

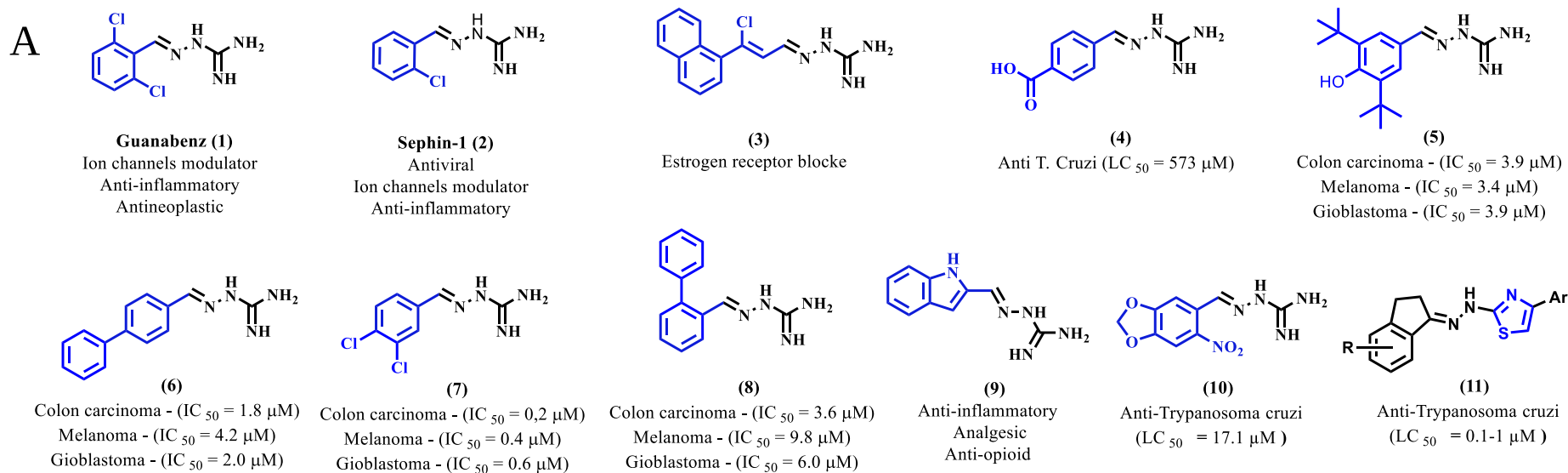
As AGHs também têm demonstrado potencial para bloquear o receptor de estrogênios, como é o caso do composto **3 (Figura 2A)**, um bloqueador do receptor de estrogênio capaz de reverter a resistência do câncer de mama ao tamoxifeno (Lafrate et al., 2008). Além disso, o composto **4** foi testado contra *Trypanosoma cruzi*, apresentando

$LC_{50} = 573 \mu M$, considerado atividade moderada para baixa. A análise qualitativa da relação estrutura-atividade mostrou que a maior atividade foi apresentada por compostos que possuem grupos aromáticos com substituintes nas posições *orto* (Messeder et al., 1995). Além disso, o composto **4** demonstrou a capacidade de inibir a lipase de *Candida rugosa* e a lipase bruta do intestino de larvas de *Rhynchophorus palmarum*, sendo essa última uma praga na agricultura, demonstrando o potencial da substância para o controle de pragas (Santana et al., 2019).

França et al. (2016) mostraram que as AGH's **5**, **6**, **7** e **8** (**Figura 3A**) são ativas contra cepas de carcinoma de cólon (HCT-8), melanoma (MDA-MB-435) e glioblastoma (SF-295), com $GI_{50} < 100 \mu M$. Além disso, o composto **5** foi considerado o composto menos tóxico quando avaliado contra macrófagos J774. Nesse contexto, o derivado **9** demonstrou atividade anti-inflamatória e analgésica via redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias, aumento da produção de IL-10 e redução da atividade neuronal em camundongos (Sandes et al., 2018), além da capacidade de reduzir o estresse oxidativo e ação anti-inflamatória em um modelo de roedor com sepse neonatal (Heimfarth et al., 2020). Por fim, foram avaliados derivados de aminoguanidina em diferentes esqueletos aromáticos contra o *T. cruzi*, os quais apresentaram LC_{50} (concentração necessária para matar 50% dos parasitas) na faixa de 17 - 876 μM , sendo o composto **10** (**Figura 3A**) o mais ativo da série avaliada.

Baseado nas potencialidades das aminoguanidinas hidrazonas e interessados em explorar as atividades do grupo hidrazinoimidazolina devido à ampla gama de atividades biológicas, que incluem antimicrobiana, antiproliferativa (Sztanke et al., 2006), antinociceptiva (Sztanke et al., 2005), anti-*T. Cruzi* (Pereira et al., 2023), entre outros, foram desenhados e avaliados moléculas contendo esse grupo. Além disso, alguns compostos com anéis de cinco membros são descritos por sua atividade contra algumas doenças, como o **11**, que apresentou CL_{50} de 0,1 a 1 μM (Caputto et al., 2012; Hammoud et al., 2018), cerca de 500 mais ativo que **4**. Assim, neste trabalho, foram sintetizados compostos incorporando grupos aromáticos ou heterocíclicos ao núcleo da hidrazinoimidazolina (**Figura 3B**), e foi avaliado as atividades antiproliferativa e antioxidante, bem como foram realizados estudos biofísicos explorando o modelo de DNA, para estabelecer o possível mecanismo de ação dos compostos.

Figura 3. A) Alguns exmplos de AGH's bioativos descritos na literatura. B) Modificação proposta no núcleo do sistema aminoguanidínico.



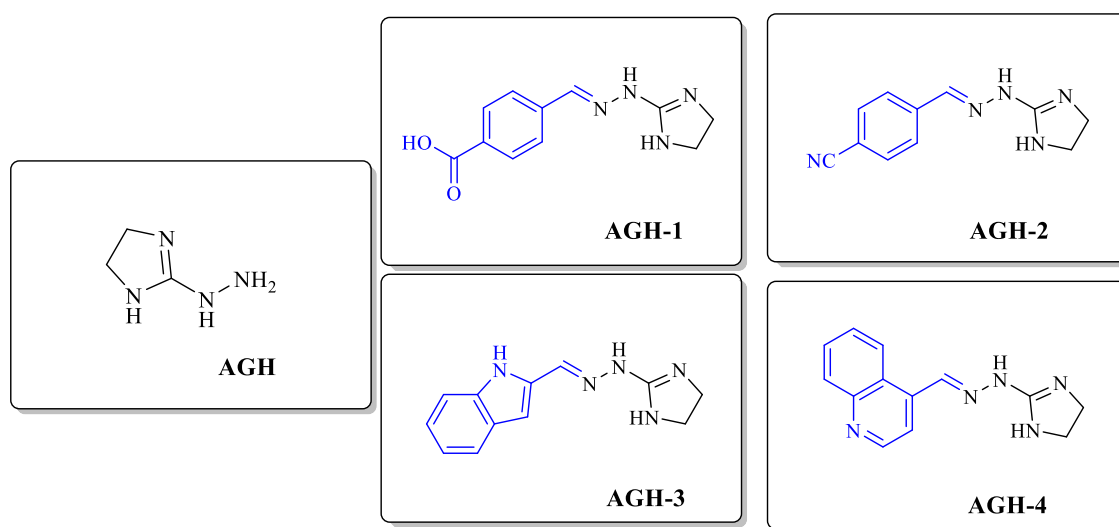
Fonte: Autor, 2024.

5. 3. Resultados e Discussão

5.3.1. Geral

As estruturas das moléculas **AGH-1 – AGH-4** avaliadas estão apresentadas na **Figura 4**, onde o núcleo básico aminoguanidínico dessas moléculas foi mantido e variou-se uma porção das moléculas com grupos aromáticos e ou heterocíclicos aromáticos com grupos eletrodoadores e eletroretiradores. A síntese e caracterização estrutural dos compostos, bem como, os demais dados descritos a seguir estão detalhados por Guimarães et al., (2024).

Figura 4. Estrutura dos derivados aminoguanidinas hidrazonas avaliados.



Fonte: Autor, 2024.

5.3.2. Atividade antioxidante

A avaliação da capacidade antioxidante dos derivados de aminoguanidinas **AGH-1 – AGH-4** foi realizada por meio dos ensaios de sequestro dos radicais $\text{DPPH}^\bullet$, $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e $\bullet\text{NO}$, além do potencial de redução de íons Fe(III) (FRAP) (**Tabela 4 e Figura 4**). Nesta avaliação foram empregados como controles positivos para comparação o ácido gálico (ácido fenólico), Trolox[®] (mimético da vitamina E), quercetina (flavonóide) e ácido caféico (ácido fenólico conjugado), os quais são compostos antioxidantes de diferentes classes e graus de lipofilicidade.

Tabela 4. Capacidade antioxidante dos derivados aminoguanidicos e dos padrões, medidas pelos métodos DPPH•, ABTS^{•+} e FRAP.

Compostos/ Padrões	Métodos			
	IC ₅₀		FRAP (A ₇₀₀ , 10 µg mL ⁻¹)	FRAP* (A ₇₀₀ / µmol L ⁻¹)
	DPPH• (µmol L ⁻¹)	ABTS ^{•+} (µmol L ⁻¹)		
AGH-1	1160 ± 37 ^a	33,4 ± 11,9 ^{a, b}	0,375 ± 0,050 ^a	2,02 ± 0,27 ^a
AGH-2	273 ± 3 ^b	47,3 ± 4,4 ^c	0,367 ± 0,010 ^a	1,83 ± 0,05 ^a
AGH-3	48,9 ± 1,5 ^c	32,3 ± 3,4 ^b	0,496 ± 0,010 ^b	2,62 ± 0,05 ^b
AGH-4	181,4 ± 0,4 ^d	124 ± 1 ^d	0,351 ± 0,030 ^a	1,94 ± 0,05 ^a
Ácido gálico	15,3 ± 7,8 ^e	9,90 ± 5,82 ^a	0,854 ± 0,020 ^c	2,91 ± 0,07 ^{b, c}
Trolox[®]	66,3 ± 4,8 ^f	41,9 ± 2,0 ^b	0,515 ± 0,030 ^b	2,58 ± 0,02 ^b
Quercetina	19,2 ± 7,4 ^e	4,63 ± 3,28 ^a	0,496 ± 0,030 ^b	2,99 ± 0,18 ^c
Ácido caféico	26,6 ± 4,2 ^e	21,1 ± 6,4 ^{a, c}	0,768 ± 0,010 ^d	2,77 ± 0,04 ^{b, c}

Concentração (µM) necessária para reduzir 50% da espécie radicalar (IC₅₀); Os valores estão sendo apresentados como média ± SD (n = 3). Os valores seguidos por diferentes letras subscritas (a-f) na mesma coluna são correspondentes a diferenças significativas pelo teste de Tukey (p < 0.05). *Absorvância normalizada (Abs/concentração, µmol L⁻¹).

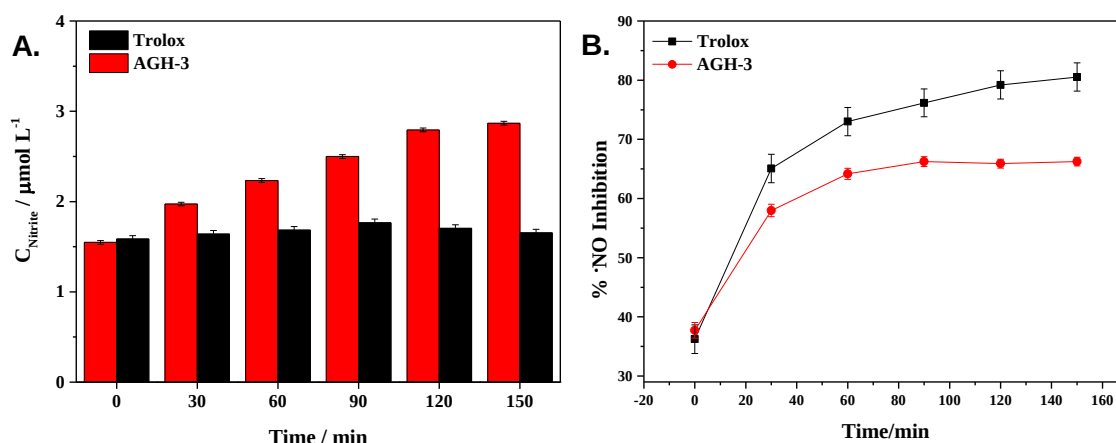
Fonte: Autor, 2024.

Para o ensaio empregando o radical DPPH• o derivado **AGH-3** foi o mais ativo dentre os compostos avaliados, inclusive com valor de IC₅₀ menor que o Trolox[®] (**Tabela 4**), contudo de 2 - 3 vezes menos efetivo que os outros controles positivos. Sztanke et al. (2018) apresentaram resultados semelhantes para alguns derivados hidrazinoimidazolina empregando o ensaio com radical DPPH•, enquanto que Baldisserotto et al., (2020) obtiveram valores de IC₅₀ entre 10,9 a 7113 µmol TE g⁻¹ para derivados indólicos. De modo similar, para o ensaio ABTS^{•+}, o **AGH-3** apresentou o menor IC₅₀ da série de compostos avaliados, sendo mais efetivo que o Trolox[®], e o IC₅₀ de 2 - 7 vezes maior comparado aos ácidos fenólicos e a quercetina. Faillace et al. (2020), encontraram resultados diferentes para imidazolinias sulfuradas e oxigenadas, em que foram necessários 500 µM dos compostos para inibir de 22 a 99% do radical ABTS^{•+}.

Quanto ao método de redução de ferro (FRAP), foi possível notar que o **AGH-3** foi o composto mais eficiente (0,496 ± 0,010) da série avaliada, chegando a apresentar uma atividade comparável ao padrão Trolox[®] (0,515 ± 0,030). Além disso, após normalização dos valores (A₇₀₀ / µmol L⁻¹), o **AGH-3** exibiu uma atividade semelhante aos padrões ácido caféico e ácido gálico. Baldisserotto et al. (2020) avaliando compostos com o núcleo indólico conseguiram valores de 15,1 a 12049 µmol TE g⁻¹ (equivalentes de trolox) de redução de ferro. Mihailo Vic et al. (2017), por outro lado, conseguiram resultados semelhantes aos **AGH-1** - **AGH-4**, para derivados diacilidrazinas e 1,3,4-oxadiazóis em termos de unidade de absorvância (0,173 a 0,478).

Por desenvolver um papel crucial no processo inflamatório, além de estar associado a processos cancerígenos, o radical $\bullet\text{NO}$ é uma espécie pró-oxidante que requer atenção, em que inibidores desta espécie representam um avanço terapêutico significativo, principalmente no controle de doenças que expressam ação inflamatória (Solaiman et al., 2020). Assim, avaliou-se a capacidade de sequestro de radical $\bullet\text{NO}$ do **AGH-3** (mais ativo nos ensaios anteriores) utilizando o Trolox[®] como padrão (**Figura 5**). A capacidade antioxidante foi analisada durante 150 min. Inicialmente (tempo zero), o **AGH-3** e o Trolox[®] inibiram aproximadamente 38% do radical gerado, contudo, a inibição do **AGH-3** foi 22,3% menor quando comparado ao padrão.

Figura 5. Gráficos que expressam a capacidade do derivado aminoguanidínico **AGH-3** e o padrão Trolox[®] em sequestrar o radical $\bullet\text{NO}$. A) Concentração de nitrito formada em função do tempo de reação. B) Porcentagem de inibição em função do tempo.



Fonte: Autor, 2024.

A diferença em atividade de eliminação de radicais livres entre os quatro compostos avaliados, pôde ser relacionado à presença dos diferentes substituintes na porção aminoguanidina. Neste sentido, notou-se que a presença do heterocíclico aromático indólico, associado à presença de 3 centros de ligação de hidrogênio aumentou significativamente a atividade antioxidante do **AGH-3** em relação aos demais compostos da série avaliada. Assim, vale ressaltar que as ligações de hidrogênio em compostos na forma neutra não aumentam a atividade antioxidante, mas após a abstração do hidrogênio, há uma maior facilidade na estabilização do radical (Scott et al., 2007). O **AGH-2** que também demonstrou eficácia frente alguns radicais avaliados, apresenta um grupo eletroretirador forte (-CN), o qual pode auxiliar no processo de estabilização da espécie

radicalar formada. De um modo geral, esses estudos indicam que os compostos avaliados podem apresentar dois mecanismos de ação antioxidante, transferência de átomo de hidrogênio (HAT), quando apresentaram atividade via método ABTS^{•+} e DPPH[•] e, transferência de elétrons quando exibiram atividade antioxidante via FRAP (Gulcin, 2020). Neste sentido, levando em consideração a eficiente atividade antioxidante frente aos métodos avaliados, decidiu-se avaliar os compostos quanto a sua atividade antiproliferativa frente a diferentes cepas de células cancerígenas humanas.

5.3.3. Atividade antiproliferativa

A atividade antiproliferativa *in vitro* dos derivados aminoguanidínicos foi realizado de acordo com o modelo NCI-60, em que os derivados foram testados contra um painel de linhagens celulares tumorais e não tumorais humanas (**Tabela 5**). A atividade média contra linhagens de células tumorais evidenciou que o **AGH-3** (média do log (GI₅₀) = 1,3), foi o derivado aminoguanidínico mais ativo, seguido por o **AGH-2** e **AGH-4** (média do log médio (GI₅₀) = 2). O **AGH-1** apresentou-se inativo (GI₅₀ > 900 µM para todas as linhagens celulares). O **AGH-3**, o mais ativo mostrou efeito citostático promissor contra adenocarcinomas renais (786-0, GI₅₀ = 6,3 µM), ovarianos (OVCAR-03, GI₅₀ = 11,0 µM), colorretais (HT-29, GI₅₀ = 13,5 µM) e leucemia (K562, GI₅₀ = 16,0 µM). Além disso, os compostos **AGH-2** – **AGH-4** apresentaram índices de seletividade (IS) inferiores a 3 para diversas linhagens celulares (El-Miligy et al., 2018; Hassan et al., 2021). As exceções foram **AGH-2** contra 786-0 (IS = 8,9) e linhas celulares OVCAR-03 (IS = 2,8) (**Tabela 5**). O índice de seletividade refere-se à toxicidade no alvo (Muller; Milton, 2012) sugerindo que os derivados de aminoguanidina avaliados podem induzir *in vivo* alguns efeitos adversos relacionados à inibição do crescimento celular em tecidos normais, como mucosa e medula óssea. Avaliação complementares *in vivo* são necessárias para avaliar esta hipótese.

Os dados aqui produzidos (**Tabela 5**) permitem racionalizar que a atividade antiproliferativa dos **AGH-1** - **AGH-4**, pode estar associada a pelo menos dois fatores: (i) a presença de centros doadores e aceptadores de ligações de hidrogênio e (ii) a propriedade eletrônica associada à presença de grupos eletrodoadores e eletroretiradores de elétrons. Os compostos de maior atividade inibitória mantêm respectivamente, uma relação 3/2 ou 2/3 quanto aos centros de ligações doadoras ou receptoras de ligação de hidrogênio. Além disso, os substituintes retiradores de elétrons nos derivados **AGH-1** e

AGH-2 reduziram o efeito citostático, resultados semelhantes foram descritos para derivados de éster do ácido cafeico (Xie et al., 2017).

O processo de anelação levou ao aumento da atividade antiproliferativa do **AGH-3** e do **AGH-4**, em relação ao demais compostos, possivelmente devido ao aumento da lipofilicidade dos compostos, consequentemente levando a uma maior penetração na bicamada lipídica das células.

Tabela 5. Perfil antiproliferativo dos compostos **AGH-1 - AGH-4** e da doxorubicina (controle positivo).

Parâmetros	AGH-1		AGH-2		AGH-3		AGH-4		Doxorubicin	
	GI ₅₀ ^a	S.I. ^b	GI ₅₀	S.I.	GI ₅₀	S.I.	GI ₅₀	S.I.	GI ₅₀	S.I.
U251	> 900	n.c.	164.0	1.5	20.4	0.6	96.3	0.9	0.48	1.0
MCF-7	> 900	n.c.	239.0	1.0	30.7	0.4	99.8	0.9	0.31	1.5
NCI-ADR/RES	> 900	n.c.	90.9	2.8	85.3	0.1	94.3	1.0	0.57	0.8
786-0	> 900	n.c.	28.0	8.9	6.3	2.0	91.2	1.0	0.09	5.3
NCI-H460	> 900	n.c.	289.0	0.9	15.1	0.8	99.0	0.9	0.18	2.7
PC-3	> 900	n.c.	314.0	0.8	28.1	0.5	98.4	0.9	1.43	0.3
OVCAR-03	> 900	n.c.	59.8	4.2	11.0	1.2	92.0	1.0	1.99	0.2
HT-29	> 900	n.c.	273.0	0.9	13.5	0.9	96.2	0.9	2.21	0.2
K562	> 900	n.c.	191.0	1.3	16.0	0.8	113.0	0.8	0.69	0.7
Mean										
log(GI ₅₀) ^c	n.c.	n.c.	2.2	-	1.3	-	2.0	-	- 0.2	-
HaCaT	> 900	-	250	-	12.7	-	90.1	-	0.48	-

^aConcentração (µM) necessária para provocar 50% de inibição da proliferação celular (GI₅₀); ^bÍndice de seletividade (I.S.): calculado como $IS = (GI_{50} \text{ (HaCaT)}) / (GI_{50} \text{ célula tumoral})$; ^cMédia do log GI₅₀: atividade antiproliferativa média expressa em escala logarítmica; n.c. = não calculado (valores de IG₅₀ maiores e/ou menores que as concentrações experimentais (0,25 a 250 µg mL⁻¹ para AGH-1 - AGH-4; 0,025 a 25 µg mL⁻¹ para doxorubicina). Tempo de exposição = 48 h. Após Nos ensaios, os valores de GI₅₀ em µg mL⁻¹ foram normalizados para µM. Linhas celulares tumorais humanas: U251 = glioblastoma; MCF-7 = adenocarcinoma da mama; NCI-ADR/RES = adenocarcinoma de ovário multirresistente; 786-0 = adenocarcinoma de rim; NCI-H460 = carcinoma de células não pequenas do pulmão; PC-3 = adenocarcinoma da próstata; OVCAR-03 = adenocarcinoma do ovário; HT-29 = adenocarcinoma colorretal; K562 = leucemia mielóide crônica. linha celular tumoral: queratinócito imortalizado (HaCaT).

Fonte: Elaborado por: Folglio, Mary Ann, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unicamp, 2024.

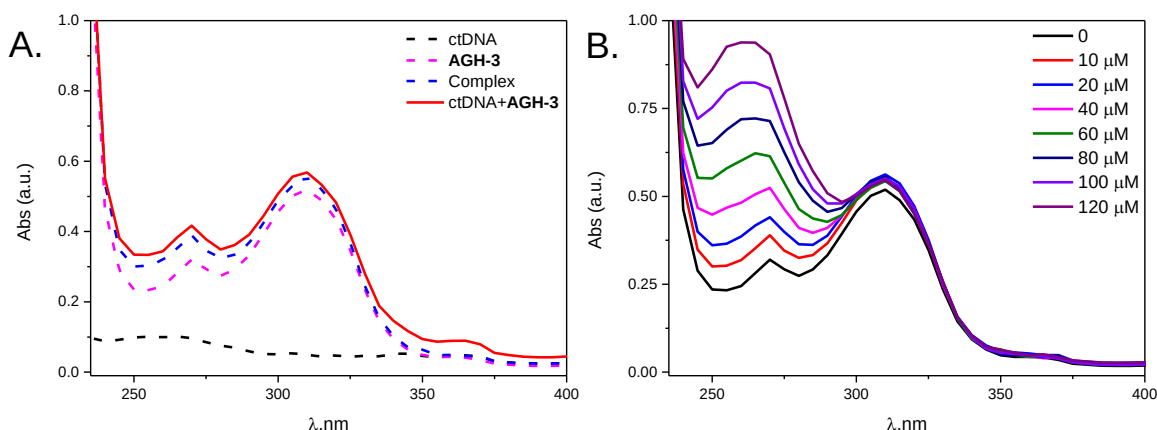
A doxorubicina, o controle positivo experimental, é uma antraciclina não seletiva. O composto é descrito como um medicamento multialvo que se liga à enzima topoisomerase II, intercalando o DNA e inibindo a RNA polimerase I, induzindo assim a morte celular (Tacar; Sriamornsak; Dass, 2013). Com base na avaliação de longo prazo de potenciais medicamentos anticâncer, o NCI propôs que o perfil antiproliferativo pode refletir o mecanismo de ação de um composto (Shoemaker, 2006). Assim, as diferenças observadas entre **AGH-1** - **AGH-4** e a doxorubicina sugeriram que os derivados aminoguanidínicos podem apresentar mecanismos de ação diferentes da doxorubicina. Nessa linha, compostos com substituintes indol foram relatados como afetando a proliferação celular por ligação ao DNA (Lončar et al., 2021; Lafayette et al., 2017). Assim, a interação do derivado aminoguanidínico contendo um substituinte indol (**AGH-3**) com um modelo de ácido nucléico foi avaliada.

5.3.4. Interação do **AGH-3** com ctDNA

5.3.4.1. Estudos por UV-vis

A espectrometria de absorção no UV-vis foi utilizada nos estudos iniciais para avaliação da formação do complexo **AGH-3**-ctDNA, pois esta técnica permite determinar a formação de complexos supramoleculares e possíveis alterações estruturais na macromolécula a partir de mudanças espectrais (Sirajuddin; Ali; Badshah, 2013; Wang et al., 2019). As absorções do **AGH-3** livre em 310 nm ($A_{\text{AGH-3}} = 0,5193$), do ctDNA ($A_{\text{ctDNA}} = 0,0491$) e do complexo **AGH-3**-ctDNA ($A_{\text{complex}} = 0,5566$) foram registradas (**Figura 6**). Uma vez que os valores das absorvâncias do complexo **AGH-3**-ctDNA (A_{complexo}) foram diferentes da soma dos valores das absorvâncias do ligante e ctDNA livres ($A_{\text{AGH-3}} + A_{\text{ctDNA}}$), ou seja, $A_{\text{AGH-3}} + A_{\text{ctDNA}} \neq A_{\text{AGH-3-ctDNA}}$, é um indicativo que houve a formação de complexo entre o ligante avaliado e a macromolécula (Silva et al., 2016; Wu et al., 2007).

Figura 6. Espectros de absorção no UV-vis dos diferentes sistemas. **A)** ctDNA e **AGH-3** a 10 μM . **B)** Titulação espectrofotométrica do **AGH-3** (10 μM) com diferentes concentrações do ctDNA. Condição: pH = 7,4 em Tris-HCl 50 mM com 100 mM NaCl a 30 $^{\circ}\text{C}$.



Fonte: Autor, 2024.

A formação do complexo do DNA com pequenas moléculas altera a magnitude da posição da banda de absorvância em 260 nm, a qual pode ser correlacionada com a força do processo de interação (Afrain et al. 2017; Thomas; Sukumaran; Sudarsanakumar, 2019). O efeito hipercrômico é um indicativo de variações estruturais na dupla hélice do ctDNA quando complexada ao **AGH-3** (Husain et al. 2017; Sirajuddin; Ali; Badshah, 2013) assim como, a ocorrência de interações não covalentes entre o derivado aminoguanidínico e o ácido nucléico (Rehman et al 2015).

5.3.4.2. Avaliação da interação de ctDNA-AGH-3 por fluorescência molecular

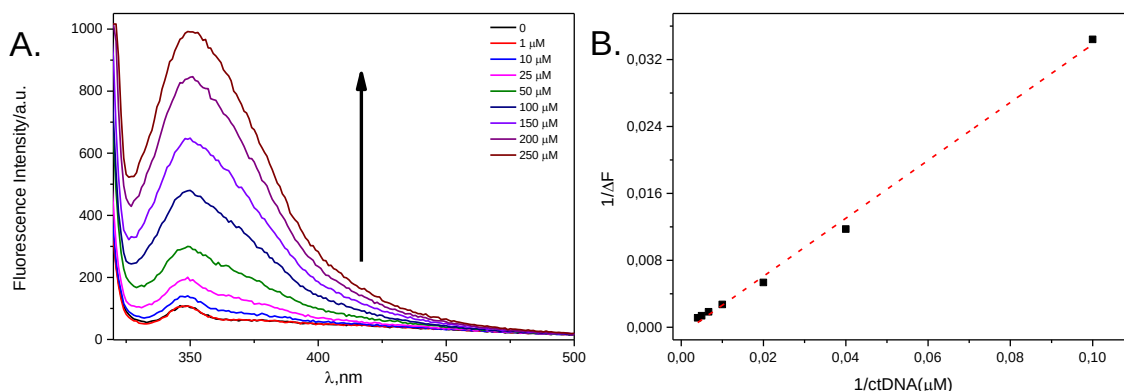
Os parâmetros de ligação referente ao processo de interação do **AGH-3** com o ctDNA foram determinados por meio de titulação fluorimétrica. A adição de quantidades crescentes de ctDNA às soluções contendo o derivado aminoguanidínico **AGH-3**, levou ao aumento da intensidade de fluorescência (**Figura 6A**) proporcional à concentração do ligante. Assim, racionalizou-se que devido ao processo de interação **AGH-3**-ctDNA houve restrição à rotação do composto, o qual tornou-se mais planar aumentando a sobreposição dos orbitais π , e desta forma, intensificando a emissão de fluorescência (Da Silva et al., 2017; Han et al., 2014). Em condição de pH fisiológico, o composto **AGH-3** [$\text{pK}_{a1} = 1,93$ (grupo imínico), $\text{pK}_{a2} = 7,56$ (grupo imidazolínico), $\text{pK}_{a3} = 14,16$ (grupo indólico)] encontra-se distribuído na forma de duas espécies principais, uma neutra (41%) e outra protonada (59%), as quais podem ligar-se a macromolécula por interações eletrostáticas e ligação de hidrogênio, influenciando assim, nas propriedades espectroscópicas do complexo supramolecular. A constante de ligação (K_b), para o

complexo **AGH-3**-ctDNA foi calculada a partir da linearização da equação de Benesi-Hildebrand modificada (**Equação 2**):

$$\frac{1}{\Delta F} = \frac{1}{K_b(F - F_0)[DNA]} + \frac{1}{F - F_0} \quad (\text{Equação 2})$$

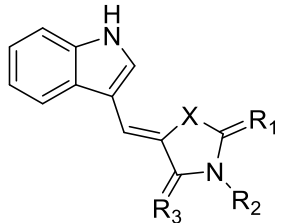
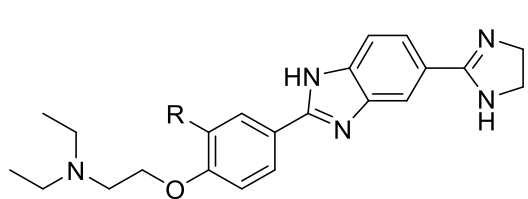
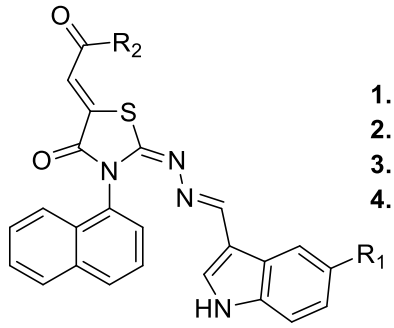
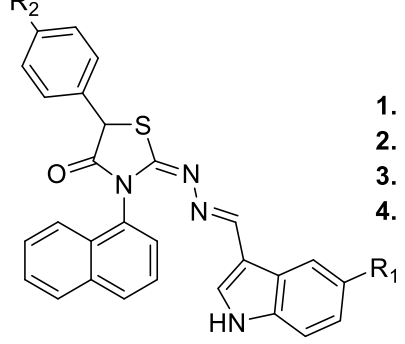
Na qual, F e F_0 são as intensidades de fluorescência na presença e na ausência da espécie, respectivamente, K_b refere-se à constante de ligação e $[ctDNA]$ à concentração da macromolécula. A constante de ligação foi calculada a partir da linearização $1/(F - F_0)$ vs. $1/[C_{ctDNA}]$ (**Figura 7B**), em que K_b apresentou o valor de $2.89(\pm 0.11) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Compostos com o núcleo indólico e diferentes padrões estruturais apresentam magnitude de K_b de 3.80×10^3 a $4.17 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ao interagirem com ácido nucleico (ctDNA) em condições fisiológicas (**Tabela 6**).

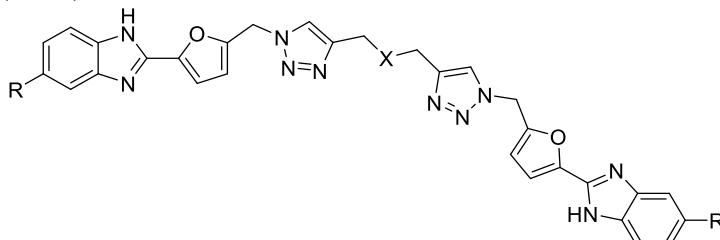
Figura 7. Avaliação da interação **AGH-3**-ctDNA por fluorescência molecular (condição: pH =7.4, Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl) a 30 °C. **A)** Espectro do **AGH-3** (10 μM) com adições crescentes (1, 10, 25, 50, 100, 150, 200 e 250 μM) de ctDNA. **B)** Gráfico de $1/(\Delta F)$ versus $1/[C_{DNA}]$ utilizado para a determinação de K_b .



Fonte: Autor, 2024.

Tabela 6. Parâmetros de interação com ctDNA para alguns compostos semelhantes às AGH's avaliadas.

 1- X= R₁=S; R₂=NH₂; R₃=O 2- X=R₁= S; R₂=H; R₃=O 3- X= S; R₁=R₃=O; R₂=H 4- X= NH; R₁=R₃=S; R₂=NH₂ Ácido nucléico- ctDNA Kb- (1) 5,69×10⁴ (2) 4,51×10⁴ (3) 7,26×10⁴ (4) 6,27×10⁴ M⁻¹ Técnica- UV-Vis K_{SV} Competição- *N. E. Modo de ligação- N. E. pH- 7.6 Referência- Lafayette et al. (2017)	 1- R=H 2- R=F 3- R=OCH₃ Ácido nucléico- ctDNA Kb-(1) 7.94×10⁵ (2) 1.0×10⁶ (3) 6.31×10⁶ M⁻¹ Técnica- Fluorescência K_{SV} Competição- N. E. Modo de ligação- N. E. pH- 7.0 Referência- Popov et al. (2017)
 1. R₁=H R₂=CH₃ 2. R₁=H R₂=CH₂CH₃ 3. R₁=Br R₂=CH₃ 4. R₁=Br R₂=CH₂CH₃ Ácido nucléico- ctDNA Kb- (1) 1.24×10⁶ (2) 2.55×10⁶ (3) 6.89×10⁵ (4) 1.36×10⁶ M⁻¹ Técnica- UV-Vis K_{SV} Competição- [EB-ctDNA] (1) 0.54×10⁴ (2) 0.38×10⁴ (3) 0.74×10⁴ (4) 0.63×10⁴ M⁻¹	 1. R₁=H R₂=Br 2. R₁=H R₂=H 3. R₁=Br R₂=Br 4. R₁=Br R₂=H Ácido nucléico- ctDNA Kb- (1) 2.08×10⁵ (2) 6.99×10⁶ (3) 3.12×10⁶ (4) 1.1×10⁶ M⁻¹ Técnica- UV-Vis K_{SV} Competição- [EB-ctDNA] (1) 0.43×10⁴ (2) 0.77×10⁴ (3) 0.69×10⁴ (4) 0.77×10⁴ M⁻¹

[DAPI-ctDNA] (1) 0.60×10^4 (2) 2.58×10^4 (3) 7.59×10^4 (4) 2.65×10^4 M^{-1} Modo de ligação- <i>Groove</i> pH- 7.6 Referência- Alves et al. (2021)	[DAPI-ctDNA] (1) 4.02×10^4 (2) 4.59×10^4 (3) 2.13×10^4 (4) 2.72×10^4 M^{-1} Modo de ligação- <i>Groove</i> pH- 7.6 Referência- Alves et al. (2021)
	
Ácido nucléico- ctDNA Kb- (1) 4.17×10^7 (2) 1.10×10^7 (3) 4.79×10^5 (4) 1.62×10^5 (5-6) $\sim 1.00 \times 10^4$ M^{-1} Modo de ligação- <i>Groove</i> Técnica- UV-Vis pH- 7.0 Referência- Popov et al. (2019)	

1. X=CH₂ R= 4,5-dihydro-1H-imidazol-3-ium
2. X=CH₂ R= Cl
3. X=O R= (isopropylamino)methaniminium
4. X=O R= Cl
5. X=[1,1'-biphenyl]-4,4'-diol R= Cl
6. X=[1,1'-biphenyl]-4,4'-diol R= H

*N.E. - Não estabelecido; Kb: Constante de ligação; Ksv: Constante de Stern-Volmer.

Fonte: Autor, 2024.

5.3.4.3. Estudos de competição por fluorescência

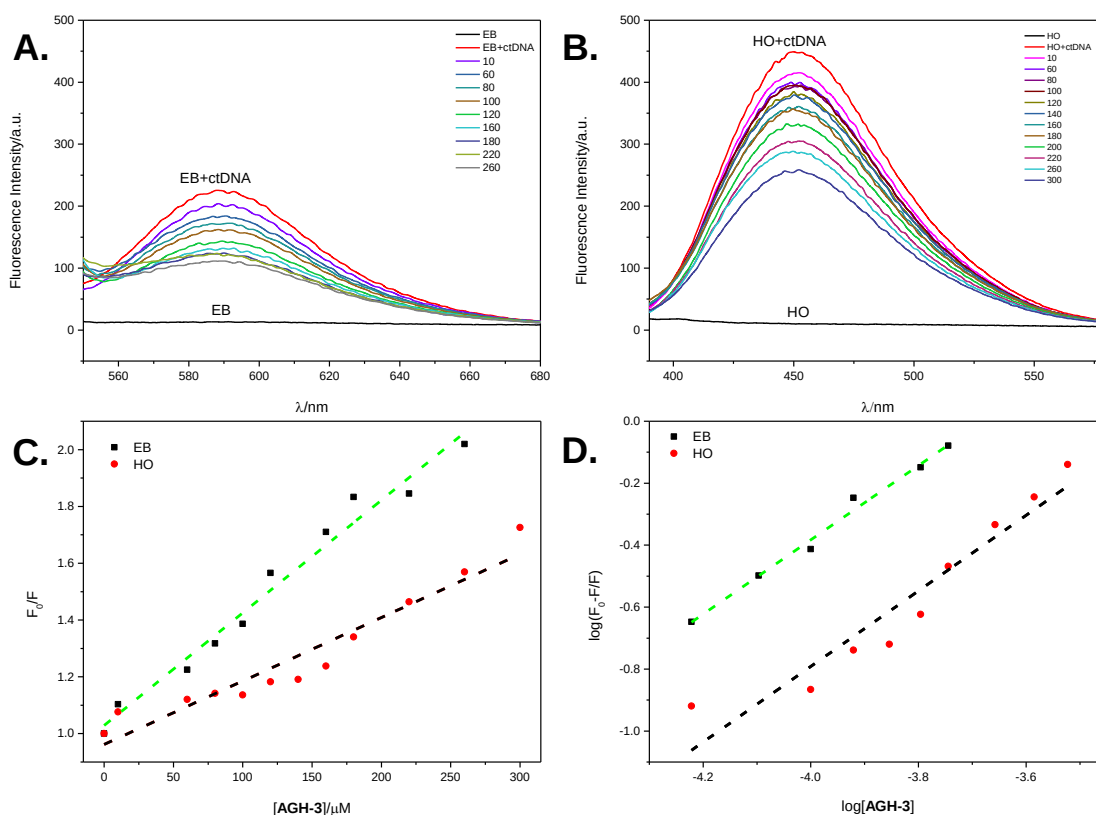
O modo de interação entre **AGH-3** e ctDNA foi determinado a partir de ensaio de competição empregando sondas clássicas com modo de ligação bem estabelecido com DNA, neste caso, foi usado o Hoechst (HO, groove menor) e o brometo de etídio (EB, intercalante) (Husain et al. 2017; Huang et al. 2015; Prieto et al. 2014). O EB e HO são sondas que na forma livre apresentam baixa intensidade de fluorescência em meio aquoso, mas ao interagirem com os pares de bases da dupla hélice do DNA exibem aumento na intensidade de emissão de fluorescência (Mirzaei-Kalar, 2018). Assim, no ensaio de competição se o ligante **AGH-3** desloca HO ou EB do complexo sonda-DNA, ocorre redução da intensidade do sinal analítico indicando que o composto avaliado apresenta o mesmo modo de ligação da sonda deslocada (HO ou EB). A magnitude do processo de redução da intensidade de fluorescência na presença do **AGH-3** foi calculada a partir da constante de Stern-Volmer (K_{SV}) (**Equação 3**):

$$\frac{F}{F_0} = 1 + K_{SV}[\text{PA83}] \quad \text{Equação (3)}$$

F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do **AGH-3**, respectivamente. A constante de Stern-Volmer (K_{SV}) foi determinada a partir do *slope* da linearização da relação (F_0/F) vs. $[\text{AGH-3}]$. Desta forma, o modo de ligação preferencial do **AGH-3** com o ctDNA foi avaliado adicionando quantidades crescentes desse, aos sistemas EB-ctDNA e HO-ctDNA. A adição de **AGH-3** em ambos os sistemas sonda-ctDNA (sonda = HO ou EB) levou à supressão da intensidade de fluorescência, assim, de forma indireta a magnitude do processo de interação (K_b) e a estequiometria do complexo **AGH-3**-ctDNA (n) foram calculados a partir da linearização da **Equação 4** (Qais et al. 2017; Kalaivani et al. 2013), baseada na relação $\log[(F_0 - F)/F]$ vs. $\log[\text{AGH-3}]$ (**Figura 8.A - D**).

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_b + n \log[\text{PA83}] \quad \text{Equação (4)}$$

Figura 8. Avaliação do modo de interação **AGH-3**-ctDNA (condição: pH=7.4, Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, 100 mmol L⁻¹ NaCl) a 30 °C. (A) Competição do **AGH-3** com o complexo EB-ctDNA. (B) Competição do **AGH-3** com o complexo HO-ctDNA. (C) Gráfico de Stern-Volmer para o **AGH-3**. (D) Curva logarítmica para o cálculo da constante de ligação do **AGH-3** com ctDNA.



Fonte: Autor, 2024.

Os valores de K_{SV} para os sistemas EB-ctDNA [$3.97 (\pm 0.22) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$] e HO-ctDNA [$2.23 (\pm 0.20) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$], a partir da titulação com o **AGH-3** indicou que o ligante foi capaz de deslocar ambas as sondas de forma similar, contudo com certa preferência para o modo de ligação por intercalação (**Tabela 7**). Este comportamento foi verificado também quanto à constante de ligação indireta sendo obtidos valores de $K_b = 2.59 (\pm 0.65) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (EB-ctDNA) e $1.22 (\pm 0.72) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (HO-ctDNA) (**Tabela 7**), indicando que a afinidade do ligante moderada para o ácido nucléico (WU et al., 2007). Santos-Junior et al. (2021) avaliando derivados tiazol-quinolina com os mesmos sistemas sonda-ctDNA utilizados nesse trabalho, e conseguiram valores de K_{SV} iguais a $5.90 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (EB-ctDNA) e $3.13 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (HO-ctDNA) e K_b de $2.30 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ (EB-ctDNA) e $4.30 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (HO-ctDNA), indicando maior afinidade dos ligantes pela região do *groove* menor. Alves et al. (2021) por outro lado, conseguiram valores de K_{SV} na ordem de 10^4 M^{-1} para derivados indólicos quando utilizado sistemas de competição intercalante (EB-ctDNA) e *groove* menor (DAPI-ctDNA). Assim, para determinar a afinidade relativa e confirmar o

modo de interação preferencial, calculou-se a probabilidade intercalativa do **AGH-3** (Phadte et al., 2019), o qual apresentou 62% de preferência pelo modo de ligação por intercalação (**Tabela 7**), corroborando com os valores de K_{sv} e K_b apresentados previamente. Por fim, os valores de n para os dois sistemas avaliados foram aproximadamente 1, demonstrando que a interação **AGH-3**-ctDNA ocorre com uma estequiométrica 1:1 (**Tabela 7**).

Tabela 7. Valores das constantes de Stern-Volmer (K_{SV}), constante de ligação (K_b), número de sítios (n) e probabilidade intercalativa do modo de interação entre o **AGH-3** e o ctDNA (ou sonda-ctDNA) para 25°C.

Sonda	Constante de Stern-Volmer		Parâmetros de ligação			Probabilidade intercalativa ao ctDNA para o AGH-3 ¹	
	K_{SV} (10^3 M^{-1})	R	K_b (10^4 M^{-1})	R	N	I_{EB} / G_{HO}	%I
EB	3.97 ± 0.22	0.98833	2.59 ± 0.65	0.9944	1.18 ± 0.04	1.64	62
HO	2.23 ± 0.20	0.96188	1.22 ± 0.72	0.9667	1.22 ± 0.14		

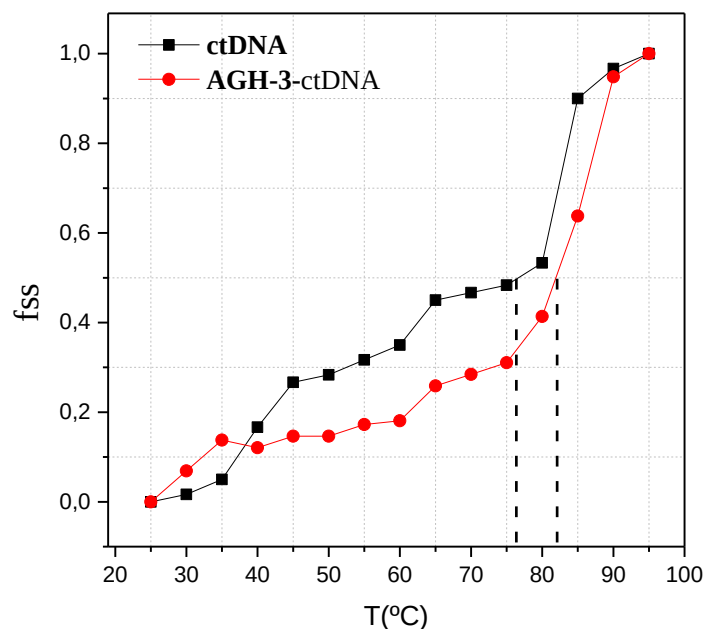
¹Critérios calculados: $I_{50}/G_{50} = I_{EB} / I_{HO}$, onde $I_{proEB} = \log[K_{b(proEB)}] / C_{50}$. O parâmetro C_{50} é a concentração (μM) de **AGH-3** para 50% do *quenching* de fluorescência para a sonda EB ou HO em condições experimentais. A %I foi determinada usando a seguinte equação: $\%I = [1 + (I_{50}/G_{50})^{-1}]^{-1} \times 100\%$ (PHADTE et al., 2019). $K_{b(EB)} = 7.75 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ and $K_{b(HO)} = 4.75 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (Anuradha; Alam; Chaudhury, 2010). K_b : Constante de ligação; K_{sv} : Constante de Stern-Volmer; EB: Brometo de etídeo; HO: Hoechst

Fonte: Autor, 2024.

5.3.4.4. Estudos de desnaturação térmica do DNA

A dupla hélice do DNA pode ser estabilizada pelas ligações de hidrogênio e interações de empilhamento entre as bases purinas e pirimidinas que compõem a macromolécula. O aumento da temperatura leva ao enfraquecimento dessas forças que estabilizam a estrutura helicoidal da macromolécula e assim, levando à separação dos pares de bases e formação de fitas simples de DNA. Esse processo é conhecido como desnaturação térmica do DNA e o valor de temperatura (T_m) em que se tem 50% do DNA na forma de fita simples e 50% na forma de fita dupla é empregado como parâmetro para avaliação do modo de ligação (Qais et al., 2017; Qais; Ahmad, 2018). Desta forma, quando pequenas moléculas interagem com o DNA podem ocorrer variações no valor de T_m , os quais são dependentes do modo preferencial de ligação. O valor de T_m para o ctDNA livre e o complexo **AGH-3**-ctDNA foi de 76,2 e 82,2°C ($\Delta T_m = 6^\circ\text{C}$), respectivamente (**Figura 9**). Desta forma, como a $\Delta T_m > 5^\circ\text{C}$ tem-se um indicativo que o modo de ligação preferencial de **AGH-3**-ctDNA seria por intercalação (Hussain et al., 2021), corroborando com os estudos espectroscópios baseados em ensaios de competição.

Figura 9. Curva de desnaturação térmica do ctDNA livre e do complexo formados entre a macromolécula e o derivado aminoguanidínico hidrazona (**AGH-3**-ctDNA).



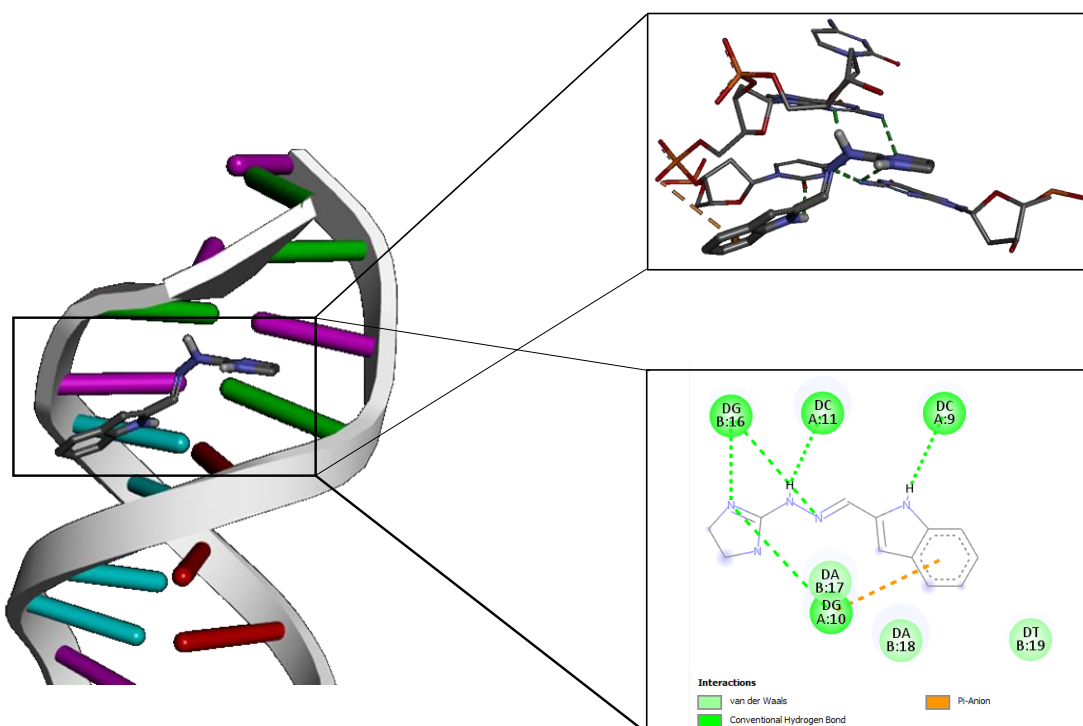
Fonte: Autor, 2024.

5.3.4.5. Estudos de *Docking* molecular

Os resultados de *docking* molecular são frequentemente usados para prever ou provar a interação entre um ligante e uma molécula alvo, como no caso do ligante **AGH-3** e DNA. (Meng et al., 2011; Stanzione; Giangreco; Cole, 2021) Embora a precisão das previsões de *docking* dependam da qualidade dos modelos de estrutura molecular, dos parâmetros de energia e dos métodos de cálculo utilizados, essas previsões, são frequentemente capazes de fornecer informações úteis sobre a interação molecular.

Neste caso específico, os resultados de *docking* molecular sugerem que o ligante **AGH-3** interage com pares de bases no sulco principal do DNA, e também entre esses pares de bases, através de uma combinação de ligações de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações π -aniôns (**Figura 10**). Além disso, o valor de energia de afinidade (ΔG de -7,7 KJ mol) sugere que o processo de interação entre o **AGH-3** e o DNA é favorável. Assim, como os resultados experimentais também mostraram que o ligante **AGH-3** interage com o DNA nas posições previstas pelo modelo de *docking* molecular, pode-se afirmar que os resultados teóricos corroboraram os resultados experimentais.

Figura 10. Docking molecular entre o ligante **AGH-3** e o DNA (PDB ID:1BNA). Formação do complexo (**AGH-3**-DNA) e interação entre o ligante (**AGH-3**) e a macromolécula (DNA).



Fonte: Autor, 2024.

5.4. Conclusão

O composto **AGH-3** foi o derivado que apresentou a atividade antioxidante mais promissora sendo melhor que o Trolox[®], e foi o mais efetivo frentes às linhagens celulares tumorais avaliadas. O mecanismo de ação do derivado **AGH-3** possivelmente está relacionado à interação ao DNA, a qual ocorreu via formação de um complexo supramolecular fluorescente, preferencialmente por intercalação. Assim, pode-se sugerir que a presença do grupo indólico, associado a grupos aminoguanidínicos pode aumentar a atividade antioxidante, a afinidade de ligação ao DNA e a atividade anticâncer de novos compostos.

6. Referências

AFRIN, S. *et al.* Molecular spectroscopic and thermodynamic studies on the interaction of anti-platelet drug ticlopidine with calf thymus DNA. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 186, p. 66–75, nov. 2017.

ALVES, J. E. F. *et al.* Novel indole-thiazole and indole-thiazolidinone derivatives as DNA groove binders. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 170, p. 622–635, 2021.

ANDRADE, G. R. *et al.* Synthesis and X-ray structural characterization of square-pyramidal copper(II) complex with aminoguanidine derivative. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 61, p. 210–213, 2015.

BALDISSEROTTO, A. *et al.* Synthesis and evaluation of antioxidant and antiproliferative activity of 2-arylbenzimidazoles. **Bioorganic chemistry**, v. 94, p. 103396, jan. 2020.

BAUM, T. *et al.* GENERAL PHARMACOLOGIC ACTIONS OF THE ANTIHYPERTENSIVE AGENT 2,6-DICHLOROBENZYLIDENE AMINOGUANIDINE ACETATE (WY-8678). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 171, n. 2, p. 276 LP – 287, 1 fev. 1970.

CALLEJO, G. *et al.* In silico screening of GMQ-like compounds reveals guanabenz and sephin1 as new allosteric modulators of acid-sensing ion channel 3. **Biochemical pharmacology**, v. 174, p. 113834, abr. 2020.

CAPUTTO, M. E. *et al.* Synthesis and biological evaluation of some novel 1-indanone thiazolylhydrazone derivatives as anti-Trypanosoma cruzi agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 155–163, set. 2012.

EL-MILIGY, M. M. M. *et al.* Dual inhibitors of hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma: Design, synthesis and docking studies. **Future Science OA**, v. 4, n. 1, 2018.

FAILLACE, M. S. *et al.* Sulfated and Oxygenated Imidazoline Derivatives: Synthesis, Antioxidant Activity and Light-Mediated Antibacterial Activity. **ChemMedChem**, v. 15, n. 10, p. 851–861, 2020.

FOYE, W. O. *et al.* Synthesis and biological activity of guanylhyazones of 2- and 4-pyridine and 4-quinoline carboxaldehydes. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 79, n. 6, p. 527–530, jun. 1990.

FRANÇA, P. H. B. *et al.* Preliminary in vitro evaluation of the anti-proliferative activity of guanylhyazone derivatives. **Acta pharmaceutica (Zagreb, Croatia)**, v. 66, n. 1, p. 129–137, mar. 2016.

FUSADE-BOYER, M. *et al.* Evaluation of the Antiviral Activity of Sephin1 Treatment and Its Consequences on eIF2 α Phosphorylation in Response to Viral Infections. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 134, 2019.

GULCIN, İ. **Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview**. [s.l.: s.n.]. v. 94

HAMMOUD, H. *et al.* Aminoguanidine Hydrazone Derivatives as Nonpeptide NPFF1 Receptor Antagonists Reverse Opioid Induced Hyperalgesia. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 9, n. 11, p. 2599–2609, 21 nov. 2018.

HAN, L. *et al.* A multi-spectroscopic approach to investigate the interaction of prodigiosin with ct-DNA. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 123, p. 497–502, 2014.

HASSAN, G. S. *et al.* Mechanistic selectivity investigation and 2D-QSAR study of some new antiproliferative pyrazoles and pyrazolopyridines as potential CDK2 inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 218, p. 113389, 2021.

HEIMFARTH, L. *et al.* Indole-3-guanylhyazone hydrochloride mitigates long-term cognitive impairment in a neonatal sepsis model with involvement of MAPK and NF κ B pathways. **Neurochemistry International**, v. 134, p. 104647, 2020.

HO, K.-H. *et al.* Guanabenz Sensitizes Glioblastoma Cells to Sunitinib by Inhibiting GADD34-Mediated Autophagic Signaling. **Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 18, n. 2, p. 1371–1392, abr. 2021.

HUANG, S. *et al.* Thermodynamic investigation of the interaction between the [(η 6-p-cymene)Ru(benzaldehyde-N4-phenylthiosemicarbazone)Cl]Cl anticancer drug and ctDNA: multispectroscopic and electrochemical studies. **RSC Adv.**, v. 5, n. 53, p. 42889–42902, 2015.

HUSAIN, M. A. *et al.* Interaction of indomethacin with calf thymus DNA: a multi-spectroscopic{,} thermodynamic and molecular modelling approach. **Med. Chem. Commun.**, v. 8, n. 6, p. 1283–1296, 2017.

HUSSAIN, I. *et al.* Exploring the binding mechanism of β -resorcylic acid with calf thymus DNA: Insights from multi-spectroscopic, thermodynamic and bioinformatics approaches. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 260, p. 119952, 2021.

KALAIVANI, P. *et al.* Synthesis, spectral, X-ray crystallography, electrochemistry, DNA/protein binding and radical scavenging activity of new palladium(II) complexes containing triphenylarsine. **Inorganica Chimica Acta**, v. 405, p. 415–426, 2013.

KARAGHIOSOFF, K. *et al.* N -Nitroso- and N -Nitraminotetrazoles. p. 1295–1305, 2006.

KIM, S. H.; SEMENYA, D.; CASTAGNOLO, D. Antimicrobial drugs bearing guanidine moieties: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 216, p. 113293, 2021.

KREZEL, I. *et al.* New mitoguazone analogues with anticancer activity. **Pharmacy and Pharmacology Communications**, v. 5, n. 8, p. 485–490, 1999.

LAFAYETTE, E. A. *et al.* Synthesis of novel indole derivatives as promising DNA-binding agents and evaluation of antitumor and antitopoisomerase I activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 136, p. 511–522, 2017.

LAFRATE, A. L. *et al.* Synthesis and biological evaluation of guanylhyazone coactivator binding inhibitors for the estrogen receptor. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 23, p. 10075–10084, dez. 2008.

LI, T. *et al.* Modulation of α -adrenoceptor signalling protects photoreceptors after retinal detachment by inhibiting oxidative stress and inflammation. **British journal of pharmacology**, v. 176, n. 6, p. 801–813, mar. 2019.

LONČAR, B. *et al.* Novel amino substituted tetracyclic imidazo[4,5-b]pyridine derivatives: Design, synthesis, antiproliferative activity and DNA/RNA binding study. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 217, p. 113342, 2021.

MARTYNOWICZ, J. *et al.* Guanabenz reverses a key behavioral change caused by latent toxoplasmosis in mice by reducing neuroinflammation. **mBio**, v. 10, n. 2, 2019.

MARTYNOWICZ, J.; DOGGETT, J. S.; SULLIVAN, W. J. J. Efficacy of Guanabenz Combination Therapy against Chronic Toxoplasmosis across Multiple Mouse Strains. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 64, n. 9, ago. 2020.

MENG, X.-Y. *et al.* **Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery**. [s.l: s.n.].

MESSEDER, J. C. *et al.* Aromatic guanyl hydrazones: Synthesis, structural studies and in vitro activity against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n. 24, p. 3079–3084, 1995.

MIHAILOVIĆ, N. *et al.* Synthesis and antioxidant activity of 1{,}3{,}4-oxadiazoles and their diacylhydrazine precursors derived from phenolic acids. **RSC Adv.**, v. 7, n. 14, p. 8550–8560, 2017.

MIRZAEI-KALAR, Z. In vitro binding interaction of atorvastatin with calf thymus DNA: multispectroscopic, gel electrophoresis and molecular docking studies. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 161, p. 101–109, nov. 2018.

MULLER, P. Y.; MILTON, M. N. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 10, p. 751–761, 2012.

PAESANO, N. *et al.* Synthesis and biological evaluation of 3-benzyl-1-methyl- and 1-methyl-3-phenyl-isothioureas as potential inhibitors of iNOS. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 3, p. 539–543, 2005.

PASERO, C. *et al.* Alkyl-guanidine Compounds as Potent Broad-Spectrum Antibacterial Agents: Chemical Library Extension and Biological Characterization. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 20, p. 9162–9176, 2018.

PEREIRA, C. N. *et al.* Synthesis by microwave irradiation of new pyrazole-imidazoline-pyrimidine analogs: Physicochemical and photophysical properties and their biological activity against *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Molecular Structure**, v. 1290, 15 out. 2023.

PHADTE, A. A. *et al.* Spectroscopic and viscometric determination of DNA-binding modes of some bioactive dibenzodioxins and phenazines. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 18, n. March, p. 100629, 2019.

POPOV, A. B. *et al.* Novel symmetric bis-benzimidazoles: Synthesis, DNA/RNA binding and antitrypanosomal activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 173, p. 63–75, 2019.

PRIETO, D. *et al.* A fast, low cost, and highly efficient fluorescent DNA labeling method using methyl green. **Histochemistry and cell biology**, v. 142, n. 3, p. 335–345, set. 2014.

QAIS, F. A. *et al.* Interaction of capsaicin with calf thymus DNA: A multi-spectroscopic and molecular modelling study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 392–402, 2017.

QAIS, F. A.; AHMAD, I. In vitro interaction of cefotaxime with calf thymus DNA: Insights from spectroscopic, calorimetric and molecular modelling studies. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 149, p. 193–205, fev. 2018.

REHMAN, S. U. *et al.* Studying non-covalent drug-DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 576, p. 49–60, 2015.

RUIZ, A. *et al.* Sephin1 protects neurons against excitotoxicity independently of the integrated stress response. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 1–11, 2020.

SANDES, S. M. S. *et al.* Evidence for the involvement of TNF- α , IL-1 β and IL-10 in the antinociceptive and anti-inflammatory effects of indole-3-guanyldiazide hydrochloride, an aromatic aminoguanidine, in rodents. **Chemico-biological interactions**, v. 286, p. 1–10, abr. 2018.

SANTANA, C. C. *et al.* Evaluation of guanyldiazone derivatives as inhibitors of *Candida rugosa* digestive lipase: Biological, biophysical, theoretical studies and biotechnological application. **Bioorganic Chemistry**, v. 87, p. 169–180, 2019.

SANTOS-JUNIOR, P. F. DA S. *et al.* Synthesis of hybrids thiazole-quinoline, thiazole-indole and their analogs: in vitro anti-proliferative effects on cancer cell lines, DNA binding properties and molecular modeling. **New Journal of Chemistry**, v. 45, n. 31, p. 13847–13859, 2021.

SARWAR ALAM, M.; KUMAR CHAUDHURY, N. **Osmolyte Changes the Binding Affinity and Mode of Interaction of Minor Groove Binder Hoechst 33258 with Calf Thymus DNA**. **Chem. Pharm. Bull.** [s.l: s.n.].

SCOTTI, L. *et al.* Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacéuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, p. 153–166, 2007.

SHAO, Y. *et al.* Synthesis and DNA cleavage activity of 2-hydrazinyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine containing hydroxy group. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, n. 13, p. 4274–4279, jul. 2009.

SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 10, p. 813–823, 2006.

SIDORYK, K. *et al.* The synthesis of indolo[2,3-b]quinoline derivatives with a guanidine group: Highly selective cytotoxic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 105, p. 208–219, 2015.

SILVA, C. M. DA *et al.* Studies on free radical scavenging, cancer cell antiproliferation, and calf thymus DNA interaction of Schiff bases. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 172, p. 129–138, 2017.

SILVA, M. M. *et al.* Interaction of β -carboline with DNA: Spectroscopic studies, correlation with biological activity and molecular docking. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 9, p. 1558–1568, 2016.

SILVA, M. P. G. DA *et al.* Electrochemical Evaluation of Aminoguanidine Hydrazone Derivative with Potential Anticancer Activity: Studies of Glassy Carbon/CNT and Gold Electrodes Both Modified with PAMAM. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 11, n. 01, p. 33–48, 2020.

SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 124, p. 1–19, jul. 2013.

SOLAIMAN, M. A. *et al.* Synthesis of Ag-NPs developed by green-chemically method and evaluation of antioxidant activities and anti-inflammatory of synthesized nanoparticles against LPS-induced NO in RAW 264.7 macrophages. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 29, n. September, p. 101832, 2020.

SONG, M. *et al.* Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activities, and molecular docking studies of N-arylsulfonylindoles containing an aminoguanidine, a semicarbazide, and a thiosemicarbazide moiety. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 166, p. 108–118, 2019.

STANZIONE, F.; GIANGRECO, I.; COLE, J. C. Use of molecular docking computational tools in drug discovery. In: **Progress in Medicinal Chemistry**. [s.l.] Elsevier B.V., 2021. v. 60p. 273–343.

SZTANKE, K. *et al.* Antinociceptive activity of new imidazolidine carbonyl derivatives. Part 4. Synthesis and pharmacological activity of 8-aryl-3,4-dioxo-2H,8H-6,7- dihydroimidazo[2,1-c] [1,2,4]triazines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 127–134, fev. 2005.

_____. Novel derivatives of methyl and ethyl 2-(4-oxo-8-aryl-2H-3,4,6,7-tetrahydroimidazo[2,1-c][1,2,4]triazin-3-yl)acetates from biologically active 1-aryl-2-hydrazinoimidazolines: Synthesis, crystal structure and antiproliferative activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 12, p. 1373–1384, dez. 2006.

SZTANKE, M.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M.; SZTANKE, K. Biologically and chemically important hydrazino-containing imidazolines as antioxidant agents. **Free radical research**, v. 52, n. 6, p. 685–697, jun. 2018.

TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, 2013.

THOMAS, R. K.; SUKUMARAN, S.; SUDARSANAKUMAR, C. Photobehaviour and in vitro binding strategy of natural drug, chlorogenic acid with DNA: A case of groove binding. **Journal of Molecular Structure**, v. 1178, p. 62–72, 2019.

WANG, R. *et al.* Interaction of isoeugenol with calf thymus DNA and its protective effect on DNA oxidative damage. **Journal of Molecular Liquids**, v. 282, p. 356–365, 2019.

WU, J. *et al.* Novel N-(3-carboxyl-9-benzyl-carboline-1-yl)ethylamino acids: synthesis, anti-proliferation activity and two-step-course of intercalation with calf thymus DNA. **Molecular bioSystems**, v. 3, n. 12, p. 855–861, dez. 2007.

XIE, J. *et al.* Antiproliferative activity and SARs of caffeic acid esters with mono-substituted phenylethanols moiety. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 27, n. 2, p. 131–134, jan. 2017.

XIE, W. *et al.* Guanabenz Attenuates Acetaminophen-Induced Liver Toxicity and Synergizes Analgesia in Mice. **Chemical Research in Toxicology**, v. 33, n. 1, p. 162–171, 2020.

ZAMPERINI, C. *et al.* Identification, synthesis and biological activity of alkyl-guanidine oligomers as potent antibacterial agents. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

7. Seção 2- Estudos biofísicos de interação e inibição da urease utilizando bases de Schiff derivadas de tiossemicarbazonas híbridas com pirazóis

7.1. Introdução

A urease (ureia amidohidrolase EC 3.3.1.5) é uma metaloenzima níquel dependente. Essa enzima encontra-se amplamente distribuída na natureza e em organismos vivos, encontrando-se em bactérias, leveduras, fungos, algas, resíduos de animais e plantas (Kafarski e Talma, 2018; Kappaun *et al.*, 2018). No entanto, todas catalisam a hidrólise da ureia em amônia ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}(\text{s}) + \text{H}_2\text{O}(\text{l}) \rightarrow \text{NH}_3(\text{g}) + \text{CO}_2(\text{g})$) (Lage *et al.*, 2018; Tavares *et al.*, 2023). As consequências da hidrólise da ureia induzida pela urease e o aumento do pH causado pela produção de NH_3 desencadeiam problemas em diversos setores. A presença dessas enzimas no solo, no estômago e na urina humano requer atenção especial do ponto de vista econômico, agrícola, clínico e ambiental, uma vez que está associada a diversos problemas. Em humanos, a bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) pode colonizar o estômago levando a doenças, como úlceras gástricas, gastrite, e até o desenvolvimento de câncer de estômago (Graham e Miftahussurur, 2018; Tavares *et al.*, 2022). Outras bactérias ureolíticas, como *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) e *Proteus mirabilis*, estão envolvidos em pneumonias, formação de cálculos renais e infecções no trato urinário (Paczosa e Mecsas, 2016; Svane *et al.*, 2020). Na agricultura, bactérias ureolíticas estão presentes nas fezes e urina dos animais e no solo, sendo responsáveis por perdas consideráveis de nitrogênio tanto no chorume quanto de fertilizantes sintéticos, como a ureia. Essa perda de nitrogênio ocorre junto a emissão de gases que podem contribuir com o efeito estufa (Ding *et al.*, 2023; Patra e Aschenbach, 2018). Bactérias ureolíticas estão presentes nas urinas e são responsáveis por aumentar a velocidade de liberação da amônia, um dos principais responsáveis pelo cheiro desagradável em banheiros (Senecal e Vinnerås, 2017; Vasiljev *et al.*, 2022).

Numerosos desafios associados às bactérias ureolíticas impulsionam pesquisas contínuas sobre estratégias para controlar a atividade ureolítica desses microrganismos. A inibição da urease é frequentemente empregada no tratamento médico de infecções causadas por bactérias ureolíticas (Rego *et al.*, 2018; Svane *et al.*, 2020). Essa inibição geralmente é realizada por meio de pequenos inibidores moleculares que são seguros e metabolicamente estáveis *in vivo*. Na agricultura, são utilizadas outras moléculas pequenas inibidoras de urease, especialmente o tiofosfato de N-(*n*-butil)-triamida (NBPT), como aditivos em formulações de fertilizantes sintéticos de ureia. Isso visa

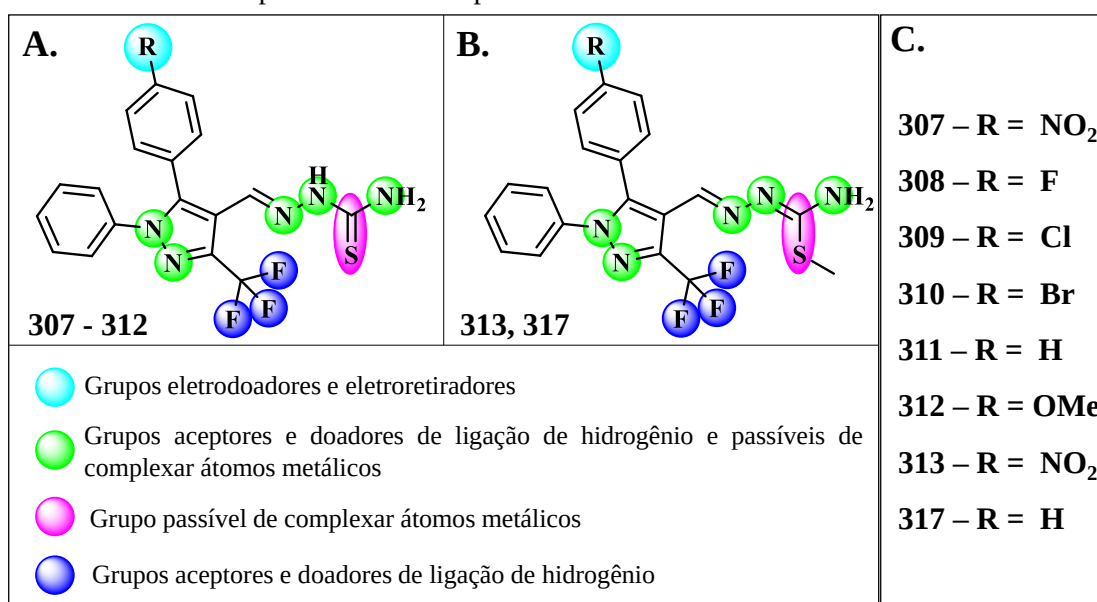
reduzir a perda de nitrogênio do fertilizante nos campos, retardando o processo de volatilização da amônia para o ambiente (Kafarski e Talma, 2018; Kappaun *et al.*, 2018). Em banheiros, ainda não são utilizadas medidas de controle do processo de catalise da hidrólise da ureia, são utilizados hidrocarbonetos clorados como agentes odorizantes (Zhou *et al.*, 2024) para sobrepor o cheiro da amônia volatilizada e de outros gases que liberam odores indesejados.

Esses problemas destacam áreas de aplicação dos inibidores de urease e a importância de um conjunto diversificado de compostos, capazes de atuar efetivamente contra a urease em contextos variados, abrangendo desde aplicações farmacêuticas e agrícolas até na área de saneantes. Nessa linha, destacam-se as bases de *Schiff*, uma classe de composto descrita na literatura por possuir diversas atividades biológicas, incluindo: aplicações como sondas fluorescentes (Shellaiah *et al.*, 2024; Sun *et al.*, 2023), atividade antioxidantes (Kareem *et al.*, 2021), anti-HIV (Khadra *et al.*, 2015), antiurease (Menteşe *et al.*, 2017), antifúngica e anticancerígena (Jain *et al.*, 2023) entre outras. As tiossemicarbazonas por sua vez, são uma classe de moléculas que possuem a porção imina (base de *Schiff*). Devido a presença dos grupos C=S e NH atuando como sítios de coordenação doadores de elétrons, as tiossemicarbazonas apresentam uma ampla variedade de propriedades farmacológicas, incluindo atividade antimicrobiana (Gupta *et al.*, 2022), atividade antimalárica (Oliveira *et al.*, 2008), atividade antiproliferativa (Findik *et al.*, 2023) e atividade antiureolítica, a qual pode estar associada à sua semelhança estrutural com a uréia (Gupta *et al.*, 2022; Islam *et al.*, 2023). Atrelado a essas, destacamos também os pirazóis, uma classe de compostos heterocíclicos com alto interesse medicinal (Faria *et al.*, 2023). Esse heterocíclico está presente em medicamentos aprovados por órgãos de regulamentação, como a ANVISA, entre eles pode-se citar o celecoxibe um inibidor seletivo anti-inflamatório da COX-2 e o alopurinol, utilizado no tratamento da gota (Li *et al.*, 2022). Dessa maneira, a combinação destes grupos farmacofóricos pode conduzir à formação de uma gama de compostos altamente bioativos. Neste estudo, investigou-se o perfil inibitório da urease Jeak Beans (*Canavalia ensiformis*) por meio de uma série de bases de *Schiff* derivadas de tiossemicarbazonas e híbridas com pirazóis em diferentes sistemas *in vitro*. Além disso, foi examinado o possível mecanismo de ação desta classe, selecionando um potencial composto para o desenvolvimento de novos inibidores da urease.

7.3. Resultados e discussão

As bases de *Schiff* híbridas com pirazóis e derivadas de tiossemicarbazonas (**307-313** e **317**) foram sintetizadas por meio de reações de ciclocondensação pelo grupo de pesquisa de Síntese de Heterocíclicos (SINTHET) da UEM. A síntese foi coordenada pela Dra. Fernanda Andreia Rosa e os detalhes estão documentados na literatura (Camargo *et al.*, 2020). Os compostos tiveram seu potencial de inibição da urease avaliados, empregando como controle positivo a tioureia (TIO), tiofosfato de N-(*n*-butil)-triamida (NBPT) e a hidroxirúria (HU). A **Figura 11** ilustra a estrutura geral dos compostos avaliados e destaca os principais grupos funcionais que podem se envolver na formação de interações essenciais para o processo de inibição da urease.

Figura 11. Estrutura e destaque dos principais grupos presentes nas moléculas e suas características. **A.** Núcleo básico dos compostos **307 – 312**. **B.** Núcleo básico dos compostos **313** e **317**. **C.** Substituintes presentes nos compostos **307 – 313** e **317**.



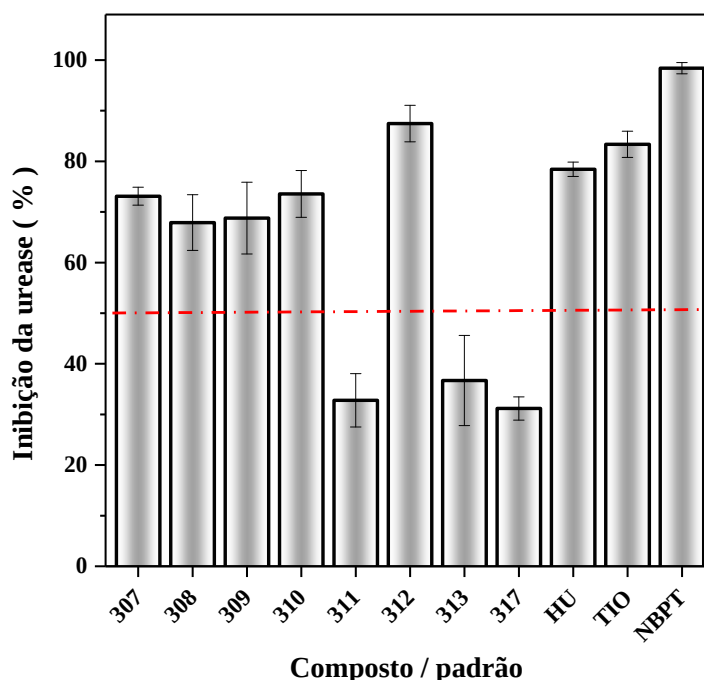
Fonte: Autor, 2024.

7.2.1. Inibição *in vitro* da urease

Os estudos de inibição enzimática foram realizados usando o método do indofenol, também conhecido como método de Berthelot, na presença de urease Jeak Beans (*Canavalia ensiformis*) e ureia. Inicialmente foi realizado um *screening* numa concentração fixa (100 μ M) e comparando com os inibidores clássicos TIO, NBPT e HU para selecionar os compostos mais ativos (**Figura 12**). Nas condições avaliadas (100 μ M), os compostos inibiram a urease numa faixa de 31 a 87%, podendo esses resultados estarem associados justamente a presença dos grupos destacados nas estruturas da **Figura**

11.A e B. Zahra *et al.*, (2022) avaliaram aciltioureas à base de acetilfenol e observaram que a atividade desses compostos estava atrelada principalmente a presença de grupos eletrodoadores, eletrodoadores, bem como a presença de grupos passíveis de serem aceptores e doadores de ligações de hidrogênio. Assim, os compostos **307 – 310** e o **312** apresentaram inibição da urease superior a 50% (**Figura 12**). Assim, os resultados do *screening* na concentração de 100 μM mostraram que os compostos do núcleo 1 (**Figura 11A**) apresentaram percentuais de inibição da urease superior aos compostos do núcleo 2 (**Figura 11B**), podendo esses resultados estarem associados à presença da metila no átomo de enxofre, em que, os dois pares de elétrons livres nesse átomo (núcleo 1), podem levar a um processo de complexação mais efetiva de átomos metálicos (Islam *et al.*, 2023), como os níqueis presentes no sítio ativo da urease, por exemplo. Nesse caso específico, a proposta de interação pode ser sugerida por meio da teoria de Pearson para ácidos e bases moles e duros. Como o Ni(II) caracteriza-se como um ácido intermediário, tenderia a interagir mais efetivamente com regiões mais duras, como as presentes nas moléculas do núcleo 1, onde o enxofre não possui a metila.

Figura 12. Percentual de inibição da urease *C. ensiformis* pelas bases de Schiff híbridas com pirazóis e derivadas de tiossemicarbazonas na concentração de 100 μM . Condições: Tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 30 °C.



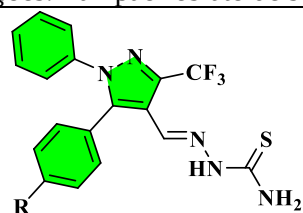
Fonte: Autor, 2024.

Em seguida, o valor de IC_{50} das bases de *Schiff* híbridas com pirazóis e derivadas de tiossemicarbazonas foi determinado pelo método gráfico (**Figura 25** em anexo) em

comparação aos inibidores (**Tabela 8**) para selecionar aquele com menor valor contra a urease *Jack bean*.

Os resultados do IC_{50} de inibição da urease demonstraram que a presença do grupo eletrodoador (OMe) aumentou em até 3 vezes a inibição da urease pelo composto **312** em relação aos compostos com grupos eletroretiradores (**307** – **310**). Isso pode estar associado a um fenômeno *push-pull* nas moléculas, onde a presença do grupo doador de elétrons pode aumentar a densidade eletrônica em regiões específicas da molécula. Essas regiões, por sua vez, podem interagir de forma mais eficiente com os resíduos de aminoácidos na enzima ou mesmo com os cofatores no sítio ativo. O efeito *push-pull* de híbridos pirazois é muito explorado pra aplicações fotofísicas (Nair; Sunil Kumar; Sivan, 2022). Além disso, quando se compara com inibidores clássicos da urease, o composto **312** apresentou um IC_{50} de inibição dessa enzima comparável estatisticamente ao padrão TIO (teste de *Tukey*, $p < 0,05$).

Tabela 8. Concentração dos compostos e padrões capaz de inibir 50% a atividade enzimática da urease *C. ensiformis* (IC_{50}). Condições: Tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 30 °C.



Ligante	R	IC_{50} (μM)	Ligante	R	IC_{50} (μM)
307	NO ₂	64,12 $\pm$ 6,56 ^{a,b}	312	OCH ₃	25,18 $\pm$ 0,73 ^c
308	F	72,61 $\pm$ 0,21 ^a	NBPT	-	0,23 $\pm$ 0,0 ^d
309	Cl	76,09 $\pm$ 3,56 ^a	TIO	-	25,34 $\pm$ 0,24 ^c
310	Br	57,01 $\pm$ 9,35 ^b	HU	-	11,1 $\pm$ 2,67 ^e

Os valores estão sendo apresentados como média $\pm$ SD ($n = 3$). Os valores seguidos por diferentes letras sobrecritas (a-e) nas colunas, são correspondentes a diferenças significativas pelo teste de *Tukey* ($p < 0.05$).

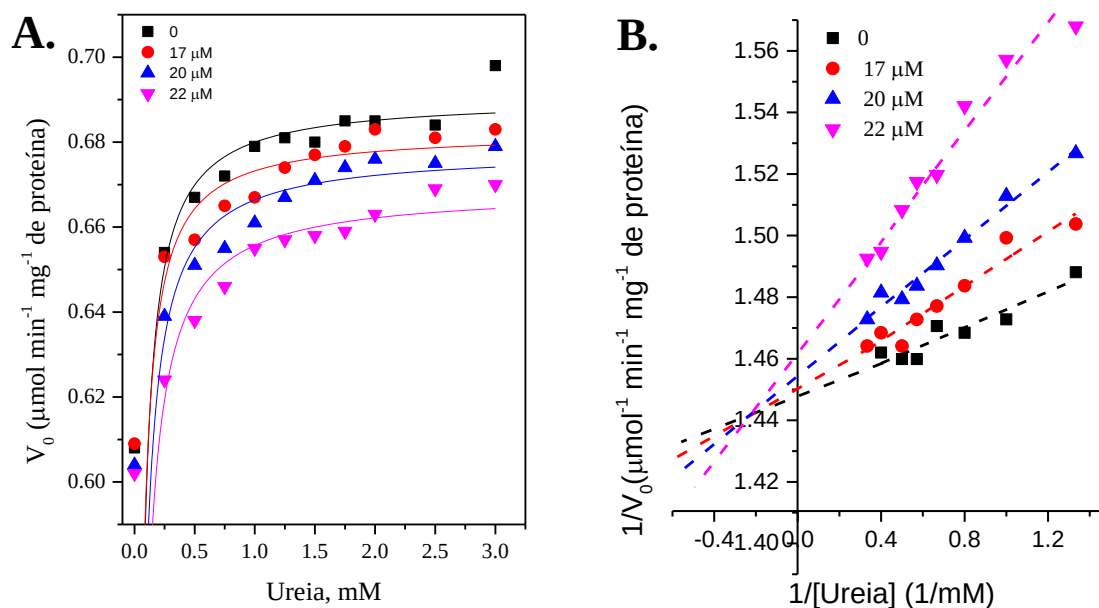
Fonte: Autor, 2024.

7.2.2. Mecanismo de inibição

O modo de ação do composto mais ativo **312** foi avaliado a partir de estudos cinéticos usando diferentes concentrações do composto (17, 20 e 22 μM) e do substrato (0,25 – 3,0 mM) (**Figura 13**). Nas condições avaliadas, a urease apresentou uma cinética Michaeliana, em que, o gráfico da velocidade inicial (V_0) versus concentração de uréia

(mM) apresentou um comportamento hiperbólico (**Figura 13A**), com uma constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) nas reações livres de inibidor de urease igual a $0,015 \pm 0,009$ mM e $0,690 \pm 0,098$ NH_4^+ $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína, respectivamente.

Figura 13. (A) Hipérbole de Michaelis-Menten e (B) gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk para o composto 312 com a urease. Condições: urease 56 mU, Tampão fosfato 20 mM, pH 7.4 30 °C.



Fonte: Autor, 2024.

O gráfico Lineweaver-Burk (**Figura 13B**), foi usado para avaliar o mecanismo de inibição do 312 e o efeito desse sobre as constantes K_m e $V_{m\acute{a}x}$. Os ajustes lineares cruzaram-se em um ponto no segundo quadrante, antes de tocar o eixo das abscissas (**Figura 13B**), perfil característico de uma inibição do tipo mista para a urease (Jeak Beans) (Mittal, Singh e Benjakul, 2023). O aumento da concentração do inibidor, por sua vez, acarretou num aumento de K_m e uma diminuição de $V_{m\acute{a}x}$ (**Tabela 9**), assim como a razão $K_m/V_{m\acute{a}x}$ diminuiu com o aumento da concentração do inibidor, indicando um tipo de inibição mista (Jiang et al., 2021; Mittal, Singh e Benjakul, 2023; Ochs, 2000). O aumento no valor de K_m , atrelado aos valores de K_i (constante de dissociação do equilíbrio 312-urease) e K_i' (constante de dissociação do equilíbrio 312-urease-ureia), 40 ± 18 e $0,28 \pm 0,08$ mM respectivamente, indicam preferência de ligação do composto pela enzima livre e complexada.

Tabela 9. Parâmetros de cinéticos para o 312-urease. Condições: Condição: Tampão fosfato de sódio, 20 mM, pH 7.4.

312 (μM)	K_m app (mM)	V_{max} app (μmol $\text{NH}_4^+ \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína)	V_{max} app /K_m app	K_i (μM)	K_i'(μM)
0	0,015 $\pm$ 0,009	0,690 $\pm$ 0,098	46,0		
17	0,014 $\pm$ 0,009	0,682 $\pm$ 0,097	48,7	40 $\pm$ 18	0,28 $\pm$ 0,08
20	0,017 $\pm$ 0,001	0,678 $\pm$ 0,098	39,9		
22	0,019 $\pm$ 0,002	0,669 $\pm$ 0,098	35,2		

K_M app: Constante de Michaelis-Menten na presença do inibidor. V_{max} app: Velocidade máxima da urease na presença do inibidor. K_i: Constante de dissociação do equilíbrio para o complexo 312-urease. K_i': Constante de dissociação do equilíbrio para o complexo 312-urease-ureia

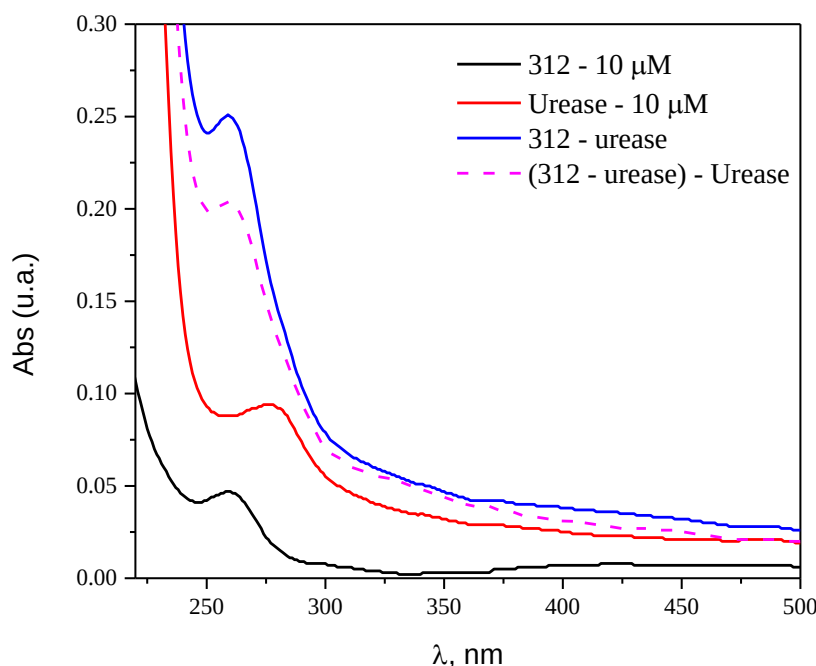
Fonte: Autor, 2024.

7.3. Estudos biofísicos de interação

7.3.1. Avaliação do processo de interação via UV-vis

A avaliação das possíveis modificações estruturais resultantes da formação do complexo 312 + urease também foi realizada por meio de espectrometria de absorção no UV-vis. Essa abordagem foi escolhida devido à sua capacidade de identificar a formação de complexos supramoleculares por meio de alterações espectroscópicas observadas no espectro de absorção (Guimarães *et al.*, 2024; Sirajuddin, Ali e Badshah, 2013; Wang *et al.*, 2019). As absorções do 312 livre (A₃₁₂), da urease livre (A_{urease}) e do sistema 312 + urease (A₃₁₂+ Aurease) foram registradas conforme apresentado na **Figura 14**. Uma vez que a subtração da Absorvância da urease livre, da absorvância do sistema 312 + urease, não se demonstraram sobreponíveis a absorvância do 312 livre (A₃₁₂ + Aurease – Aurease $\neq$ A₃₁₂), indicando que houve a formação de complexo entre o 312 e a urease (Guimarães *et al.*, 2024).

Figura 14. Espectro de absorção no UV-vis para os três sistemas avaliados **312** (10 μ M), urease (10 μ M) e o **312** + urease. Condições: Tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, 30°C.



Fonte: Autor, 2024.

Os parâmetros de ligação referente ao processo de interação do **312** com a urease foram determinados por meio de titulação espectrofotométrica e estudos de parâmetros termodinâmicos. A adição de quantidades crescentes de **312** às soluções contendo a macromolécula, levou a um efeito hipercrômico (**Figura 26 em anexo**) proporcional à concentração do ligante. Assim, a constante de ligação (K_b), para o complexo **312**-urease foi calculada a partir da linearização da equação de Benesi-Hildebrand (**Equação 5**):

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{A - A_0} + \frac{1}{K_b(A - A_0)} + \frac{1}{[312]} \quad \text{Equação (5)}$$

Na qual, A e A_0 são as absorções na presença e na ausência do **312**, respectivamente, K_b refere-se à constante de ligação e $[312]$ à concentração do composto. A constante de ligação foi calculada a partir da linearização $(A - A_0)$ vs. $[312]$ (**Figura 26B**). Com base nos valores de K_b nas três temperaturas avaliadas (22, 30 e 38 °C), foram calculados os parâmetros termodinâmicos por meio da linearização da equação de Van't Hoff (4).

$$\log K_b = \frac{\Delta H}{R} \times \left[\frac{1}{T} \right] + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Equação (6)}$$

Onde, T é a temperatura em Kelvin (K) e R a constante dos gases ideais. A energia livre de Gibbs (ΔG) foi calculada usando a **equação 7**

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Equação (7)}$$

Assim, considerando os parâmetros termodinâmicos descritos na **Tabela 10**, as forças preferenciais que estabilizam os sistemas **312**–urease foram avaliadas. A partir dos valores negativos calculados para ΔG , pode-se inferir que a formação dos sistemas **312**–urease se deu de forma espontânea, enquanto as forças de ligações preferenciais ocorrem a partir de ligações hidrofóbicas, uma vez que, ΔH e $\Delta S > 0$, caso $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$ a interação por forças eletrostáticas seriam dominante, assim como as ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals estariam associados ao sistema se $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$ (Braga *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2016).

Tabela 10. Parâmetro de ligação e termodinâmicos do **312** e a urease jeak beans (*Canavalia ensiformis*). Condições: Tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, 22 - 38°C.

Ligante	T (°C)	Parâmetros de ligação		Parâmetros termodinâmicos		
		Kb ($\times 10^3 \text{ M}^{-1}$)	r^2	ΔG (Kj mol ⁻¹)	ΔH (Kj mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹)
312	22	5,97 ($\pm 0,18$)	0.98643	- 764	1,651	2593
	30	3,10 ($\pm 0,09$)	0.99563	- 784		
	38	2,71 ($\pm 0,05$)	0.988823	-805		

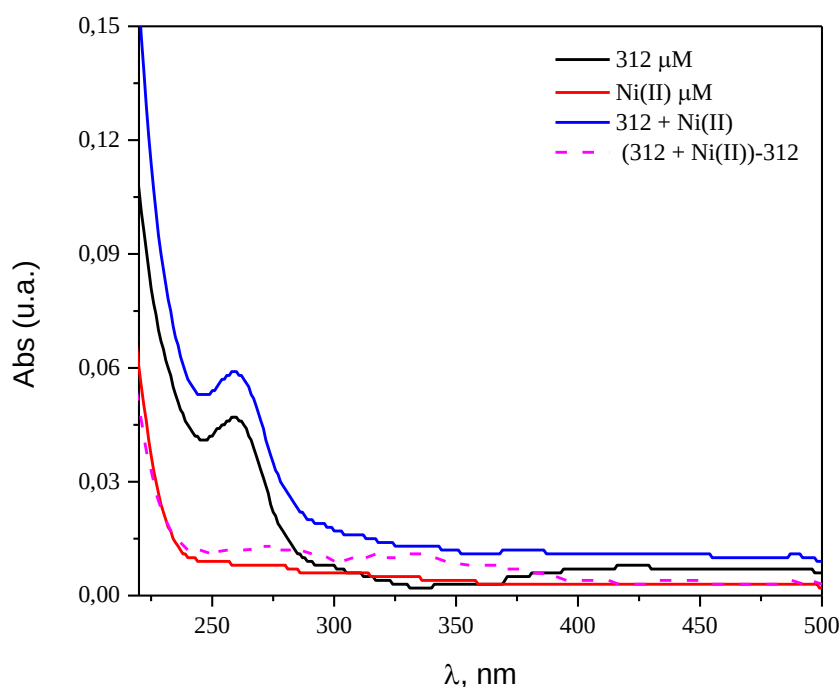
Fonte: Autor, 2024.

7.3.2. Avaliação da interação 312 no sítio ativo da urease

Para entender um pouco mais o mecanismo de ação do **312**, bem como os prováveis locais que esse interage na urease, foi realizado ensaios no UV-vis para entender o comportamento desse composto frente ao cofator do sítio ativo da enzima (Ni(II)).

A habilidade do **312** em formar complexos com íons Ni(II) foi avaliada utilizando três sistemas: **312** livre (10 μM), Ni(II) livre (10 μM) e **312** + Ni(II) (**Figura 15**). Em linhas gerais, a subtração da absorvância do composto livre pela absorvância do sistema **312** + Ni(II) não se mostrou sobreponível à absorvância do cofator Ni(II) da urease em sua forma livre, ou seja, $A_{312} + A_{\text{Ni(II)}} - A_{312} \neq A_{\text{Ni(II)}}$. Isso sugere a formação de um complexo entre o **312** e o Ni(II), possivelmente relacionado à presença de átomos de O, S e N no composto, ao quais são capazes de complexar átomos metálicos (Krajewska e Zaborska, 2007), o que possivelmente, atrelado a outros fatores, pode ter influenciado no processo de inibição da enzima.

Figura 15. Espectro de absorção no UV-vis para os três sistemas avaliados nos experimentos com o cofator Ni (II). Condições: Tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, 30°C.



Fonte: Autor, 2024.

7.4. Estudos *in silico*

7.4.1. Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos *in silico*

Os estudos ADMET delineiam o trajeto da absorção de uma substância no sistema biológico, desde sua assimilação até sua eliminação, utilizando modelos matemáticos que abrangem os processos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade, sendo essas avaliações de vital importância no desenvolvimento de fármacos (Alyar *et al.*, 2023; Ünlü *et al.*, 2023). A avaliação ADME foi realizada através do site SwissADME, enquanto os parâmetros de toxicidade foram determinados utilizando o software OsirisDataWarrior (**Tabela 11**).

Os dados ADMET dos compostos **307 – 313** e **317** foram avaliados com base no radar de biodisponibilidade, parâmetros físico-químicos e propriedades farmacocinéticas. Os valores ADMET demonstram que os compostos possuem alta absorção gastrointestinal e que muitos dos compostos atravessam a barreira hematoencefálica, sendo esse parâmetro de suma importância para uma droga atingir o seu alvo biológico. Quanto aos parâmetros de toxicidade avaliados, apenas o composto **312** demonstrou-se tóxico gente a um deles. Assim, de maneira geral, os compostos estudados obedeceram às regras que preveem a eficiência de candidatos a fármacos (Egan, Merz e Baldwin, 2000; Lipinski *et*

al., 2001; Veber *et al.*, 2002), sendo assim uma classe de compostos com potencial para ser avaliada no tratamento de infecções advindas por *H. pylori*.

Tabela 11. Propriedades ADMET *in silico* avaliadas para as bases de *Schiff* híbridas com pirazóis e derivadas de tiossemicarbazonas.

Composto	MM (g mol ⁻¹) (< 500)	Parâmetro físico-químico (valor de referência)						nLigações rotativas	Parâmetro de toxicidade Mutagenicidade/Tumorigenicidade/ Reprodutibilidade efetiva/Irritação
		nHBD (≤ 5)	nHBA (≤ 10)	logP (≤ 5)	log S	TPSA (Å ²) (≤ 140)	Molar refractivity (40 – 130)		
307	434,40	2	7	3,01±1,16	-4,75	146,14	109,58	7	baixa/baixa/baixa/baixa
308	407,39	2	6	4,05±1,03	-4,84	100,32	100,72	6	baixa/baixa/baixa/baixa
309	423,84	2	5	4,27±1,02	-5,28	100,32	105,77	6	baixa/baixa/baixa/baixa
310	468,29	2	5	4,37±0,99	-5,59	100,32	108,46	6	baixa/baixa/baixa/baixa
311	389,40	2	5	3,76±0,85	-4,69	100,32	100,76	6	baixa/baixa/baixa/baixa
312	419,42	2	6	3,75±0,89	-4,76	109,55	107,25	7	baixa/baixa/Alta/baixa
313	448,42	1	8	3,57±1,40	-5,32	139,68	115,07	7	baixa/baixa/baixa/baixa
317	403,42	1	6	4,33±0,93	-5,26	93,86	106,25	6	baixa/baixa/baixa/baixa

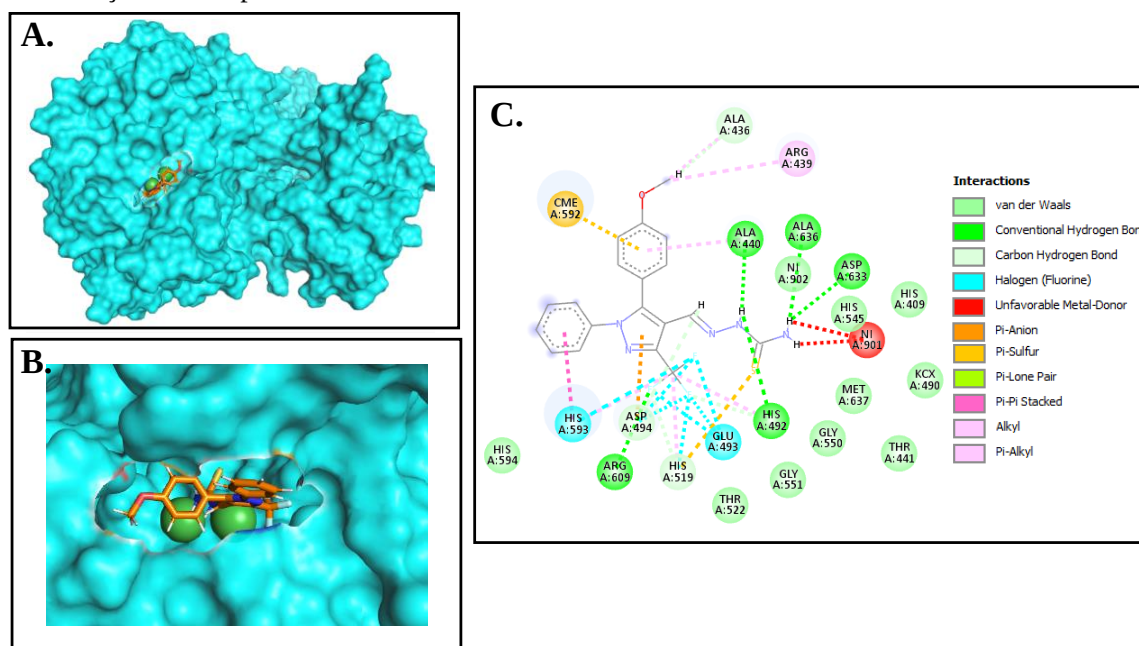
MM: massa molecular; nHBD: Número de átomos doadores de ligação de hidrogênio; nHBA: Número de átomos aceptores de ligação de hidrogênio; logP: Coeficiente de partição octanol /água; loS: Coeficiente de solubilidade; TPSA: Area superficial polar topológica.

Fonte: Autor, 2024.

7.4.2. Docking molecular

Os estudos de ancoragem molecular realizados com as bases de *Schiff* avaliadas nesse trabalho demonstraram que o perfil molecular adotado para os compostos lhes permite realizar diversas interações com resíduos de aminoácidos do sítio ativo e próximo desse, assim como interações com os átomos de níquel presentes nessa região. Em geral, para o algoritmo de entrada analisado, os compostos demonstraram uma tendência de energia fitscore consistente com a observada no processo de inibição da enzima (**Figura 27** em anexo). De um modo geral, os grupos semelhantes presentes nas moléculas tenderam a realizar as mesmas interações, sendo assim o composto **312** será utilizado como modelo para discutir os dados (**Figura 16**). Ao analisar a interação entre o complexo **312** e a urease, observa-se que o composto se coordenou a um dos átomos de níquel no sítio ativo, utilizando o par de elétrons livre do átomo de nitrogênio terminal da função tiossemicarbazona. Além disso, os átomos de hidrogênio ligados a esse mesmo nitrogênio estabeleceram interações metal-doador desfavoráveis com o segundo átomo de níquel no sítio ativo da urease, resultados que estão em concordância com as observações experimentais (**Figura 15**). Também foram identificadas interações π -anion com o resíduo CME592, ligações de hidrogênio envolvendo os resíduos ALA440, ALA636, ASP633, HIS492, ARG609, interações de halogênio entre o flúor do grupo CF₃ (interação comum a todos os compostos analisados) e os resíduos HIS593, GLU493, HIS519, ASP494, além de interações π -enxofre entre o átomo de enxofre da tiossemicarbazona e o resíduo HIS519. Também foram observadas interações p-alquil, alquil, e interações de van der Waals com diversos resíduos de aminoácidos localizados no bolso do sítio ativo da urease. Esses dados sustentam os estudos termodinâmicos experimentais, dos quais se deduz que as interações hidrofóbicas são as preferenciais para estabilizar o complexo **312**-urease.

Figura 16. A. Complexo do **312** com a urease Jeak bean (*Canavalia ensiformis*) PDB ID:4GOA. B. Disposição do **312** no sitio ativo da enzima. C. Interações e resíduos envolvidos no processo de formação do complexo **312**-urease.



Fonte: Autor, 2024.

7.5. Inibição da urease em amostras de solo

O potencial do composto 312 em inibir a atividade de ureases presente no solo foi conduzida utilizando quatro amostras de solo que apresentam texturas e teores de matéria orgânica distintos (S1, S2, S3 e S4) e são classificadas como solos vermelho (Tavares et al., 2021, 2023). As características físico-químicas dos solos estão descritas na **Tabela 18** em anexo. Essa avaliação foi comparada a um sistema de referência, sem a presença do inibidor, e a um controle positivo contendo NBPT. Os resultados revelaram que a atividade da urease nas quatro amostras de solo foi impactada na presença do inibidor, conforme ilustrado na **Tabela 12**.

Tabela 12. Valores médios de inibição de ureases do solo na presença do **312** e do NBPT. Condições: Tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, 30°C.

Solo	Inibidores	
	312	NBPT
1	52,23 ± 4,80 ^a	96,32 ± 2,64 ^b
2	98,79 ± 1,52 ^b	46,21 ± 3,46 ^c
3	18,75 ± 2,92 ^c	11,76 ± 1,29 ^c
4	45,09 ± 8,10 ^a	66,32 ± 5,92 ^d

Percentual de inibição relativa da urease em amostras de solo (125 µM); os valores estão sendo apresentados como média ± SD ($n = 3$). Os valores seguidos por diferentes letras sobrecritas (a-d) na coluna do **312** indica diferença significativa entre a inibição nos solos, assim como as letras diferentes entre as linhas são correspondentes a diferença significativa entre as inibições do **312** e o NBPT no mesmo solo pelo teste de *Tukey* ($p < 0.05$).

Fonte: Autor, 2024.

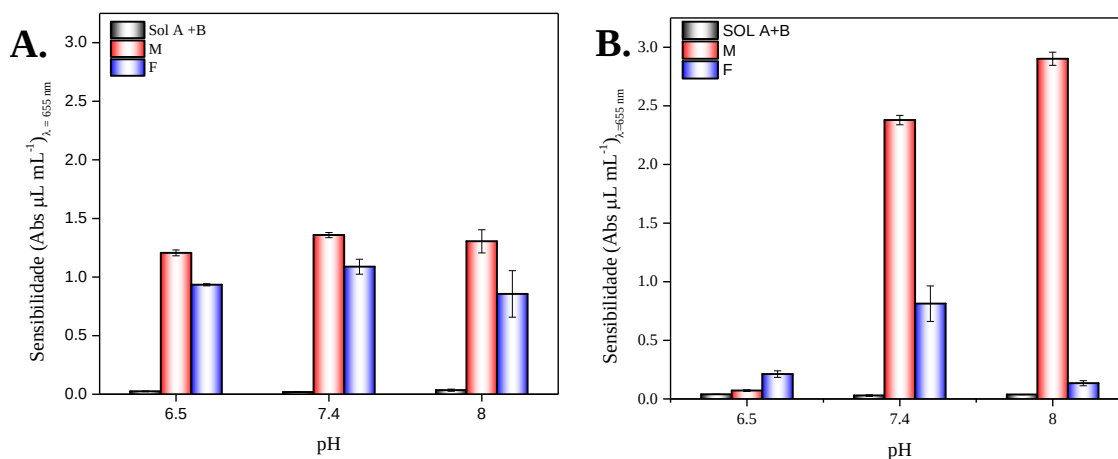
O percentual de inibição das ureases presentes nos solos pelo **312** foi comparada estatisticamente (teste de *Tukey*) entre amostras de solo e entre a inibição do NBPT por amostra de solo. Para os solos avaliados, o **312** demonstrou-se mais eficiente ($p < 0.05$) em inibir as ureases do S2. Além disso, esse composto apresentou-se significativamente (teste de *Tukey*, $p < 0.05$) semelhante em inibir as ureases do S1 e S4. Além disso, quando se compara a inibição do **312** com a do NBPT, a base de *Schiff* se apresentou estatisticamente mais eficiente em inibir as ureases no S2 e comparável no S3. De maneira geral, o composto **312** não apresentou uma tendência de inibição de acordo com os parâmetros físico-químicos dos solos, sendo assim, não há como destacar uma ou outra propriedade que possa ter interferido nesses percentuais de inibição. Dessa forma, o composto **312** demonstrou potencial em inibir ureases do solo, podendo esse ser explorado em estudos futuros no desenvolvimento de fertilizantes com maior eficiência.

7.6. Inibição de ureases em urina

A sensibilidade analítica foi avaliada usando tampão fosfato de sódio ($pK_{a2} = 7,2$) e tris ($pK_a = 8,1$) (**Figura 17A-B**), que apresentam capacidade tamponante no intervalo de pH de atividade máxima da urease e próximo ao pH inicial selecionado (Liljegren *et al.*, 1992). O tampão tris foi selecionado devido a maior sensibilidade em relação a outros sistemas, podendo estar associado a complexação de espécies interferentes presentes nas amostras por esse tampão. Além disso, o pH 7,4 foi selecionado para dar prosseguimento as avaliações devido a três fatores: i) se tratar de pH fisiológico e ser o utilizado em ensaios antiecológicos; ii) amostra de urina de doadoras do sexo feminino apresentar uma maior atividade nesse pH; iii) pH de urina humana de pessoas em condições normais encontra-se

entre 4,5 a 8 (Laboratory Assessment of Kidney Disease, 2011), sendo escolhido um valor de pH abaixo do limiar.

Figura 17. Avaliação da sensibilidade analítica em função do sistema tampão e pH. **A.** Tampão fosfato de potássio, pH 6,5, 7,4 e 8. **B.** Tampão tris, pH 6,5, 7,4 e 8,0. Condições: Tampões 20 mM, 30°C.

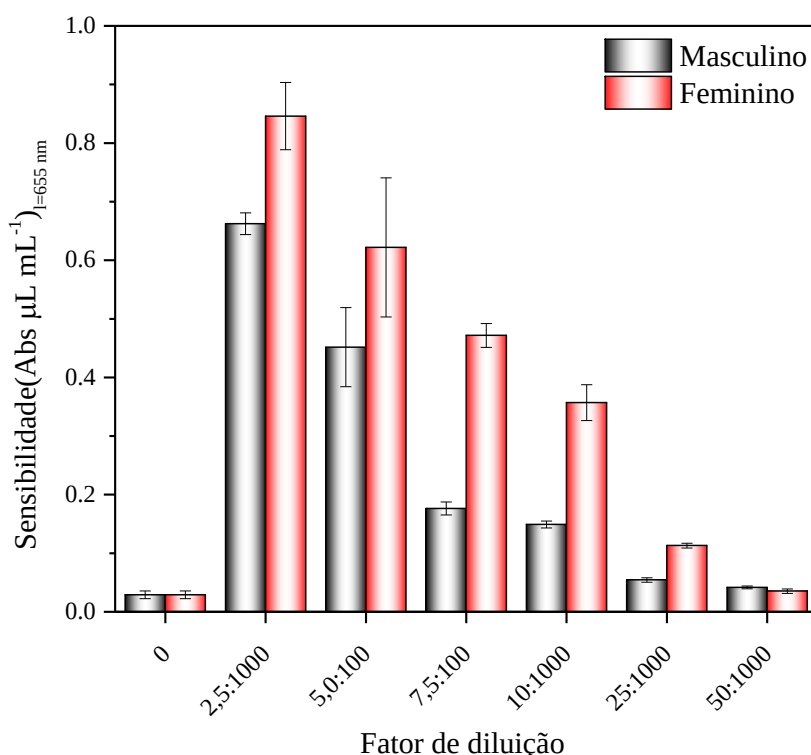


Solução A (salicilato de sódio 1% (v/v) e nitroprussiato de sódio 5 mg L⁻¹), solução B (NaOH 0,5 % (m/v) e NaOCl 0,1 % (v/v); Solução A + B = método de indofenol; amostras de urina de doadores do sexo M = masculino; F = Feminino.

Fonte: Autor, 2024.

Depois de estabelecer o sistema tampão e o pH, a influência do fator de diluição na resposta analítica foi avaliada (**Figura 18**). O aumento da diluição da amostra levou a um aumento da sensibilidade analítica. Esse perfil pode estar associado a diversos fatores, incluindo: *i*) menor ação de substâncias/espécies interferentes que podem afetar negativamente a atividade enzimática; *ii*) condições ideais para a enzima expressar sua atividade, como o pH ou temperatura mais adequados (Roque *et al.*, 2023).

Figura 18. Avaliação da sensibilidade analítica em função do fator de diluição da amostra. Condição: Tampão tris 20 mM pH 7,4 30°C.



Solução A (salicilato de sódio 1% (v/v) e nitroprussiato de sódio 5 mg L⁻¹), solução B (NaOH 0,5 % (m/v) e NaOCl 0,1 % (v/v)); Solução A + B = método de indofenol; amostras de urina de doadores do sexo M = masculino; F = Feminino.

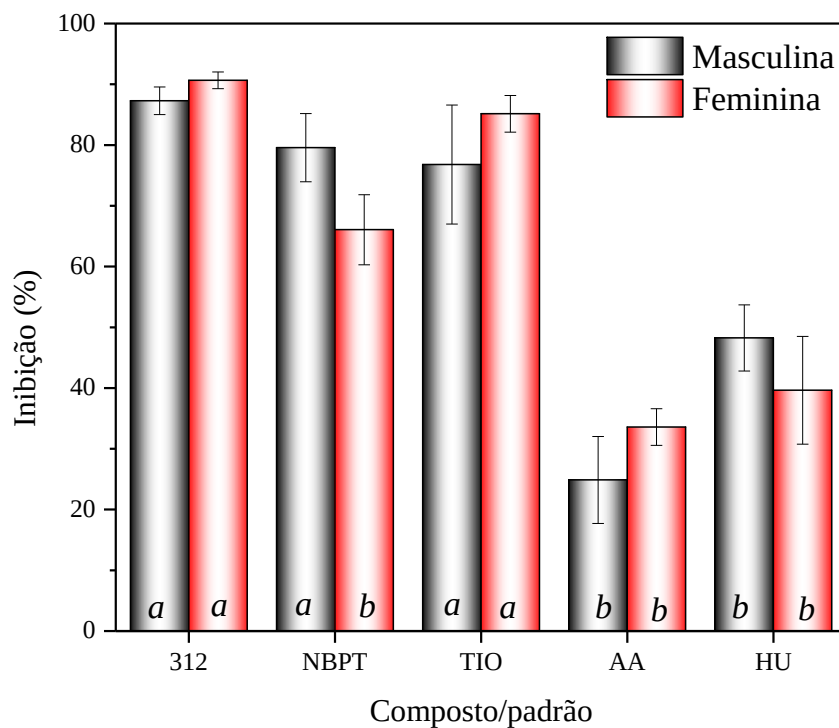
Fonte: Autor, 2024.

Assim, após o processo de otimização, visando avaliar o potencial de inibição de ureases em urina do **312**, foram realizados ensaios de inibição dessas enzimas em amostras de doadores do sexo masculino e feminino em comparação com inibidores clássicos da urease (NBPT, TIO, AA e HU). As amostras de urina masculina e feminina apresentaram atividade de urease a $1,97 \pm 0,02$ e $2,01 \pm 0,29$ mg N-NH₄⁺ L⁻¹ de urina, respectivamente. A atividade das enzimas ureolíticas presentes nas amostras de urina foram afetadas pela presença do composto **312** e dos inibidores clássicos (**Figura 19**) e a porcentagem de inibição foi calculada de acordo Oliveira e Santos (2020) usando a equação (8).

$$I(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{referência}}}\right) \times 100 \quad \text{Equação (8)}$$

onde A_{amostra} e $A_{\text{referência}}$ referem-se as absorvâncias na presença e ausência do composto ou dos padrões, respectivamente.

Figura 19. Valores médios de inibição da atividade ureolítica de ureases presentes em amostras de urina de doadores do sexo masculino e feminino por composto **312** e o padrões clássicos de inibição da urease, NBPT, TIO, AA e HU na concentração de 100 μ M. Condição: Tampão tris 20 mM pH 7,4 30 °C.



Solução A (salicilato de sódio 1% (v/v) e nitroprussiato de sódio 5 mg L⁻¹), solução B (NaOH 0,5 % (m/v) e NaOCl 0,1 % (v/v)); Solução A + B = método de indofenol; M = masculina; F = Feminina. Os valores estão sendo apresentados como média $\pm$ SD ($n = 3$). Os valores seguidos por letras diferentes (a e b) nas colunas da mesma amostra de urina são correspondentes a diferenças significativas entre os padrões e o composto **312** pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autor, 2024.

Os resultados indicam que o composto **312** exibiu uma inibição da atividade ureolítica de 87,3 $\pm$ 2,3% e 90,6 $\pm$ 1,4% nas amostras de urina masculina e feminina, respectivamente. Essa inibição foi estatisticamente (teste de Tukey $p < 0,05$) superior aos padrões AA e HU, e comparável aos padrões NBPT e TIO na amostra masculina. Além disso, na amostra feminina, a atividade foi estatisticamente (teste de Tukey $p < 0,05$) comparável a TIO e superior aos padrões NBPT, AA e TIO. Esses resultados evidenciam o elevado potencial da molécula **312** como um eficaz inibidor de ureases em amostras de urina.

8. Conclusão

O potencial de inibição da urease de oito bases de *Schiff* derivadas de tiossemicarbazonas e híbridas com pirazóis foi avaliado, sendo o composto **312**, com o IC_{50} de $25,18 \pm 0,73 \mu M$ o mais ativo da classe de compostos avaliada, o qual apresentou um tipo de inibição mista, apresentando valores de $K_i > K_i'$, o que indicou uma maior afinidade do composto pela enzima. Os estudos de UV-vis demonstraram a formação do complexo, o qual apresentou forças de ligações de hidrofóbicas como preferencias (ΔH e $\Delta S > 0$) para sua a estabilização e uma formação espontânea ($\Delta G < 0$). Os estudos de *docking* molecular evidenciaram que os compostos interagem com resíduos de aminoácidos próximos ao sítio ativo da enzima, principalmente por meio de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Notavelmente, o composto mais ativo demonstrou interações também com um dos cofatores do sítio ativo da enzima. Os estudos de inibição da urease em amostra de solo demonstraram que para amostras de solo S2, o composto apresentou uma atividade superior ao padrão NBPT. Quanto à inibição de enzimas ureolíticas em amostras de urina, o composto apresentou uma inibição superior a todos os padrões avaliados. Os resultados destacam o potencial dessa classe de compostos, sugerindo sua utilidade em aplicações biotecnológicas diversas. Assim, os estudos podem nortear o desenvolvimento de moléculas mais potentes para a inibição de ureases em diferentes contextos biotecnológicos.

9. Referências

- ALYAR, S. *et al.* Biochemical properties of Schiff bases derived from FDA-approved sulfa drugs: Synthesis, ADME/molecular docking studies, and anticancer activity. **Journal of Molecular Structure**, v. 1293, 5 dez. 2023.
- BRAGA, T. C. *et al.* Ionic liquid-assisted synthesis of dihydropyrimidin(thi)one Biginelli adducts and investigation of their mechanism of urease inhibition. **New Journal of Chemistry**, v. 43, n. 38, p. 15187–15200, 2019.
- CAMARGO, J. DO N. A. *et al.* Antiparasitic Behavior of Trifluoromethylated Pyrazole 2-Amino-1,3,4-thiadiazole Hybrids and Their Analogues: Synthesis and Structure-Activity Relationship. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 7 out. 2020.
- DING, F. *et al.* Second auxiliary ligand induced two copper-based coordination polymers and urease inhibition activity. **Journal of Solid State Chemistry**, p. 124537, dez. 2023.
- EGAN, W. J.; MERZ, K. M.; BALDWIN, J. J. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 21, p. 3867–3877, 19 out. 2000.
- FARIA, A. F. M. *et al.* In vitro evaluation of 2-(1H-pyrazol-1-yl)-1,3,4-thiadiazole derivatives against replicative and infective stages of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 55, n. 6, p. 409–421, 3 dez. 2023.
- FINDIK, M. *et al.* New copper(II) complex based-thiosemicarbazone and phenanthroline: DNA/BSA binding, antiproliferative activity, DFT and docking studies. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 156, p. 111300, out. 2023.
- GRAHAM, D. Y.; MIFTAHUSSURUR, M. **Helicobacter pylori urease for diagnosis of Helicobacter pylori infection: A mini review** *Journal of Advanced Research* Elsevier B.V., 1 set. 2018.
- GUIMARÃES, A. *et al.* Aminoguanidine Hydrazone Derivatives: The Antioxidant, Antineoplastic Profile, and Interaction with ctDNA Studies. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2024.
- GUPTA, S. *et al.* Thiosemicarbazone derivatives of transition metals as multi-target drugs: A review. **Results in Chemistry**, v. 4, 1 jan. 2022.

ISLAM, M. *et al.* Synthesis and biological evaluation of 2-nitrocinnamaldehyde derived thiosemicarbazones as urease inhibitors. **Journal of Molecular Structure**, v. 1284, p. 135387, jul. 2023.

JAIN, S. *et al.* Schiff Base Metal Complexes as Antimicrobial and Anticancer Agents. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v. 43, n. 7, p. 6351–6406, 9 ago. 2023.

JIANG, CHAO *et al.* Three flavanols delay starch digestion by inhibiting α -amylase and binding with starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 172, p. 503–514, 1 mar. 2021.

KAFARSKI, P.; TALMA, M. **Recent advances in design of new urease inhibitors: A review** *Journal of Advanced Research* Elsevier B.V., , 1 set. 2018.

KAPPAUN, K. *et al.* **Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties –A review** *Journal of Advanced Research* Elsevier B.V., , 1 set. 2018.

KAREEM, M. JUDA. *et al.* Synthesis, characterization, and determination antioxidant activities for new Schiff base complexes derived from 2-(1H-indol-3-yl)-ethylamine and metal ion complexes. **Journal of Molecular Structure**, v. 1231, p. 129669, maio 2021.

KHADRA, K. A. *et al.* Synthesis of novel p-tert-butylcalix[4]arene Schiff bases and their complexes with C60, potential HIV-Protease inhibitors. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 136, p. 1869–1874, fev. 2015.

KRAJEWSKA, B.; ZABORSKA, W. Jack bean urease: The effect of active-site binding inhibitors on the reactivity of enzyme thiol groups. **Bioorganic Chemistry**, v. 35, n. 5, p. 355–365, out. 2007.

Laboratory Assessment of Kidney Disease. *Em: Pocket Companion to Brenner and Rector's The Kidney*. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 21–41.

LAGE, T. C. A. *et al.* In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* and interaction studies of lichen natural products with jack bean urease. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 7, p. 5356–5366, 2018.

LI, G. *et al.* Pyrazole-containing pharmaceuticals: target, pharmacological activity, and their SAR studies. **RSC Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 11, p. 1300–1321, 2022.

LILJEGREN, A. E. *et al.* **The influence of pH and urine composition on urease enzymatic activity in human urine** *Urol Res.* Springer-Verlag, 1992.

LIPINSKI, C. A. *et al.* **Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development q settings** *Advanced Drug Delivery Reviews*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/drugdeliv>.

MENTEŞE, E. *et al.* Synthesis and molecular docking study of some 5,6-dichloro-2-cyclopropyl-1 H -benzimidazole derivatives bearing triazole, oxadiazole, and imine functionalities as potent inhibitors of urease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 13, p. 3014–3018, jul. 2017.

MITTAL, A.; SINGH, A.; BENJAKUL, S. α -amylase inhibitory activity of chitooligosaccharide from shrimp shell chitosan and its epigallocatechin gallate conjugate: kinetics, fluorescence quenching and structure–activity relationship. **Food Chemistry**, v. 403, 1 mar. 2023.

NAIR, A. R.; SUNIL KUMAR, Y. C.; SIVAN, A. Synthesis and in-depth investigation of the photophysical and electrochemical properties of novel pyrazole cored D-A-D **molecules**. V. 134, 113117. December 2022.

OCHS, R. S. Understanding Enzyme Inhibition. **Journal of Chemical Education** , v. 77, p. 1453–1456, nov. 2000.

OLIVEIRA, R. B. DE *et al.* Synthesis and antimalarial activity of semicarbazone and thiosemicarbazone derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 1983–1988, set. 2008.

OLIVEIRAA, W. S.; SANTOS, J. C. C. Determination of total antioxidant capacity using thiamine as a natural fluorescent probe. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 12, p. 2479–2490, 2020.

PACZOSA, M. K.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 629–661, set. 2016.

PATRA, A. K.; ASCHENBACH, J. R. **Ureases in the gastrointestinal tracts of ruminant and monogastric animals and their implication in urea-N/ammonia metabolism: A review** *Journal of Advanced Research* Elsevier B.V., , 1 set. 2018.

REGO, Y. F. *et al.* **A review on the development of urease inhibitors as antimicrobial agents against pathogenic bacteria** *Journal of Advanced Research* Elsevier B.V., , 1 set. 2018.

ROQUE, C. *et al.* How does dilution affect the conductivity, the propensity to aggregate and the biological activity of enzymes? **Journal of Molecular Liquids**, v. 382, 15 jul. 2023.

SENECAL, J.; VINNERÅS, B. Urea stabilisation and concentration for urine-diverting dry toilets: Urine dehydration in ash. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 650–657, 15 maio 2017.

SHELLAIAH, M. *et al.* An AIE active anthracene-based Schiff base probe for “turn-on” detection of Cu²⁺ ions: Demonstrations with nanostructural investigations, DFT, cellular imaging, and real water analysis. **Journal of Molecular Structure**, v. 1301, p. 137347, abr. 2024.

SILVA, M. M. *et al.* Interaction of β -carboline with DNA: Spectroscopic studies, correlation with biological activity and molecular docking. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 9, p. 1558–1568, 2016.

SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 124, p. 1–19, jul. 2013.

SUN, Y.-X. *et al.* A turn-off fluorescent probe for the detection of copper(II) ion based on a salicylaldehyde derivatives Schiff-base. **Journal of Molecular Structure**, v. 1291, p. 136069, nov. 2023.

SVANE, S. *et al.* Inhibition of urease activity by different compounds provides insight into the modulation and association of bacterial nickel import and ureolysis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

TAVARES, M. C. *et al.* Interaction and inhibition mechanism of urease in vitro and soil system by a natural benzylisothiocyanate isolated from *Moringa oleifera*. **Industrial Crops and Products**, v. 178, 1 abr. 2022.

____. The influence of N-alkyl chains in benzoyl-thiourea derivatives on urease inhibition: Soil studies and biophysical and theoretical investigations on the mechanism of interaction. **Biophysical Chemistry**, v. 299, 1 ago. 2023.

ÜNLÜ, A. *et al.* Biological evaluation of Schiff bases containing dopamine as antibacterial /antifungal and potential Anti COVID-19 agents: Design, synthesis, characterization, molecular docking studies, and ADME properties. **Journal of Molecular Structure**, v. 1293, 5 dez. 2023.

VASILJEV, A. *et al.* Drying fresh human urine in magnesium-doped alkaline substrates: Capture of free ammonia, inhibition of enzymatic urea hydrolysis & minimisation of chemical urea hydrolysis. **Chemical Engineering Journal**, v. 428, 15 jan. 2022.

VEBER, D. F. *et al.* Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 6 jun. 2002.

WANG, R. *et al.* Interaction of isoeugenol with calf thymus DNA and its protective effect on DNA oxidative damage. **Journal of Molecular Liquids**, v. 282, p. 356–365, 2019.

ZAHRA, U. *et al.* New acetylphenol-based acyl thioureas broaden the scope of drug candidates for urease inhibition: synthesis, in vitro screening and in silico analysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 198, p. 157–167, 15 fev. 2022.

ZHOU, Z. *et al.* Remediation performance of different enhanced Fe(II)-based advanced oxidation processes on groundwater contaminated by multiple mixed chlorinated hydrocarbons: Removal efficiencies, costs, and optimal systems. **Chemical Engineering Journal**, v. 479, 1 jan. 2024.

10. Seção 3 - Síntese e aplicação de análogos ao resveratrol e híbridos com o ácido lipoico baseados na estrutura de iminas e aminas

10.1. Introdução

A tirosinase (EC 1.14.18.41), também conhecida como polifenol oxidase, é uma metaloenzima responsável por catalisar a síntese da melanina. Ela desempenha papéis fisiológicos cruciais em microrganismos, animais, plantas e no corpo humano (Jung Park et al., 2024; Xu et al., 2024). No corpo humano, a tirosinase está associada à síntese de melanina nos melanócitos da epiderme. Essas reações são fundamentais para determinar a cor dos olhos, dos cabelos e da pele. Adicionalmente, os melanossomas, transferidos através dos dendritos para os queratinócitos da epiderme, desempenham um papel na proteção da pele contra danos ao DNA causados pela radiação UV (Li et al., 2020; Park et al., 2018). Entretanto, o acúmulo de melanina, bem como, expressões anormais dessa enzima, podem levar a problemas como à hiperpigmentação da pele, sendo a inibição da atividade dessa uma forma de regular a melanogênese (Chang, 2009; Dehghani et al., 2019; Ma et al., 2019).

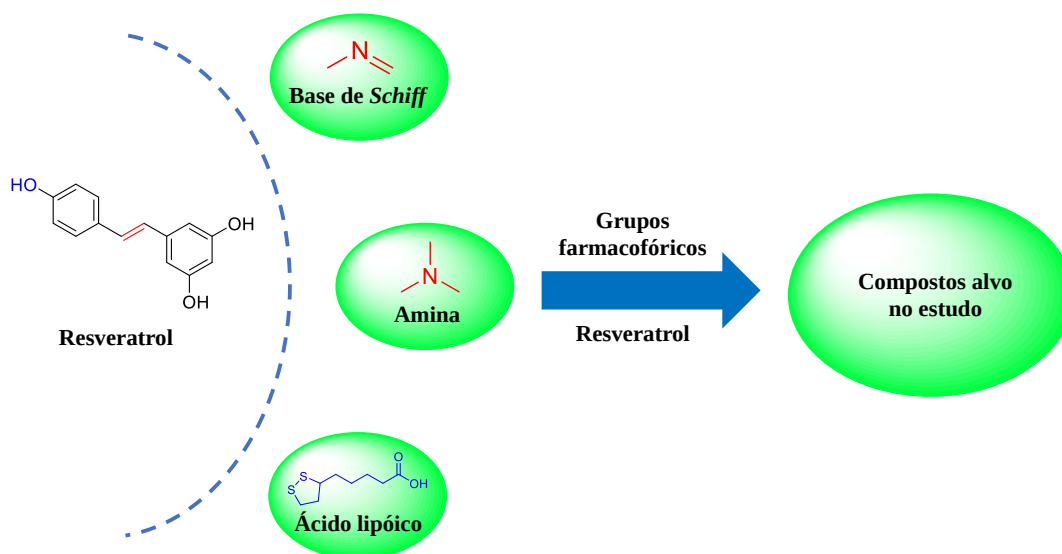
A este respeito, moléculas de origem natural desempenham um papel fundamental na pesquisa de modelos moleculares bioativos para o desenvolvimento de novos análogos sintéticos e/ou semi-sintéticos devido ao desempenho frente à ampla gama de processos fisiológicos, incluindo inibição enzimática e proteção contra RUV prejudicial. Sendo assim, destaca-se a classe dos compostos polifenólicos, mais especificamente, o resveratrol (*trans*-3,5,4-trihidroxi-*trans*-estilbeno) devido a suas potentes propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomoduladoras e fotoprotetora sendo esse e seus análogos bastante explorados como agentes quimiopreventivos para uma variedade de doenças da pele (Ge et al., 2012; Lei et al., 2017; Reis et al., 2014).

Por outro lado, destacam-se também as bases de Schiff, as aminas e o ácido lipoico comumente encontrados em diversos compostos biologicamente ativos, sendo utilizados como modelos na síntese de diversas moléculas bioativas. As bases de Schiff são uma classe de compostos que têm atraído a atenção dos pesquisadores devido à sua versatilidade estrutural frente a diversas aplicações, em que seu potencial bioativo está associado principalmente à presença do grupo farmacofórico $RC=N$ (Karaoğlu, 2022), sendo esse grupo responsável por diversas atividades, incluindo a antioxidante, antitumoral, antibacteriana, antivírus e antifúngica (Kareem et al., 2021; Shah et al., 2022). Algumas aminas, por sua vez, fornecem atividade antioxidante, propriedades antienvhecimento (Carmo Brito et al., 2017; Muñoz-Esparza et al., 2019), além de

prevenir doenças cardiovasculares (Deus et al., 2021). Não tão distinto, o ácido lipoico, que é um composto muito encontrado em alimentos, como: batatas, trigo, carnes vermelhas, bem como em microrganismos eucarióticos, têm atraído atenção devido às suas atividades farmacológicas protetivas frente ao mal de Alzheimer, doenças cancerígenas, além da sua atividade antioxidante (Bernini et al., 2011).

Sendo assim, neste trabalho foram prospectadas moléculas com um esqueleto análogo ao resveratrol, porém, variando-se a substituição nos anéis, convertendo o sistema conjugado em uma ligação imina (bases de *Schiff*) ou amina e por último a formação de um híbrido com ácido lipoico. A estratégia é sanar os problemas de biodisponibilidade e rápido metabolismo do resveratrol (Walle *et al.*, 2004) com a variação dos grupos hidroxilas, bem como, com a adição do grupo aza no sistema conjugado, ou ainda por meio da formação do híbrido com ácido lipoico (**Figura 20**).

Figura 20. Estratégia reacional dos compostos prospectados no trabalho.



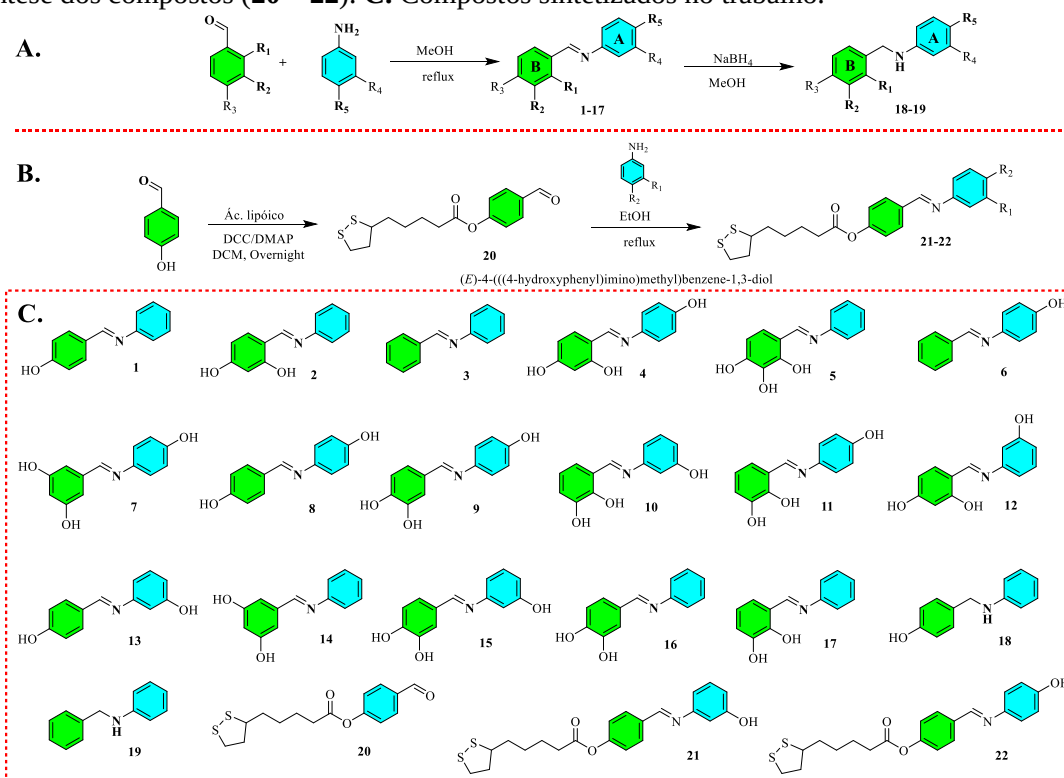
Fonte: Autor, 2024.

10.3. Resultados e discussão

10.3.1. Síntese e Caracterização

As bases de *Schiff* **1 – 17** (**Figura 21C**) foram sintetizadas a partir de reações de condensação entre aldeídos aromáticos e a anilina (**Figura 21A**) (Ghosh e Ray, 2017; Liu *et al.*, 2007). Para isso, os derivados anilínicos foram adicionados a uma solução metanólica do aldeído apropriado de cada reação. A solução resultante foi refluxada e o precipitado foi lavado com etanol gelado para assim obter os produtos **1 – 17**, que apresentaram rendimentos de 49 – 99%. Os derivados amínicos **18 – 19** (**Figura 21C**), por sua vez, foram obtidos via reação de redução das iminas correspondentes (**Figura 21A**), com rendimentos que variaram entre 91 e 95%. Já o **20**, foi sintetizado via reação de esterificação de Steglich (**Figura 21B**) (Godoy-Reyes *et al.*, 2019), sendo o produto purificado via coluna cromatográfica, obtendo-se um rendimento de 52%. Os híbridos imínicos lipoicos **21 – 22** (**Figura 21C**), foram sintetizados via reação de condensação (**Figura 21B**), usando etanol como solvente e purificados por lavagens sucessivas com éter etílico e n-hexano. Posteriormente, todos os compostos foram caracterizados por infravermelho com refletância total atenuada (FTIR-ATR), ressonância magnética nuclear (RMN) de próton (^1H), carbono 13 (^{13}C) e o **1** também por efeito nuclear *Overhauser* (NOESY) os espectros encontram-se no anexo (**Figura 29 – Figura 79**).

Figura 21. Rotas sintéticas utilizadas para a síntese dos compostos e compostos sintetizados no trabalho. **A.** Rota sintética para as iminas (**1 – 17**) e aminas (**18 – 19**). **B.** Rotas adotadas para a síntese dos compostos (**20 – 22**). **C.** Compostos sintetizados no trabalho.



Fonte: Autor, 2024.

Para as bases de *Schiff*, as principais bandas de absorção nos espectros FTIR-ATR foram registradas em $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$, correspondentes a estiramentos das ligações C=C e C=N da imina, comum a todos os compostos. Nas aminas, as principais bandas foram registradas em ~ 3400 e $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$, correspondentes a estiramentos N-H e C=C, respectivamente. O **20** (Intermediário híbrido) apresentou bandas características de estiramentos do R-CO-O-R do éster e CHO do aldeído em 1759 , 1699 cm^{-1} , respectivamente. Além disso, foi registrado uma banda em 509 cm^{-1} correspondente a deformação S-S presente no anel de 5 membros. Para os compostos **1 – 17**, nos espectros de RMN ^1H , foi possível notar um simpleto entre $\delta\ 8,3 - 8,9\text{ ppm}$, característico do hidrogênio do grupo imina (-CH=N-). Nos espectros de RMN ^{13}C para esses mesmos compostos, o carbono da imina foi observado em $\delta\sim 160\text{ ppm}$. No espectro Noesy do **1**, pôde-se notar um acoplamento entre o hidrogênio do grupo -CH=N- e os hidrogênios em *orto* do anel com substituinte hidroxila ($\delta\ 8,4$ e $7,7\text{ ppm}$), também foi possível notar a ausência de sinais correspondentes ao acoplamento entre hidrogênios dos anéis adjacentes, indicando que esses se encontram em lados opostos o que confere uma

geometria *E* (*trans*) para esses compostos. Para as aminas, pôde-se notar nos espectros de RMN de ^1H o desaparecimento do sinal correspondente ao hidrogênio do grupo $-\text{CH}=\text{N}-$, bem como, um simpleto entre δ 4,2 – 4,4 ppm correspondente aos hidrogênios do metileno (CH_2) formado. No RMN de ^{13}C foi possível observar o sinal característico do carbono do CH_2 entre δ 47 – 48,5 ppm, bem como, o desaparecimento do sinal correspondente ao carbono do grupo $-\text{CH}=\text{N}-$. Para o **20**, no RMN ^1H foi possível notar o sinal correspondente ao H do aldeído em δ 10 ppm. No RMN de ^{13}C , os carbonos do aldeído e do éster apresentaram-se em δ 190,82 e 171,20 ppm, respectivamente. Para as iminas e o intermediário **20**, os dados espectrais são consistentes com os resultados relatados em estudos reportados na literatura (Godoy-Reyes *et al.*, 2019; Silva, da *et al.*, 2017). Para o **21** e **22**, no RMN ^1H foi possível notar o desaparecimento do sinal correspondente ao H do aldeído em δ 10 ppm e o aparecimento de um simpleto entre δ 8,3 – 8,9 ppm, característico do hidrogênio do grupo imina ($-\text{CH}=\text{N}-$). Além disso, nos espectros de RMN ^{13}C para esses mesmos compostos, o carbono da imina foi observado em $\delta \sim 160$ ppm.

10.4. Ensaios de inibição *in vitro* da tirosinase (*mushroom*)

10.4.1. Screening e IC_{50}

Os diferentes compostos (**1** – **22** - **Figura 21C**) foram comparados entre si para avaliar o efeito dos grupos substituintes nas diferentes posições, bem como, o efeito da ligação imínica, aminica e da hibridação com o ácido lipoico na inibição da tirosinase (*mushroom*). Para isso, inicialmente foi realizado um *screening* numa concentração fixa (100 μM) e comparando com o inibidor clássico ácido kójico (**Tabela 13**).

Tabela 13. Dados de inibição da enzima tirosinase para os derivados iminicos, aminicos e híbridos lipoicos sintetizados e do padrão. Condições: tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,8 30 °C.

Comp	I (%)	Comp.	I (%)	Comp.	IC ₅₀ (μM)
1	8,04 ± 3,33	13	64,96 ± 0,13	2	75,13 ± 3,25 ^a
2	60,92 ± 4,85	14	12,24 ± 0,75	6	22,91 ± 0,90 ^b
3	34,69 ± 2,26	15	48,89 ± 0,42	10	38,92 ± 3,9 ^c
4	25,48 ± 8,95	16	7,52 ± 0,58	11	50,74 ± 1,64 ^d
5	35,52 ± 5,79	17	28,57 ± 9,38	12	56,51 ± 3,99 ^{d, e}
6	73,58 ± 3,86	18	1,28 ± 0,53	13	47,01 ± 0,88 ^f
7	43,44 ± 0,85	19	29,59 ± 5,21	21	92,60 ± 1,12 ^g
8	30,87 ± 3,15	20	14,59 ± 1,21	22	48,16 ± 1,89 ^d
9	40,48 ± 5,44	21	77,26 ± 0,95	Resv.	26,84 ± 2,11 ^b
10	92,45 ± 0,97	22	71,68 ± 1,73	Ác. Kójico	62,84 ± 3,37 ^e
11	51,17 ± 5,77	Resv.	75,45 ± 3,52	-	-
12	86,41 ± 1,96	Ác. Kójico	71,79 ± 4,67	-	-

Os valores estão sendo apresentados como média ± SD ($n = 3$). Os valores seguidos por diferentes letras subscritas (a-g) na mesma coluna são correspondentes a diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autor, 2024.

Nas condições avaliadas, os compostos inibiram a tirosinase numa faixa de 1,28 ± 0,53 a 92,45 ± 0,97% (**Tabela 13**). Avaliando os resultados, os derivados iminicos, apresentaram os maiores percentuais de inibição da enzima tirosinase nas condições avaliada quando se compara as aminas (**18** – **19**), o que sugere que a ligação dupla C=N pode estar influenciando no processo de inibição enzimática. Adicionalmente, a quantidade de substituintes hidroxilados pode ter ou não influência na atividade desses compostos, como pode ser exemplificado pelos compostos de **1** a **4**. O composto **3**, sem substituinte, exibiu uma inibição da tirosinase de 34,69 ± 2,26%. Em contraste, os compostos **1** (8,04 ± 3,33), **2** (60,92 ± 4,85) e **4** (25,48 ± 8,95), que possuem respectivamente uma, duas e três OH, demonstraram percentuais de inibição da enzima bastante variados e distintos em relação ao composto **3**. Outro aspecto relevante a ser abordado é o anel no qual a hidroxila está posicionada, como evidenciado nos compostos **1** e **6**. Ambos possuem apenas um grupo OH na posição para, mas em anéis distintos. Notavelmente, a presença desse substituinte no anel B do composto **6** resultou em um aumento de até 9 vezes na inibição da tirosinase em comparação com o composto **1**. No que diz respeito ao composto **7**, observou-se que a fração imina resultou em uma diminuição de aproximadamente duas vezes na atividade do composto em comparação com o padrão resveratrol. Isso indica que o bioisosterismo direto não seria a melhor alternativa quando comparado a outros compostos da mesma classe, como os compostos de **10** a **12**. Estes últimos, mesmo apresentando a mesma quantidade de grupos hidroxila

nos anéis A e B que o composto **7**, mostraram uma inibição da enzima superior a 50% nas mesmas condições avaliadas, indicando que a posição do substituinte pode ser um dos responsáveis do processo de inibição. Sendo assim, de um modo geral, a presença ou posição do substituinte hidroxilado interferiu de maneira significativa na atividade dos compostos avaliados, o que pode estar associado a interações mais efetivas com os resíduos de aminoácidos da enzima.

Os resultados do IC₅₀ (**Tabela 13**) de inibição da tirosinase para os compostos mais eficientes em relação aos demais no *screening* demonstraram que os compostos **6**, **10**, **11**, **13** e **22** apresentaram-se significativamente mais eficiente como inibidores da enzima, que o padrão ácido kójico (teste de Tukey, $p < 0.05$). Além disso, o composto **6** apresentou um IC₅₀ comparável ao padrão resveratrol. (teste de Tukey, $p < 0,05$). Adicionalmente, os resultados demonstraram que a hibridização com o ácido lipoico não foi o suficiente pra potencializar a atividade anti-tirosinase quando se compara com outros compostos mais simples estruturalmente, como o composto **2**. Alyar *et al.*, (2019) avaliando a inibição da tirosinase por parte de bases de Schiff derivadas de sulfas obteve valores de IC₅₀ 24 a 53 μM . Tang e colaboradores (Tang, Liu e Wu, 2016) avaliando bases de Schiff derivadas de tiodiazóis conseguiu resultados de IC₅₀ que variaram de 0,036 $\pm$ 0,002 a 247,350 $\pm$ 3,782 μM .

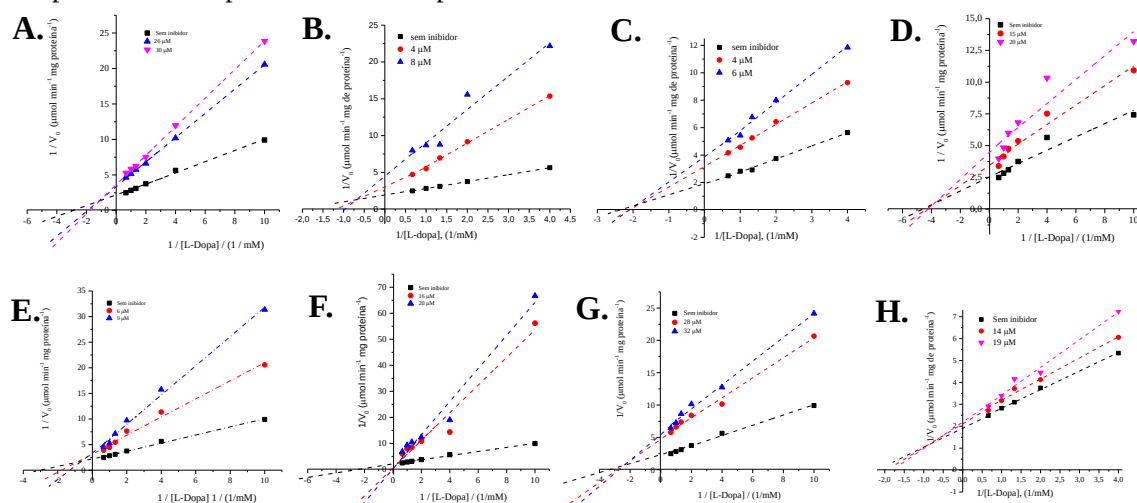
10.4.2. Mecanismo de inibição

O mecanismo de ação dos compostos mais ativos frente aos resultados *in vitro* de inibição da tirosinase *mushroom* foi avaliado a partir de estudos cinéticos usando diferentes concentrações do composto (4 a 32 μM) e do substrato (0,25 – 3,0 mM) (**Figura 22**). Nas condições avaliadas, a tirosinase apresentou uma cinética Michaeliana, em que, o gráfico da velocidade inicial (V_0) versus concentração de L-dopa (mM) apresentou um comportamento hiperbólico, com uma constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima (V_{max}) nas reações livres de inibidor de tirosinase igual a 0,526 $\pm$ 0,01 mM e 0,472 $\pm$ 0,02 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg de proteína}^{-1}$, respectivamente.

O gráfico Lineweaver-Burk (**Figura 22A-H**), foi usado para avaliar o mecanismo de inibição das bases de Schiff **2**, **6**, **10** a **13** e dos híbridos lipoicos **21** e **22** e o efeitos desses sobre as constantes K_m e $V_{m\acute{a}x}$. Com exceção do composto **13**, que teve os ajustes lineares cruzando-se no primeiro quadrante, todos os demais tiveram seus ajustes lineares cruzando-se no segundo quadrante (**Figura 22A-H**), perfil característico de uma inibição

do tipo misto para nibidores da tirosinase (*mushroom*) (Min *et al.*, 2023). O aumento da concentração do inibidor, por sua vez, acarretou num aumento ou diminuição nos valores de K_m e de $V_{m\acute{a}x}$ a depender do composto, assim foi calculado a razão $K_m/V_{m\acute{a}x}$ (**Tabela 14**) para se ter uma resposta mais eficiente quanto ao tipo de inibição enzimática, como em todos os casos essa razão diminuiu com o aumento da concentração do inibidor, isso configura-se uma inibição do tipo mista (Jiang *et al.*, 2021; Mittal, Singh e Benjakul, 2023; Ochs, 2000). Adicionalmente, foram calculadas as constantes K_i (constante de dissociação do equilíbrio **composto**-tirosinase) e K_i' (constante de dissociação do equilíbrio **composto**-tirosinase-L-dopa) para assim determinar a preferência de ligação dos compostos. Dessa forma, quando $K_i > K_i'$ e $K_i < K_i'$ indicam preferência de ligação do composto pela enzima livre e pelo complexo, respectivamente (Min *et al.*, 2023; Song *et al.*, 2020). Assim, a partir dos valores de K_i e K_i' (**Tabela 14**) pôde-se notar que os compostos **11**, **21** e o **22** apresentam uma preferência de ligação pelo complexo tirosinase-L-dopa, os demais compostos tem preferência pela enzima livre. No que se refere aos híbridos lipoicos (**21** e **22**), como uma das principais diferença entre esses e os demais compostos avaliados é o ácido, essa preferência pode estar associada ao aumento da cadeia.

Figura 22. Gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk para os compostos mais ativos frente a inibição da tirosinase (*mushroom*). **A.** Composto **2**. **B.** Composto **6**. **C.** Composto **10**. **D.** Composto **11**. **E.** Composto **12**. **F.** Composto **13**. **G.** Composto **21**. **H.** Composto **22**. Condições: Tampão fosfato de potássio, 50 mM, pH 6,8.



Fonte: Autor, 2024.

Tabela 14. Parâmetros de cinéticos para os compostos **2**, **6**, **10** a **13**, **21** e **22** com a tirosinase. Condições: Tampão fosfato de potássio, 50 mM, pH 6,8.

Composto	[] (μM)	K _m app (mM)	V _{max} app ($\mu\text{mol min}^{-1}$ mg de proteína ⁻¹)	V _{max} app /K _m app	K _i (μM)	K _i ' (μM)
2	0	0,472 $\pm$ 0,02	0,526 $\pm$ 0,01	1,10	0,04 $\pm$ 0,001	0,02 $\pm$ 0,002
	26	0,460 $\pm$ 0,01	0,282 $\pm$ 0,00	0,60		
	30	0,252 $\pm$ 0,01	0,472 $\pm$ 0,03	0,53		
6	0	0,472 $\pm$ 0,02	0,526 $\pm$ 0,01	1,10	0,62 $\pm$ 0,18	0,03 $\pm$ 0,001
	4	1,171 $\pm$ 0,21	0,379 $\pm$ 0,04	0,32		
	8	0,862 $\pm$ 0,33	0,208 $\pm$ 0,04	0,24		
10	0	0,472 $\pm$ 0,02	0,526 $\pm$ 0,01	1,10	0,19 $\pm$ 0,03	0,18 $\pm$ 0,007
	4	0,39 $\pm$ 0,08	0,29 $\pm$ 0,02	0,74		
	6	0,41 $\pm$ 0,13	0,24 $\pm$ 0,02	0,58		
11	0	0,39 $\pm$ 0,07	0,49 $\pm$ 0,03	1,25	0,03 $\pm$ 0,006	0,04 $\pm$ 0,001
	15	0,41 $\pm$ 0,10	0,35 $\pm$ 0,03	0,85		
	20	0,61 $\pm$ 0,19	0,33 $\pm$ 0,04	0,54		
12	0	0,472 $\pm$ 0,02	0,526 $\pm$ 0,01	1,10	0,22 $\pm$ 0,018	0,05 $\pm$ 0,001
	6	1,01 $\pm$ 0,17	0,43 $\pm$ 0,03	0,42		
	9	1,63 $\pm$ 0,38	0,46 $\pm$ 0,06	0,28		

13	0	$0,472 \pm 0,02$	$0,526 \pm 0,01$	1,10	$0,34 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,005$
	16	$0,827 \pm 0,01$	$0,248 \pm 0,04$	0,29		
	20	$1,10 \pm 0,07$	$0,195 \pm 0,02$	0,17		
21	0	$0,472 \pm 0,02$	$0,526 \pm 0,01$	1,10	$0,03 \pm 0,002$	$0,05 \pm 0,006$
	28	$0,30 \pm 0,04$	$0,20 \pm 0,00$	0,66		
	32	$0,41 \pm 0,07$	$0,19 \pm 0,01$	0,46		
22	0	$0,472 \pm 0,02$	$0,526 \pm 0,01$	1,10	$0,03 \pm 0,001$	$0,05 \pm 0,002$
	14	$0,47 \pm 0,06$	$0,43 \pm 0,03$	1,16		
	19	$0,57 \pm 0,09$	$0,46 \pm 0,03$	0,80		

K_M app: Constante de Michaelis-Menten na presença do inibidor. V_{max} app: Velocidade máxima da urease na presença do inibidor. K_i : Constante de dissociação do equilíbrio para o complexo composto-tirosinase. K_i : Constante de dissociação do equilíbrio para o complexo composto-tirosinase-L-dopa

Fonte: Autor, 2024.

10.5. Atividade fotoprotetora UVB *in vitro*

O Fator de Proteção Solar Ultravioleta B (FPS-UVB) dos compostos 1 a 22 e do padrão BZF-3 foi determinado por meio de medidas espectrofotométricas. Inicialmente, a faixa linear de absorção no UV-vis foi estabelecida a partir de curvas analíticas (**Figura 80** em anexo). Para isso, foram realizadas varreduras espectrofotométricas dos compostos em concentrações variando de 5 a 400 μM . A análise das medidas revelou que os compostos exibiram uma faixa linear notável entre 5 e 200 μM . Portanto, optou-se por conduzir as medidas de UV-vis apenas para as concentrações de 100 μM , uma vez que essa faixa representa o intervalo ótimo para análise. Essas medidas serão utilizadas no subsequente cálculo do FPS-UVB

A determinação do FPS-UVB foi realizada utilizando o método *in vitro* proposto por Mansur et al., (1986) conforme a **Equação 1**. A maioria dos compostos analisados demonstrou valores de FPS-UVB superiores a 6 (**Tabela 15**), indicando um significativo de proteção. Esse resultado é relevante, uma vez que 6 é o valor mínimo estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012), no Brasil.

Tabela 15. Valores de Fator de Proteção Solar UVB (FPS-UVB) *in vitro* dos compostos 1 – 22 e do BZF-3 nas concentrações de 100 μM .

Composto	FPS-UVB	Composto	FPS-UVB
1	$8,08 \pm 0,38^a$	13	-
2	$12,01 \pm 0,48^b$	14	$4,52 \pm 0,58^h$
3	$5,66 \pm 0,35^c$	15	$11,19 \pm 0,61^g$
4	$3,75 \pm 0,32^d$	16	$10,77 \pm 0,32^g$
5	$14,27 \pm 0,08^e$	17	$21,53 \pm 0,74^i$
6	$6,25 \pm 0,29^c$	18	$2,24 \pm 0,13^h$
7	-	19	$1,79 \pm 0,09^{h,j}$
8	$5,94 \pm 0,91^c$	20	$0,45 \pm 0,11^j$
9	$10,55 \pm 0,59^f$	21	$10,26 \pm 0,91^g$
10	$12,17 \pm 0,79^b$	22	$6,59 \pm 0,43^a$
11	$10,59 \pm 0,32^g$	BZF	$9,60 \pm 0,17^{a,g}$
12	$3,74 \pm 0,01^h$	-	-

Os valores estão sendo apresentados como média $\pm$ SD ($n = 3$). Os valores seguidos por diferentes letras sobrescritas (a-j) nas colunas são correspondentes a diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).
– Não apresentaram atividade.

Fonte: Autor, 2024.

Os compostos também foram comparados com a 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (BZF-3), que é um fotoprotetor presente em formulações comerciais (Araújo *et al.*, 2014; Nascimento *et al.*, 2014). Assim, pôde-se notar que os resultados 13 obtidos para as bases de *Schiff* demonstraram que esses compostos apresentaram FPS-UVB comparável ou até

mesmo superior ao padrão BZF (teste de *Tukey* $p < 0,05$), com destaque ao composto **17** que apresentou uma atividade de $21,53 \pm 0,74$. Os compostos **18** – **19** apresentaram um FPS de até 21 vezes menores que o padrão e até aproximadamente 48 vezes inferiores a algumas bases de *Schiff*, demonstrando que a dupla ligação da função imina mais uma vez apresenta influência sobre a atividade biológica, o que era esperado para esse caso, uma vez que, a ligação C=N é um cromóforo que absorve energia suficiente para causar a transferência de elétrons para um orbital mais energético, ou seja, a absorção de radiação UV leva à excitação de elétrons encontrados no orbital π HOMO e sua posterior transferência para o orbital π^* LUMO (Polonini *et al.*, 2013). Quanto aos compostos **21** e **22**, pôde-se notar que a formação dos híbridos lipoicos não influencia nessa atividade. Tomando como referência as recomendações da FDA (2017), que estabelece os FPS-UVB igual ou superior a 15, estima-se que o **17** seria o composto mais promissor para a continuidade desses estudos visando um produto com atividade fotoprotetora. Reis *et al.*, (2014), ao avaliarem a atividade fotoprotetora (FPS) de híbridos de resveratrol com avobenzona e octil metoxicinamatos encontraram valores que variaram de $2 \pm 0,1$ a $5 \pm 0,2$.

10.6. Capacidade antioxidante

Nos ensaios de capacidade antioxidante, os compostos foram avaliados frente aos métodos de sequestro dos radicais DPPH $\cdot$, ABTS $\cdot^+$, potencial de redução de íons Fe (III) (FRAP), potencial de redução de íons Cu (II), além de complexação de Fe (II) (**Tabela 17**). Nesta avaliação foram empregados como controles positivos para comparação, o resveratrol (estrutura base para a síntese dos compostos), o ácido caféico (ácido fenólico conjugado), o ácido ferrúlico (ácido fenólico conjugado fotoprotetor), o piacetanol (estilbeno derivado do resveratrol), o Trolox $^{\text{®}}$ (mimético da vitamina E), a quercetina (flavonóide) e o EDTA (agente complexante), os quais são compostos antioxidantes ou complexantes de diferentes classes e graus de lipofilicidade.

Tabela 16. Capacidade antioxidante das bases de *Schiff*, os derivados amínicos, dos híbridos lipoicos e dos padrões, medidas pelos métodos DPPH[•], ABTS^{•+}, complexação de Fe (II), FRAP e CUPRAC.

Compostos/ Padrões	Métodos				
	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)			FRAP Normalizado*	CUPRAC (TE)
	DPPH [•]	ABTS ^{•+}	Complexação de Fe (II)		
1	4,63 ± 1,07 ^{a,c, d}	4,26 ± 0,36 ^a	> 200	0,0099 ± 0,0002 ^a	0,99 ± 0,06 ^a
2	4,03 ± 0,26 ^{a,b, d}	1,71 ± 0,06 ^a	> 200	0,0057 ± 0,0002 ^b	1,07 ± 0,01 ^a
3	1,66 ± 0,63 ^{b, d}	7,62 ± 0,17 ^a	> 200	0,0113 ± 0,001 ^a	0,94 ± 0,01 ^a
4	2,91 ± 0,10 ^{a,b}	0,85 ± 0,33 ^a	> 200	0,0299 ± 0,0013 ^c	0,91 ± 0,23 ^a
5	3,91 ± 0,02 ^{a,b, d}	0,25 ± 0,02 ^a	> 200	0,0704 ± 0,0093 ^d	1,13 ± 0,05 ^a
6	7,00 ± 0,17 ^c	4,46 ± 0,04 ^a	> 200	0,0399 ± 0,0006 ^c	1,03 ± 0,05 ^a
7	5,67 ± 0,38 ^a	0,016 ± 0,001 ^a	> 200	0,0357 ± 0,0015 ^c	0,93 ± 0,02 ^a
8	3,68 ± 0,20 ^{a,b,d}	3,94 ± 0,09 ^a	> 200	0,0369 ± 0,0015 ^c	n.a.
9	1,99 ± 0,08 ^d	2,69 ± 0,07 ^a	> 200	0,1835 ± 0,0009 ^e	0,77 ± 0,08 ^a
10	3,05 ± 0,11 ^d	2,29 ± 0,05 ^a	> 200	0,0856 ± 0,0021 ^f	0,57 ± 0,09 ^b
11	2,10 ± 0,04 ^d	3,43 ± 0,11 ^a	> 200	0,0729 ± 0,0089 ^f	0,57 ± 0,04 ^b
12	7,10 ± 0,19 ^c	0,90 ± 0,01 ^a	> 200	0,0314 ± 0,0027 ^c	2,04 ± 0,12 ^c
13	4,07 ± 0,0 ^{a,b,d}	4,23 ± 0,05 ^a	> 200	0,0297 ± 0,0025 ^c	0,79 ± 0,02 ^a
14	44,75 ± 3,01 ^e	6,96 ± 0,02 ^a	> 200	n.a.	n.a.
15	2,15 ± 0,24 ^{a,b,d}	2,21 ± 0,06 ^a	> 200	n.a.	2,66 ± 0,07 ^d
16	2,95 ± 0,96 ^{a,b,d, h}	2,72 ± 0,05 ^a	> 200	0,1219 ± 0,0078 ^g	3,00 ± 0,03 ^e
17	1,67 ± 0,02 ^{a,b,d, h}	3,21 ± 0,09 ^a	> 200	0,1074 ± 0,0026 ^g	0,80 ± 0,03 ^a
18	14,52 ± 2,86 ^f	2,91 ± 0,25 ^a	> 200	0,0479 ± 0,0031 ^h	1,00 ± 0,02 ^a
19	12,84 ± 0,77 ^f	2,89 ± 0,06 ^a	> 200	0,0361 ± 0,0003 ^c	1,06 ± 0,04 ^a
20	> 150	120,7 ± 26,64 ^b	> 200	0,0181 ± 0,0009 ^c	0,96 ± 0,01 ^a
21	5,89 ± 0,13 ^{a,b,c}	8,48 ± 0,22 ^a	> 200	0,0602 ± 0,0016 ^d	0,87 ± 0,04 ^a
22	9,58 ± 2,41 ^g	8,23 ± 0,31 ^a	> 200	0,0351 ± 0,0021 ^c	2,41 ± 0,02 ^d
Resveratrol	7,16 ± 0,28 ^{a,c}	0,62 ± 0,01 ^a	n.a.	0,0509 ± 0,0027 ^d	1,40 ± 0,02 ^e

Ácido lipoico	> 150	> 150	> 200	$0,0222 \pm 0,0013^c$	n.a.
Ácido caféico	$1,55 \pm 0,12^{a,b,d}$	$4,44 \pm 1,44^a$	n.a.	$0,0912 \pm 0,0031^h$	n.a.
Ácido ferrúlico	$2,81 \pm 0,44^{a,b,d}$	$0,97 \pm 0,36^a$	n.a.	$0,0447 \pm 0,0033^c$	n.a.
Piacetanol	$2,08 \pm 0,01^{a,b,d}$	$0,53 \pm 0,09^a$	n.a.	$0,1213 \pm 0,0028^i$	$1,16 \pm 0,03^f$
Quercetina	$0,87 \pm 0,07^h$	$0,66 \pm 0,13^a$	n.a.	$0,1334 \pm 0,0042^i$	$2,05 \pm 0,02^g$
Trolox®	$1,62 \pm 0,07^{a,b,d,h}$	$3,24 \pm 0,19^a$	$186,4 \pm 9,62^a$	$0,0427 \pm 0,0007^d$	n.a.
EDTA	n.a	n.a	$36,09 \pm 1,03^b$	n.a	n.a.

*Absorvância normalizada (A_{593} por a concentração de $10 \mu\text{M}$). Os valores estão sendo apresentados como média $\pm$ SD ($n = 3$). Os valores seguidos por diferentes letras subscritas (a-h) na mesma coluna são correspondentes a diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). TE – Equivalentes de Trolox®. n.a. Não avaliado. O EDTA foi usado apenas como padrão para o ensaio de complexação.

Fonte: Autor, 2024.

Avaliando os resultados para o ensaio DPPH•, pôde-se notar que frente a redução dessa espécie radicalar, para os compostos sintetizados, quatro fatores estruturais influenciam em suas atividades: i) a presença da ligação imina; ii) os grupos substituintes; iii) a posição do grupo substituinte e, iv) o tamanho do composto antioxidante. O mecanismo de inibição dessa espécie radicalar pode ser tanto via transferência de elétrons, quanto transferência de próton (Faillace *et al.*, 2020). Assim, quando se avalia o IC₅₀ dos compostos sintetizados, pode-se notar que a ligação imina influencia significativamente (teste de Tukey $p < 0,05$) na atividade dos compostos. Tomando como referência os compostos **3** ($1,66 \pm 0,63 \mu\text{M}$) e **19** ($12,84 \pm 0,77 \mu\text{M}$), a imina sem substituinte e seu correspondente reduzido, pode-se notar que a ligação C=N aumenta em aproximadamente 8 vezes a atividade, o que pode estar associado a uma maior quantidade de elétrons disponíveis nesse grupo passível de atuar via mecanismo de transferência de elétrons, para com isso inibir essa espécie radicalar. O fator substituição, por sua vez, só expressa influência sobre o processo de inibição da espécie radicalar em questão, quando em posições específicas, não sendo a quantidade um fator tão importante quanto o fator posição. Adicionalmente, no que diz respeito à inibição dessa espécie radicalar em particular, o fator de substituição exerce influência apenas quando em posições específicas (*orto*, *meta*, *para*) nos anéis A e/ou B do núcleo básico imínico (**Figura 21**), sendo a quantidade menos crucial quando comparada à importância do fator de posição. Quando se compara os compostos **1** ($4,63 \pm 1,07 \mu\text{M}$) e **2** ($4,03 \pm 0,26 \mu\text{M}$) os quais possuem uma e duas OH, respectivamente, esses não apresentaram atividades comparáveis (teste de Tukey, $p < 0,05$). Já ao examinar os compostos **11** ($2,10 \pm 0,04 \mu\text{M}$) e **12** ($7,10 \pm 0,19 \mu\text{M}$), ambos contendo a mesma quantidade de grupos OH (três, no entanto, em posições diferentes), observaram-se diferenças significativas na inibição. Isso evidencia que a posição em que o substituinte está localizado nos anéis A e B pode exercer uma influência notável na atividade em relação ao radical DPPH•. No que diz respeito aos híbridos lipoicos (**21-22**), observou-se que, nesse método, o processo de hibridação não desempenha um papel tão significativo na inibição do DPPH•. Para esses compostos, foi possível obter valores de IC₅₀ iguais, comparáveis ou superiores para algumas iminas. Silva *et al.* (2017), ao empregar este método e avaliar compostos com o mesmo núcleo básico examinado aqui, mas variando apenas os substituintes, obtiveram resultados que variaram de 12,2 a 55,8 μM . Reis *et al.*, (2014), ao avaliarem híbridos de resveratrol com avobenzona e octil metoxicinamatos para aplicação cosmética, obtiveram valores de IC₅₀

de inibição do DPPH• na faixa de 88,2 a 275 µM. Esses resultados evidenciam que os núcleos abordados nesse estudo demonstraram maior eficiência em relação a esse método.

Para os métodos seguintes, as diferenças entre os compostos não se demonstraram tão expressivas quanto para o método DPPH•, entretanto, isso não quer dizer que os fatores discutidos anteriormente para essas moléculas não influenciaram em suas atividades. Assim, para o método ABTS•⁺, foi possível notar que os compostos avaliados apresentaram uma atividade comparável entre si e entre todos os padrões avaliados (teste de Tukey, $p < 0,05$), tendo o derivado direto do resveratrol (composto **7**) um IC₅₀ bastante expressivo ($0,016 \pm 0,0001$ µM). No ensaio de complexação de Fe(II), todos os compostos avaliados demonstraram um IC₅₀ superior a 200 µmol L⁻¹, indicando uma atividade considerável. Vale ressaltar que o ferro é um cofator essencial em células do corpo humano, desempenhando papéis cruciais em diversos processos bioquímicos, como na síntese de DNA, no transporte de oxigênio e na produção de energia. Portanto, moléculas que formam complexos com essa espécie podem acarretar problemas diversos no organismo. No entanto, é importante notar que metais em níveis traços também desempenham um papel significativo na geração de radicais livres, resultantes da decomposição de hidroperóxidos lipídicos em radicais livres (Gülçin, 2010; Yehye *et al.*, 2015).

Para a capacidade de redução de Ferro (FRAP), pôde-se notar que os todos os compostos avaliados apresentaram capacidade em reduzir Fe (III) a Fe (II), tendo o composto **16** ($0,1219 \pm 0,0078$) e o **17** ($0,1074 \pm 0,0026$) a atividade mais pronunciada da série avaliada, sendo esses, espécies redutoras de Fe (III) mais eficientes que os todos os padrões, exceto, o piacetanol e a quercetina.

Adicionalmente, para o ensaio de redução de cobre (II), todos os compostos demonstraram reduzir íons cúpricos. Para o estudo, foi avaliado os coeficientes TE de cada composto, encontrado a partir da razão das absortividades molares dos compostos pela do Trolox®. De um modo geral, todos os compostos apresentaram um TE_{CUPRAC} > 0,57, em que o **16** ($3,00 \pm 0,03$) apresentou a maior atividade da série avaliada, uma atividade superior aos padrões, incluindo o resveratrol (teste de Tukey, $p < 0,05$). Vale ressaltar que a redução das iminas a aminas correspondentes não gerou diferença significativa nos resultados frente a esse método (teste de Tukey, $p < 0,05$). No caso dos híbridos lipoicos, foi observada uma diferença significativa entre algumas iminas (teste de Tukey, $p < 0,05$). Além disso, destacou-se uma variação significativa entre os próprios

híbridos, evidenciando que a presença de substituintes hidroxilados, dependendo da posição, pode tanto aumentar quanto diminuir a atividade desses compostos neste núcleo, em relação a esse método. Eglence-Bakır (2021) avaliando semicarbazonas, obteve coeficientes TE_{CUPRAC} entre $0,90 \pm 0,02$ a $2,53 \pm 0,05$.

10.7. Estudos *in silico*

10.7.1. Propriedades ADMET

A aplicação de cálculos teóricos surge como uma abordagem acessível e, por vezes, ágil para antecipar o comportamento de compostos em contextos biológicos. Nesse contexto, as propriedades ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) *in silico* dos compostos sintetizados (**1-22**) foram avaliadas por meio do *website* SwissADME e do *software* OSIRISDataWARRIOR (**Tabela 18**). Para avaliar a relevância terapêutica, as propriedades das moléculas geralmente são validadas conforme as regras de Lipinski, Veber e Egan. Essas regras sugerem que, para um composto apresentar boa permeação e absorção no organismo, seu peso molecular deve ser inferior a 500 g/mol, com centros de doação de ligação de hidrogênio inferiores (HDA) a 5, centros aceptadores de ligação de hidrogênio (HDB) inferiores a 10, uma área de superfície polar topológica (TPSA) igual ou inferior a 140, um número de ligações rotativas igual ou inferior a 10, e um Log P igual ou inferior a 5,88 (Egan, Merz e Baldwin, 2000; Lipinski *et al.*, 2001; Veber *et al.*, 2002). Os resultados obtidos nos ensaios *in silico* indicaram que todos os compostos analisados neste estudo estão em conformidade com os critérios que preveem a eficiência de compostos como candidatos a fármacos.

Em relação às aplicações biotecnológicas, os estudos físico-químicos oferecem um parâmetro de extrema importância para o desenvolvimento de aplicações em loções cosméticas. Um modelo linear que correlaciona a massa molecular e a lipofilicidade dos compostos, conhecido como log Kp (coeficiente de permeabilidade na pele), o qual indicou que todos os compostos analisados possuem uma baixa permeabilidade cutânea. Os compostos de **1** a **22** exibiram variações em sua permeabilidade, situando-se entre $-5,20$ a $-6,16 \text{ cm.s}^{-1}$, todos inferiores ao padrão BZF-3, que possui uma permeabilidade de $-5,0 \text{ cm.s}^{-1}$. Destaca-se que, quanto mais negativo o log Kp, menor será a capacidade da molécula em permear na pele (Daina, Michielin e Zoete, 2017; Potts e Guy, 1992).

Tabela 17. Parâmetros físico-químicas, de toxicidade, permeabilidade cutânea e bioatividade dos compostos 1 – 22 e dos padrões.

Comp.	Fórmula molecular	Massa molecular (g/mol)	Parâmetros físico-químicos						Log K _p (cm/s)	Score de bioatividade	Parâmetros de toxicidade
			Log P	TPSA (Å ²)	Log S	HDB	HBA	Nº de ligações rotativas			Mutagenicidade/Tumorigenicidade/Reprodutividade efetiva/Irritação
1	C ₁₃ H ₁₁ NO	197,23	2,75 ± 0,51	32,59	-3,07	1	2	2	-5,76	0,55	Nenhuma
2	C ₁₃ H ₁₁ NO ₂	213,23	2,44 ± 0,54	52,82	-3,30	2	3	2	-5,66	0,55	Nenhuma
3	C ₁₃ H ₁₁ N	181,23	3,18 ± 0,54	12,36	-3,24	0	1	2	-5,40	0,55	Nenhuma
4	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃	229,23	2,04 ± 0,54	73,05	-3,15	3	4	2	-6,01	0,55	Nenhuma
5	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃	229,23	2,15 ± 0,46	73,05	-3,15	3	4	2	-6,01	0,55	Nenhuma
6	C ₁₃ H ₁₁ NO	197,23	2,72 ± 0,55	32,59	-3,07	1	2	2	-5,76	0,55	Nenhuma
7	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃	229,23	2,01 ± 0,51	73,05	-3,01	3	4	2	-6,16	0,55	Nenhuma
8	C ₁₃ H ₁₁ NO ₂	213,23	2,34 ± 0,49	52,82	-2,91	2	3	2	-6,10	0,55	Nenhuma
9	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃	229,23	2,10 ± 0,56	73,05	-3,27	3	4	2	-5,87	0,55	Nenhuma
10	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃	229,23	1,98 ± 0,54	73,05	-3,01	3	4	2	-6,16	0,55	Alta/ Nenhuma/ Nenhuma/ Nenhuma
11	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃	229,23	2,09 ± 0,49	73,05	-3,15	3	4	2	-6,01	0,55	Alta/ Nenhuma/ Nenhuma/ Nenhuma
12	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃	229,23	2,01 ± 0,60	73,05	-3,15	3	4	2	-6,01	0,55	Nenhuma
13	C ₁₃ H ₁₁ NO ₂	213,23	2,41 ± 0,49	52,82	-3,17	2	3	2	-5,82	0,55	Nenhuma
14	C ₁₃ H ₁₁ NO ₂	213,23	2,34 ± 0,49	52,82	-2,91	2	3	2	-6,10	0,55	Nenhuma
15	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃	229,23	2,10 ± 0,56	73,05	-3,27	3	4	2	-5,87	0,55	Nenhuma
16	C ₁₃ H ₁₁ NO ₂	213,23	2,54 ± 0,47	52,82	-3,43	2	3	2	-5,52	0,55	Nenhuma
17	C ₁₃ H ₁₁ NO ₂	213,23	2,50 ± 0,44	52,82	-3,30	2	3	2	-5,66	0,55	Alta/ Nenhuma/ Nenhuma/ Nenhuma

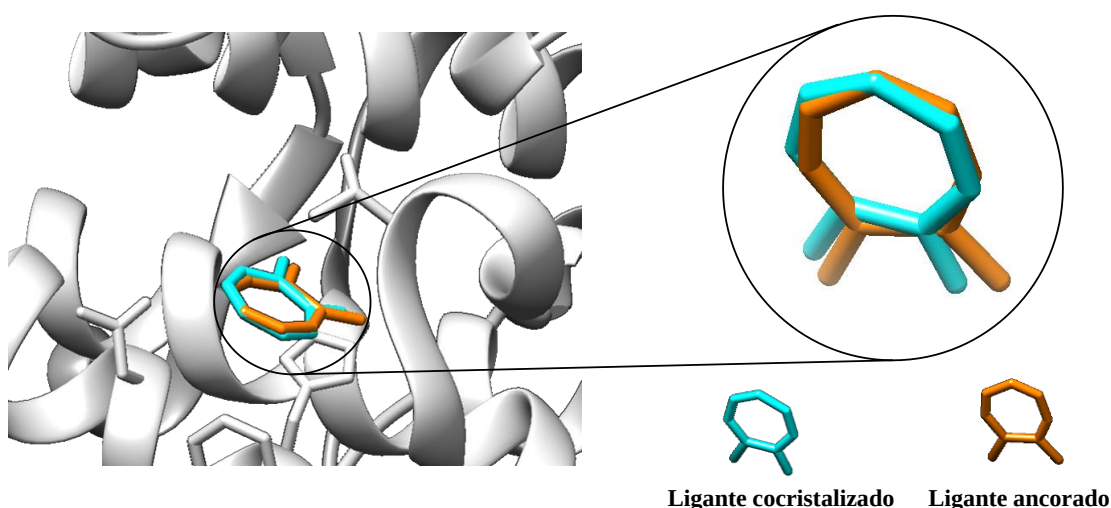
18	C ₁₃ H ₁₃ NO	199,25	2,56 ± 0,27	32,26	-3,21	2	1	3	-5,55	0,55	Nenhuma
19	C ₁₃ H ₁₃ N	183,25	3,00 ± 0,34	12,03	-3,38	1	0	3	-5,20	0,55	Nenhuma
20	C ₁₅ H ₁₈ O ₃ S ₂	310,43	3,39 ± 0,77	93,97	-3,36	0	3	8	-6,05	0,55	Nenhuma/ Nenhuma/ Nenhuma/Alta
21	C ₂₁ H ₂₃ NO ₃ S ₂	401,54	4,60 ± 1,09	109,49	-4,90	1	4	9	-5,55	0,55	Nenhuma
22	C ₂₁ H ₂₃ NO ₃ S ₂	401,54	4,61 ± 1,08	109,49	-4,90	1	4	9	-5,55	0,55	Nenhuma
Resveratrol	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	228,24	2,48 ± 0,54	60,69	-3,62	3	3	2	-5,47	0,55	Alta/Nenhuma/Alta/Nenhuma
AC. Kójico	C ₆ H ₆ O ₄	142,11	-0,16 ± ,12	70,67	-0,70	2	4	1	-7,62	0,55	Alta/Alta/Nenhuma/Nenhuma
Ac. Lipoico	C ₈ H ₁₄ O ₂ S ₂	206,33	2,04 ± 0,51	87,90	-1,85	1	2	5	-6,37	0,55	Nenhuma
BZF-3	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	228,24	2,75 ± 0,74	46,53	-3,97	1	3	3	-5,00	0,55	Alta/Alta/Alta/Nenhuma

Fonte: Autor, 2024.

10.7.2. Redocking molecular

Os estudos teóricos de ancoragem molecular foram realizados com a enzima tirosinase *Agaricus bisporus* de código PDB ID: 2Y9X, que possui o ligante cocrystalizado tropolona. Inicialmente, realizou-se o *redocking* desse ligante, como método de validação dos parâmetros de encaixe especificados no algoritmo de entrada (input). Neste caso, o algoritmo retornou com uma pose de RMSD abaixo de 2 Å. A partir da **Figura 23**, observa-se que o algoritmo de docking encontrou uma conformação para o ligante tropolona semelhante àquela observada na estrutura cristalográfica, demonstrando que os parâmetros de encaixe especificados no arquivo de entrada para o método, foram capazes de recuperar a estrutura e as interações do complexo, confirmando a robustez para o posterior *docking* dos compostos sintetizados (1 – 22).

Figura 23. Redocking ligante cocrystalizado tropolona com a enzima tirosinase (azul -ligante cocrystalizado; Laranja- ligante ancorado).



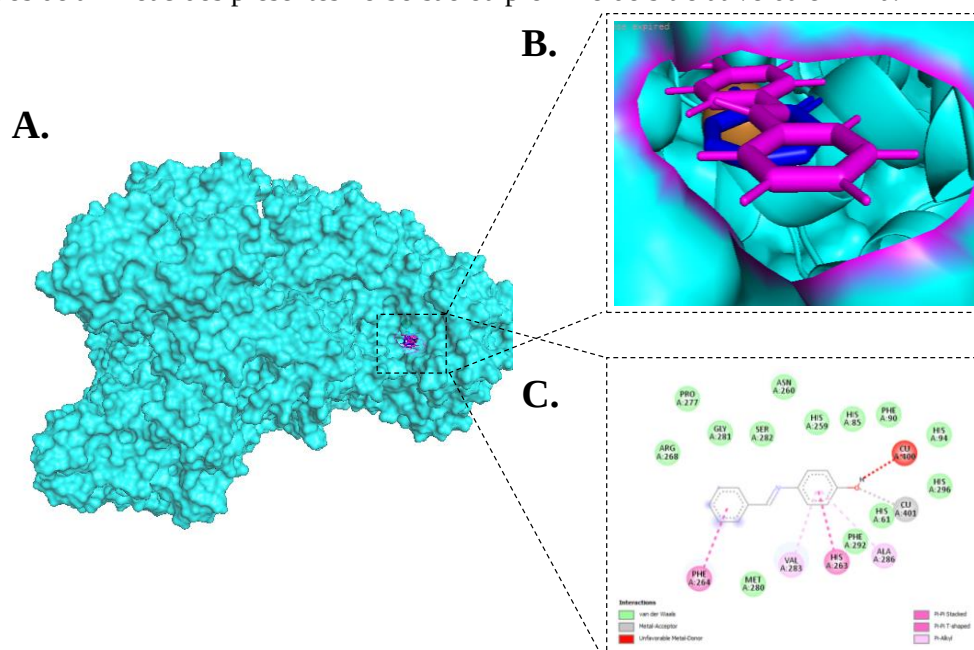
Fonte: Autor, 2024.

10.7.3. Docking molecular

Para entender a influência das interações entre compostos sintetizados e os resíduos de aminoácidos da enzima no processo de inibição enzimática, foram realizados estudos de *docking* molecular (**Figura 24**). Assim, os compostos apresentaram energias de correlação (fitscore) que variaram entre 39,12 a 55,76, não demonstrando nenhuma correlação numérica entre essas energias e os valores percentuais de inibição dos compostos os sintetizados. Para os demais resultados, o composto **6**, que se destacou como o mais ativo nos estudos experimentais de inibição, foi selecionado para apresentar os resultados. Notavelmente, todos os outros compostos demonstraram uma tendência a

interagir com resíduos de aminoácidos no sítio ativo ou em regiões próximas a ele. Ao observar a **Figura 24B** para o composto **6**, fica evidente que este ocupou a mesma região onde o ligante cocrystalizado (tropolona) está localizado no sítio ativo da enzima. Adicionalmente, observou-se que o composto **6** interagiu com ambos os átomos de cobre no sítio ativo da enzima, assim como com os resíduos HIS263 e PHE264 por meio de interações do tipo π - π Stacking (**Figura 24C**). Além disso, estabeleceu interações π -alquil com os resíduos ALA286 e VAL283, e interações de van der Waals com resíduos de aminoácidos presentes na cavidade do sítio ativo da enzima. Portanto, os resultados de docking indicam que os compostos exercem atividade inibitória da enzima por meio da formação de complexos que são formados ao interagirem principalmente com resíduos próximos ao sítio ativo.

Figura 24. Representação dos estudos in silico de docking molecular entre os compostos avaliados (**1 – 22**) e a tirosinase mushroom (PDB ID: 2Y9X). **A.** Complexo macromolécula composto **6** e ligante cocrystalizado. **B.** Composto **6** na região próxima ao sítio ativo da enzima, local onde se encontra o ligante co-cristalizado tropolona. **C.** Interações do composto **6** com os resíduos de aminoácidos presentes no bolsão ou próximo do sítio ativo da enzima.



Fonte: Autor, 2024.

11. Conclusão

Neste trabalho, foi sintetizado bases de *Schiff*, aminas e híbridos lipoicos com padrões de substituição semelhantes ao resveratrol, alcançando rendimentos entre 49% e 98%. Os compostos, especialmente as iminas e os híbridos lipoicos, destacaram-se como eficientes inibidores da tirosinase. O composto **6**, por exemplo, exibiu uma atividade superior aos padrões ácido kójico e resveratrol, com um IC_{50} de $22,91 \pm 0,90 \mu M$. Os estudos cinéticos revelaram que os compostos mais ativos apresentaram uma inibição mista, preferindo a enzima livre para as bases de *Schiff* e o complexo para os híbridos lipoicos. Nos estudos de FPS-UVB, a ligação C=N mostrou forte influência na atividade biológica, destacando-se as bases de *Schiff*, com o composto **17** apresentando o maior valor de FPS ($21,53 \pm 0,74$), superando o BZF-3 ($p < 0,05$). Além disso, os compostos exibiram atividades antioxidantes promissoras, com o composto **7** sendo notável no método ABTS^{•+} ($IC_{50} = 0,016 \pm 0,0001 \mu M$). A análise físico-química indicou baixa permeabilidade cutânea, vantajosa para futuras aplicações cosméticas. Os estudos de inibição da tirosinase in vitro foram corroborados por ancoragem molecular, evidenciando interações predominantes de van der Waals e ligações de hidrogênio no sítio ativo da enzima.

12. Perspectivas

- Caracterizar os compostos por massas de alta resolução dos compostos;
- Realizar estudos de inibição da enzima elastase;
- Realizar estudos com a α -amilase e α -glicosidade;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória dos compostos.

13. Referências

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 30, de 1 de junho de 2012. Disponível em < <https://cosmeticsonline.com.br/ct/painel/fotos/assets/uploads/regulatorios/bef6e-RDC-30.pdf> > acesso em 19 de dezembro de 2018.
- ALYAR, S. *et al.* Synthesis, spectroscopic characterizations, enzyme inhibition, molecular docking study and DFT calculations of new Schiff bases of sulfa drugs. **Journal of Molecular Structure**, v. 1185, p. 416–424, 5 jun. 2019.
- ARAÚJO, C. R. M. *et al.* Synthesis and in vitro determination of SPF-UVB oximes derived from lapachol. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 6, p. 1702–1712, 1 nov. 2014.
- BERNINI, R. *et al.* Synthesis of a novel ester of hydroxytyrosol and α -lipoic acid exhibiting an antiproliferative effect on human colon cancer HT-29 cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 439–446, jan. 2011.
- CARMO BRITO, B. DE N. DO *et al.* Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation. **Food Chemistry**, v. 228, p. 484–490, ago. 2017.
- CHANG, T. S. **An updated review of tyrosinase inhibitors** *International Journal of Molecular Sciences*, jun. 2009.
- DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, 3 mar. 2017.
- DEHGHANI, Z. *et al.* Veratric acid derivatives containing benzylidene-hydrazine moieties as promising tyrosinase inhibitors and free radical scavengers. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 12, p. 2644–2651, jun. 2019.
- DEUS, V. L. *et al.* FTIR and PLS-regression in the evaluation of bioactive amines, total phenolic compounds and antioxidant potential of dark chocolates. **Food Chemistry**, v. 357, p. 129754, set. 2021.
- EGAN, W. J.; MERZ, K. M.; BALDWIN, J. J. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 21, p. 3867–3877, 19 out. 2000.
- EĞLENCE-BAKIR, S. New nickel(II) complexes containing N2O2 donor thiosemicarbazones: Synthesis, characterization and antioxidant properties. **Journal of Molecular Structure**, v. 1246, p. 131121, dez. 2021.

FAILLACE, M. S. *et al.* Sulfated and Oxygenated Imidazoline Derivatives: Synthesis, Antioxidant Activity and Light-Mediated Antibacterial Activity. **ChemMedChem**, v. 15, n. 10, p. 851–861, 19 maio 2020.

GE, J.-F. *et al.* The binding of resveratrol to monomer and fibril amyloid beta. **Neurochemistry International**, v. 61, n. 7, p. 1192–1201, dez. 2012.

GHOSH, M.; RAY, J. K. Ten years advancement in the synthetic applications of 2-bromo-cyclohexenecarbaldehydes and 2-bromobenzaldehydes and derived substrates under palladium-catalyzed cross-coupling conditions. **Tetrahedron**, v. 73, n. 27–28, p. 3731–3799, jul. 2017.

GODOY-REYES, T. M. *et al.* A Colorimetric Probe for the Selective Detection of Norepinephrine Based on a Double Molecular Recognition with Functionalized Gold Nanoparticles. **ACS Applied Nano Materials**, v. 2, n. 3, p. 1367–1373, 22 mar. 2019.

GÜLÇİN, İ. Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 210–218, jan. 2010.

JIANG, CHAO *et al.* Three flavanols delay starch digestion by inhibiting α -amylase and binding with starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 172, p. 503–514, 1 mar. 2021.

JUNG PARK, Y. *et al.* Thiazol-4(5H)-one analogs as potent tyrosinase inhibitors: Synthesis, tyrosinase inhibition, antimelanogenic effect, antioxidant activity, and in silico docking simulation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 98, p. 117578, jan. 2024.

KARAOĞLAN, G. K. Synthesis of new Schiff base and its Ni(II), Cu(II), Zn(II) and Co(II) complexes; photophysical, fluorescence quenching and thermal studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1256, p. 132534, maio 2022.

KAREEM, M. JUDA. *et al.* Synthesis, characterization, and determination antioxidant activities for new Schiff base complexes derived from 2-(1H-indol-3-yl)-ethylamine and metal ion complexes. **Journal of Molecular Structure**, v. 1231, p. 129669, maio 2021.

LEI, M. *et al.* Resveratrol inhibits proliferation, promotes differentiation and melanogenesis in HT-144 melanoma cells through inhibition of MEK/ERK kinase pathway. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p. 410–413, out. 2017.

LI, X. *et al.* **Applications of oxidases in modification of food molecules and colloidal systems: Laccase, peroxidase and tyrosinase** Trends in Food Science and Technology Elsevier Ltd, , 1 set. 2020.

LIPINSKI, C. A. *et al.* **Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development q settings** *Advanced Drug Delivery Reviews*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/drugdeliv>.

LIU, P. *et al.* Synthesis of heterocycles via ligand-free palladium catalyzed reductive Heck cyclization. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 13, p. 2307–2310, mar. 2007.

MA, X. *et al.* Lucigenin fluorescent assay of tyrosinase activity and its inhibitor screening. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 280, p. 41–45, fev. 2019.

MIN, X. *et al.* Investigation on the inhibition mechanism and binding behavior of paeonol to tyrosinase and its anti-browning property by multi-spectroscopic and molecular docking methods. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 253, 31 dez. 2023.

MITTAL, A.; SINGH, A.; BENJAKUL, S. α -amylase inhibitory activity of chitooligosaccharide from shrimp shell chitosan and its epigallocatechin gallate conjugate: kinetics, fluorescence quenching and structure–activity relationship. **Food Chemistry**, v. 403, 1 mar. 2023.

MUÑOZ-ESPARZA, N. C. *et al.* **Polyamines in food** *Frontiers in Nutrition* *Frontiers Media S.A.*, , 11 jul. 2019.

NASCIMENTO, L. F. DO; SANTOS, E. P. DOS; AGUIAR, A. P. DE. Organic sunscreens. Research, innovation and the organic synthesis importance. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 2, p. 190–223, 2014.

OCHS, R. S. Understanding Enzyme Inhibition. **Journal of Chemical Education** , v. 77, p. 1453–1456, nov. 2000.

PARK, J. *et al.* D-tyrosine negatively regulates melanin synthesis by competitively inhibiting tyrosinase activity. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 31, n. 3, p. 374–383, 1 maio 2018.

POLONINI, H. C. *et al.* Photoprotective activity of resveratrol analogues. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 4, p. 964–968, 15 fev. 2013.

POTTS, R. O.; GUY, R. H. Predicting skin permeability. **Pharmaceutical Research** , v. 9, p. 663–669, 1992.

REIS, J. S. *et al.* Synthesis, antioxidant and photoprotection activities of hybrid derivatives useful to prevent skin cancer. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 9, p. 2733–2738, maio 2014.

SHAH, MD. S. *et al.* Synthesis, antimicrobial and antioxidant evaluation with in silico studies of new thiazole Schiff base derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 1248, p. 131465, jan. 2022.

SILVA, C. M. DA *et al.* Studies on free radical scavenging, cancer cell antiproliferation, and calf thymus DNA interaction of Schiff bases. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 172, p. 129–138, 1 jul. 2017.

SONG, X. *et al.* Inhibitory mechanism of epicatechin gallate on tyrosinase: inhibitory interaction, conformational change and computational simulation. **Food & Function**, v. 11, n. 6, p. 4892–4902, 2020.

TANG, J.; LIU, J.; WU, F. Molecular docking studies and biological evaluation of 1,3,4-thiadiazole derivatives bearing Schiff base moieties as tyrosinase inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 69, p. 29–36, 1 dez. 2016.

VEBER, D. F. *et al.* Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 6 jun. 2002.

WALLE, T. *et al.* HIGH ABSORPTION BUT VERY LOW BIOAVAILABILITY OF ORAL RESVERATROL IN HUMANS. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, n. 12, p. 1377–1382, dez. 2004.

XU, Z. *et al.* Anti-melanin and tyrosinase inhibition mechanism of polydatin and 6''-O-lauryl polydatin synthesized by microwave-assisted enzymatic catalysis. **Food Bioscience**, p. 103605, jan. 2024.

YEHYE, W. A. *et al.* Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 295–312, ago. 2015.

14. Conclusão Geral

O presente trabalho possibilitou avaliar as atividades biológicas de três classes de compostos, as aminoguanidinas hidrazonas, as bases de *Schiff* derivadas de tiossemicarbazonas e híbridas com pirazóis e as bases de *Schiff* análogas ao resveratrol e suas respectivas aminas. De um modo geral, os compostos apresentaram atividades antioxidantes frente a diferentes métodos, que puderam ser correlacionados com outras atividades biológicas.

Para a classe das aminoguanidinas hidrazonas o composto **AGH-3** com o núcleo indólico foi o mais promissor, apresentando atividade antioxidante frente a todos os métodos avaliados, em alguns deles superior ao padrão Trolox[®]. O composto também foi o mais efetivo frente às linhagens celulares tumorais avaliadas. O mecanismo de ação do derivado **AGH-3** possivelmente está relacionado à interação ao DNA, a qual ocorreu via formação de um complexo supramolecular fluorescente, preferencialmente por intercalação. Assim, pode-se sugerir que a presença do grupo indólico, associado a grupos aminoguanidínicos pode aumentar a atividade antioxidante, a afinidade de ligação ao DNA e a atividade anticâncer de novos compostos.

No estudo com as bases de *Schiff* derivadas de tiossemicarbazonas e híbridas com pirazóis foi avaliado o potencial de inibição de urease por oito compostos dessa classe. O composto mais ativo, **312**, demonstrou inibição mista e alta afinidade pela enzima. Análises de UV-vis mostraram a formação de um complexo estabilizado preferencialmente por interações hidrofóbicas. Estudos de *docking* molecular indicaram interações com resíduos próximos ao sítio ativo, inclusive com um cofator que corroboraram com os estudos experimentais. Em ensaios de solo, o composto **312** superou o padrão NBPT na inibição da urease em duas amostras de solo. Na inibição de enzimas ureolíticas em amostras de urina, o **312** superou todos os padrões avaliados. Os resultados destacam o potencial desses compostos em aplicações biotecnológicas, indicando caminhos para o desenvolvimento de moléculas mais potentes na inibição de ureases em diferentes contextos biotecnológicos.

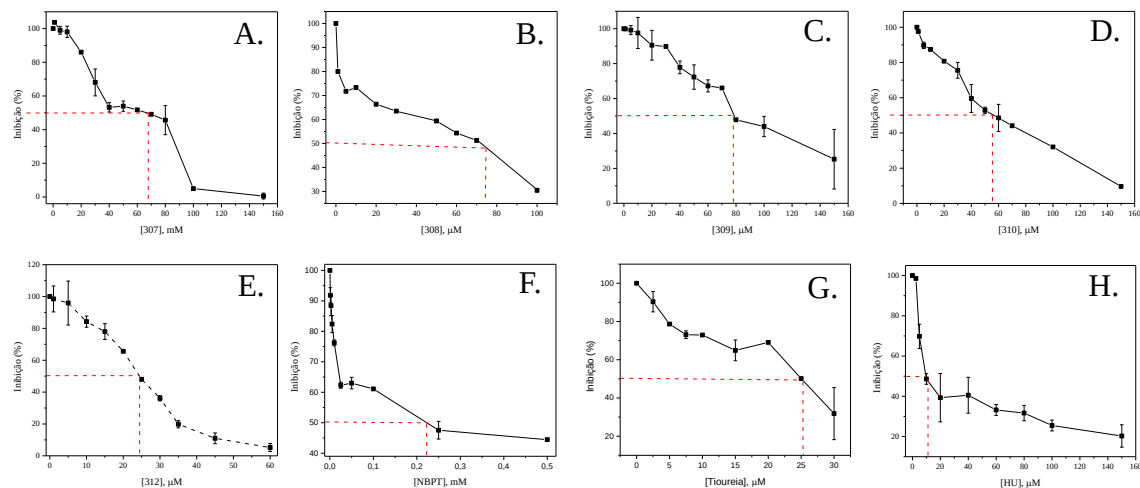
Por fim, as bases de *Schiff*, as aminas e os híbridos com o ácido lipoico análogas aos resveratrol, de um modo geral, as iminas apresentaram os maiores percentuais de inibição da tirosinase, a maior atividade FPS-UVB, bem como, apresentaram promissoras atividades antioxidantes frente aos métodos avaliados. Adicionalmente, os estudos *in silico* demonstraram que os compostos apresentam propriedades físico-químicas de passíveis de serem exploradas em possíveis candidatos a fármacos, assim como os

estudos de ancoragem molecular demonstraram que os compostos interagem com resíduos de aminoácidos principalmente via ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

Com isso, ressalta-se a versatilidade dos compostos aqui avaliados, bem como, a possibilidade de esses agirem frente a multialvos. Nessa linha, espera-se que o desenvolvimento dessa pesquisa não apenas amplie nosso entendimento sobre as classes de compostos aqui avaliados, mas também possa ser um catalisador para o desenvolvimento de tecnologias benéficas à sociedade como um todo.

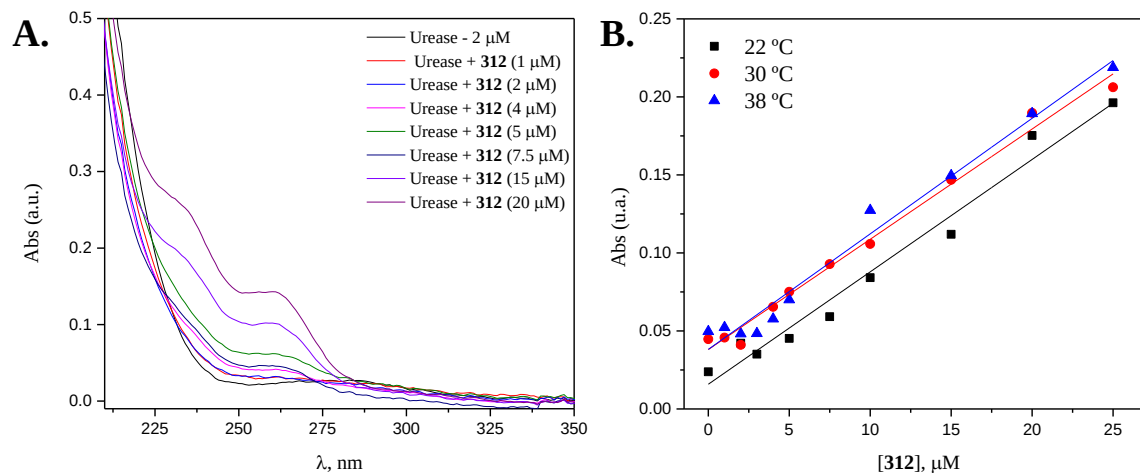
Anexos – Seção 4

Figura 25. Estrutura gráfica utilizada para calcular o IC_{50} dos inibidores padrões e dos compostos avaliados no trabalho. **A.** Gráfico para expressar o IC_{50} do composto **307**. **B.** Gráfico para expressar o IC_{50} do composto **308**. **C.** Gráfico para expressar o IC_{50} do composto **309**. **D.** Gráfico para expressar o IC_{50} do composto **310**. **E.** Gráfico para expressar o IC_{50} do composto **312**. **F.** Gráfico para expressar o IC_{50} do composto NBPT. **G.** Gráfico para expressar o IC_{50} do composto TIO. **H.** Gráfico para expressar o IC_{50} do composto HU. Condições: Tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, 30 °C.



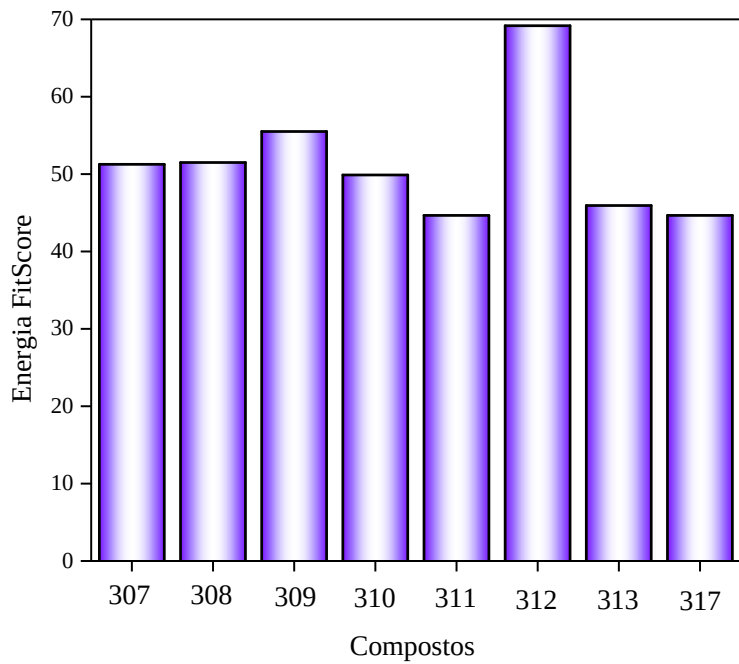
Fonte: Autor, 2024.

Figura 26. Figura x. Titulação espectrofotométrica da urease com o **312** (1 – 25 mM) em três temperaturas distintas (22, 30 e 38 °C). Condições: tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,4.



Fonte: Autor, 2024.

Figura 27. Energia fitScore do processo de interação entre as bases de Schiff (307 – 313 e 317) com a urease Jeak bean (PDB ID:4GOA).



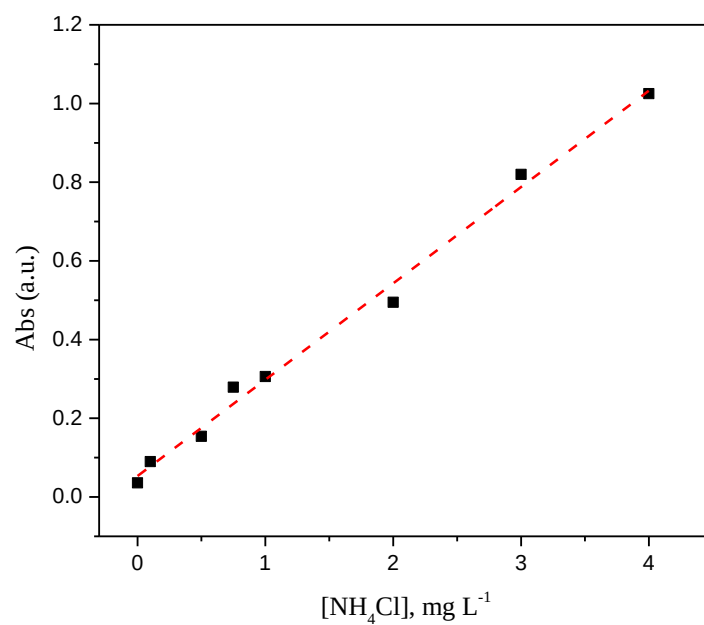
Fonte: Autor, 2024.

Tabela 18. Características físico-químicas para as amostras de solos S1, S2, S3, S4.

Parâmetros	Solos			
	S1	S2	S3	S4
Matéria orgânica (%)	14	14	12	5
pH	5.87	6.03	6.10	6.43
H + Al (mmol L ⁻¹)	38	38	34	12
Saturação de base (%)	18	21	72	74
K (mmol L ⁻¹)	3	3	15	5
Ca (mmol L ⁻¹)	60	63	50	27
Mg (mmol L ⁻¹)	10	12	19	6
P (mmol L ⁻¹)	3	4	4	1

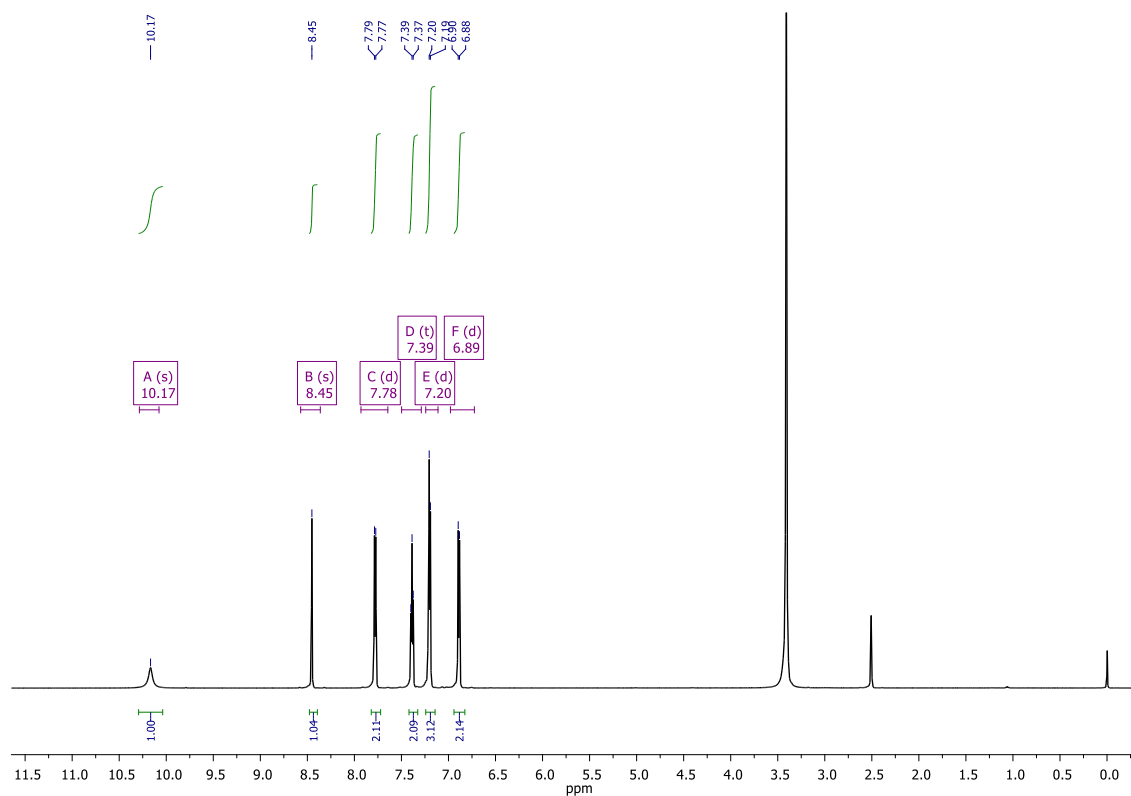
Fonte: Tavares et al., 2023.

Figura 28. Curva padrão de cloreto de amônio. Condições: Tampão tris 20 mM, pH 7,4, 30 °C.



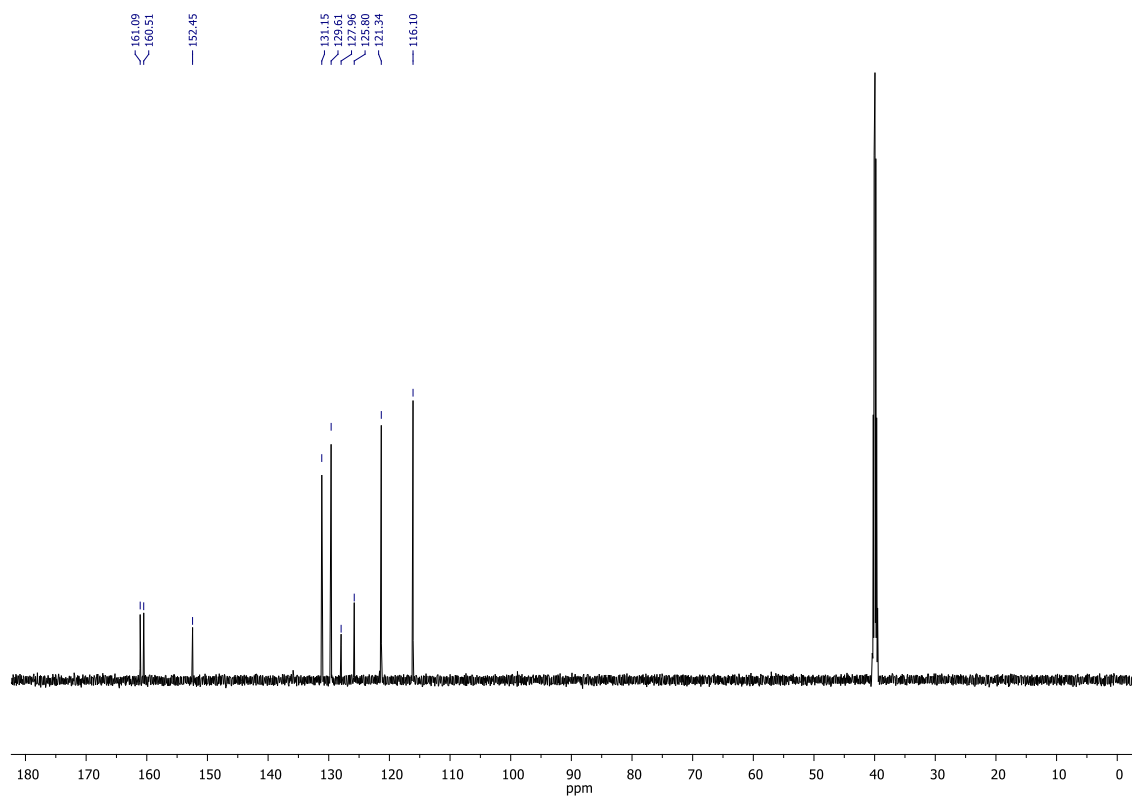
Fonte: Autor, 2024.

Figura 29. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz; $\text{DMSO}-d_6$) do composto **1**.



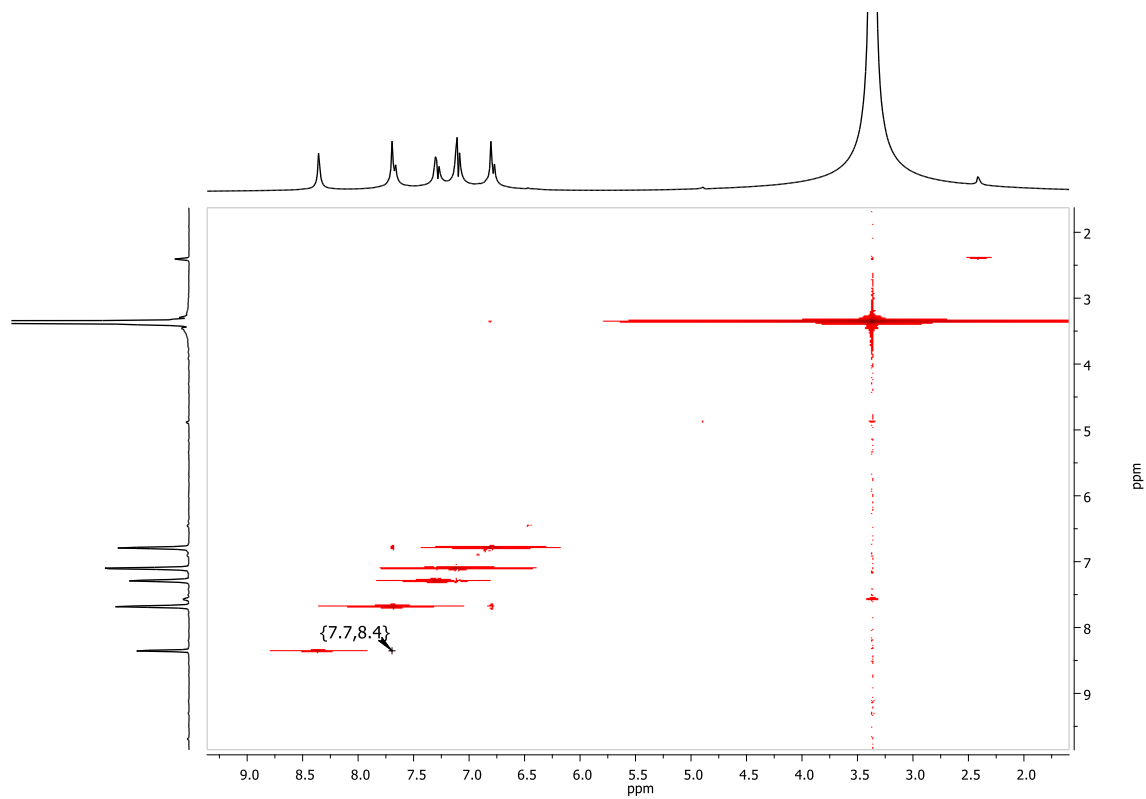
Fonte: Autor, 2024.

Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz – DMSO- d_6) do composto **1**.



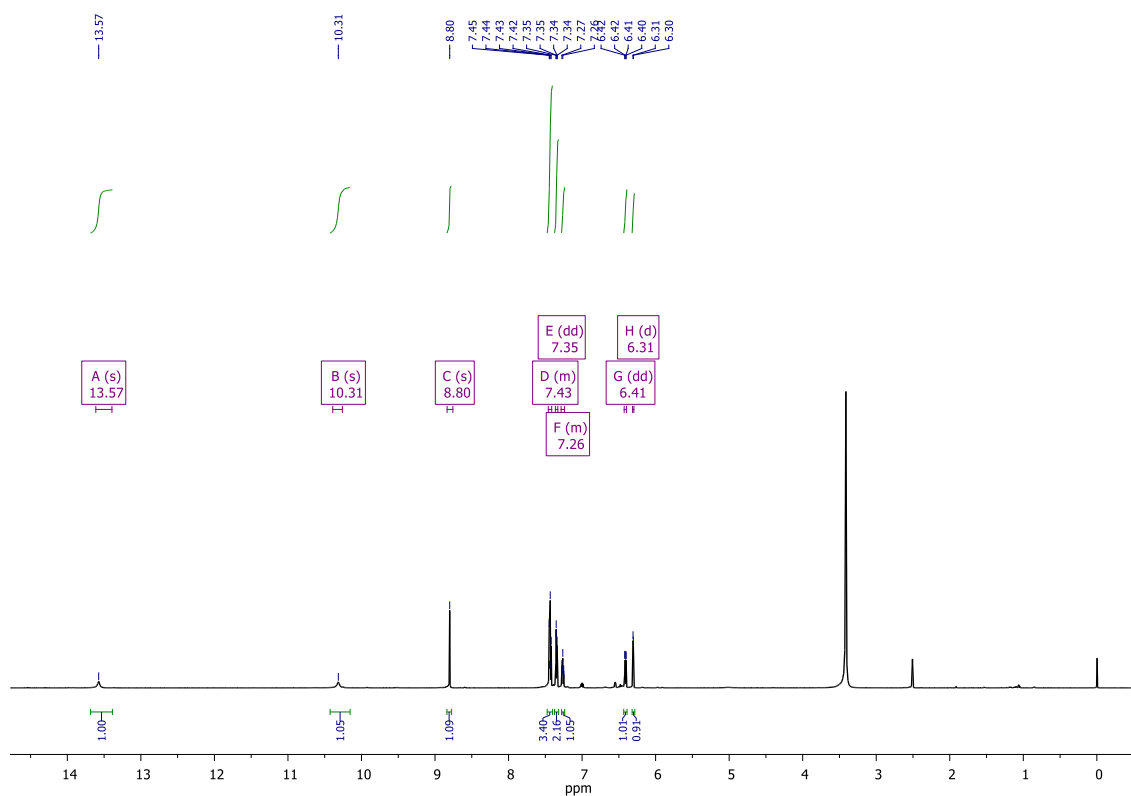
Fonte: Autor, 2024.

Figura 31. Espectro de Noesy (600 MHz – DMSO- d_6) do composto **1**.



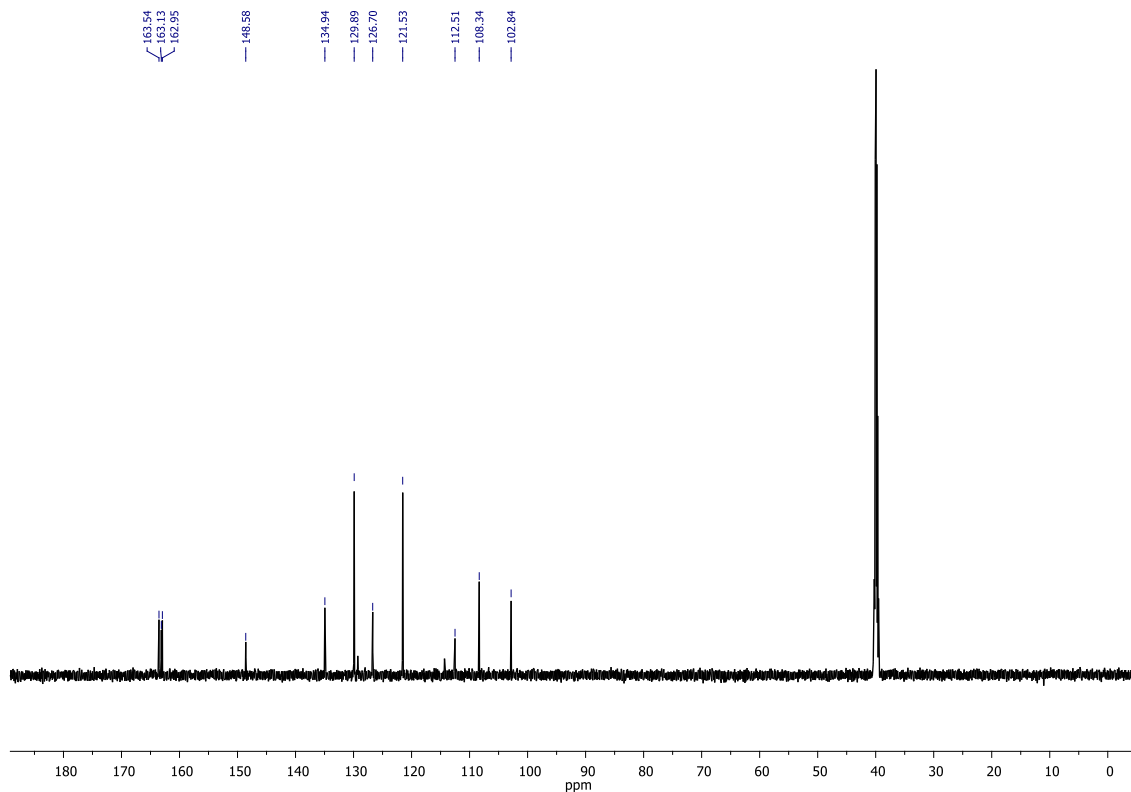
Fonte: Autor, 2024.

Figura 32. Espectro de RMN ^1H (150 MHz – DMSO- d_6) do composto 2.



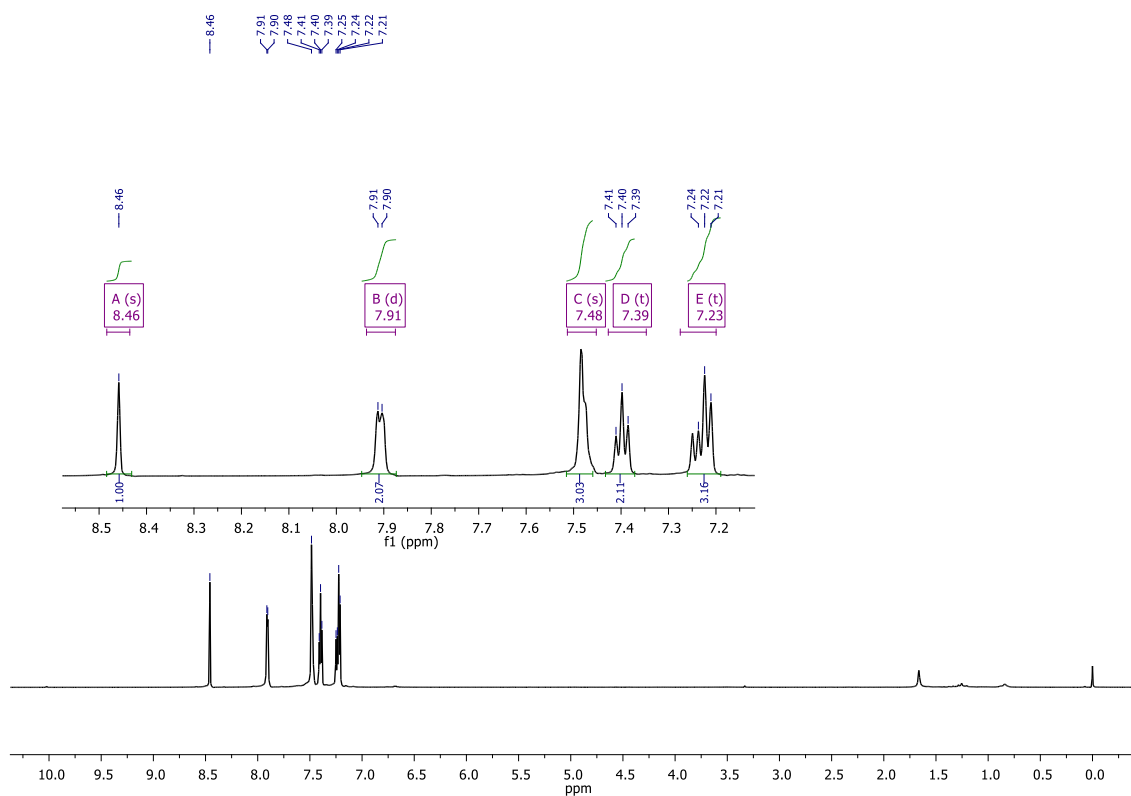
Fonte: Autor, 2024.

Figura 33. Espectro de RMN ^{13}C (600 MHz – DMSO- d_6) do composto 2.



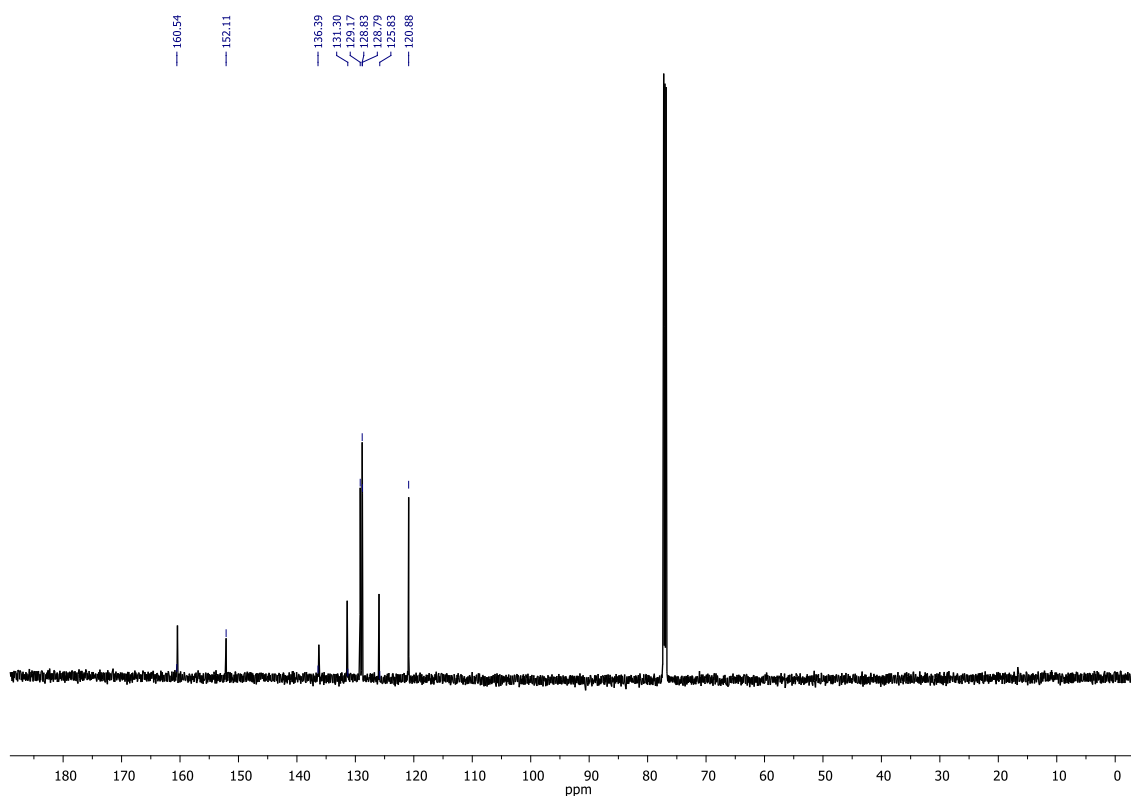
Fonte: Autor, 2024.

Figura 34. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – CDCl_3) do composto **3**.



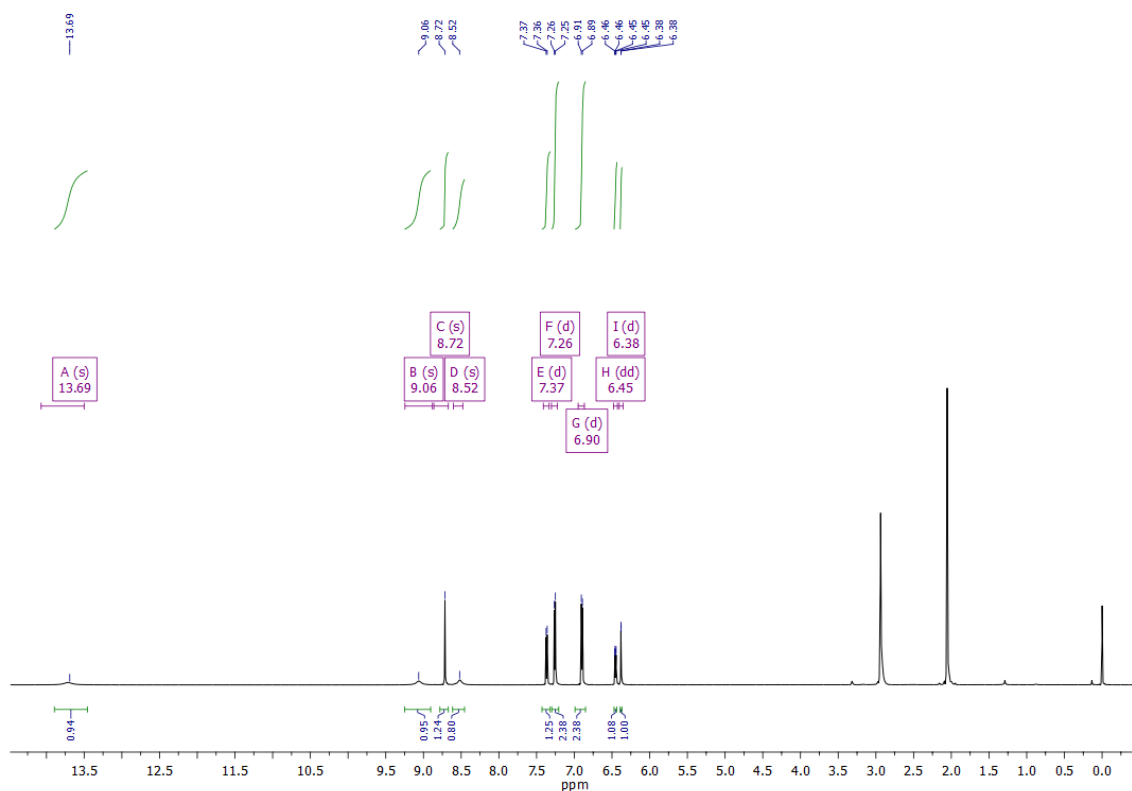
Fonte: Autor, 2024.

Figura 35. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – CDCl_3) do composto **3**.



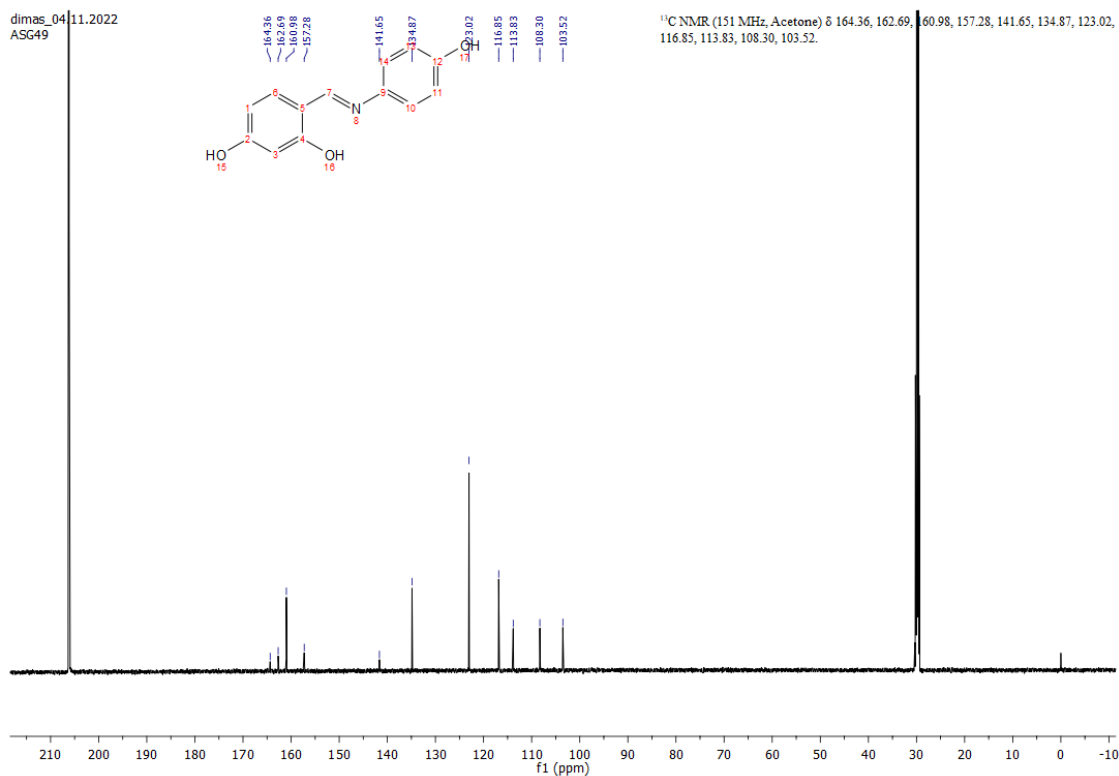
Fonte: Autor, 2024.

Figura 36. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – Acetona- d_6) do composto **4**.



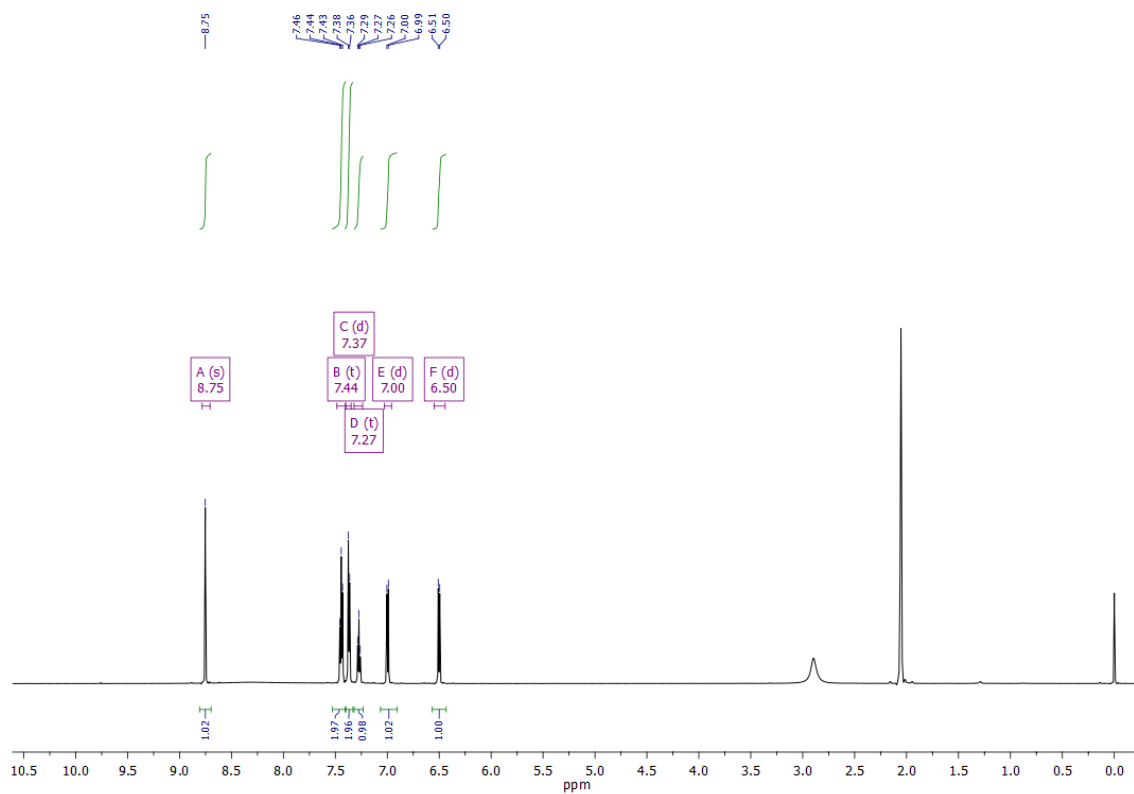
Fonte: Autor, 2024.

Figura 37. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – Acetona- d_6) do composto **4**.



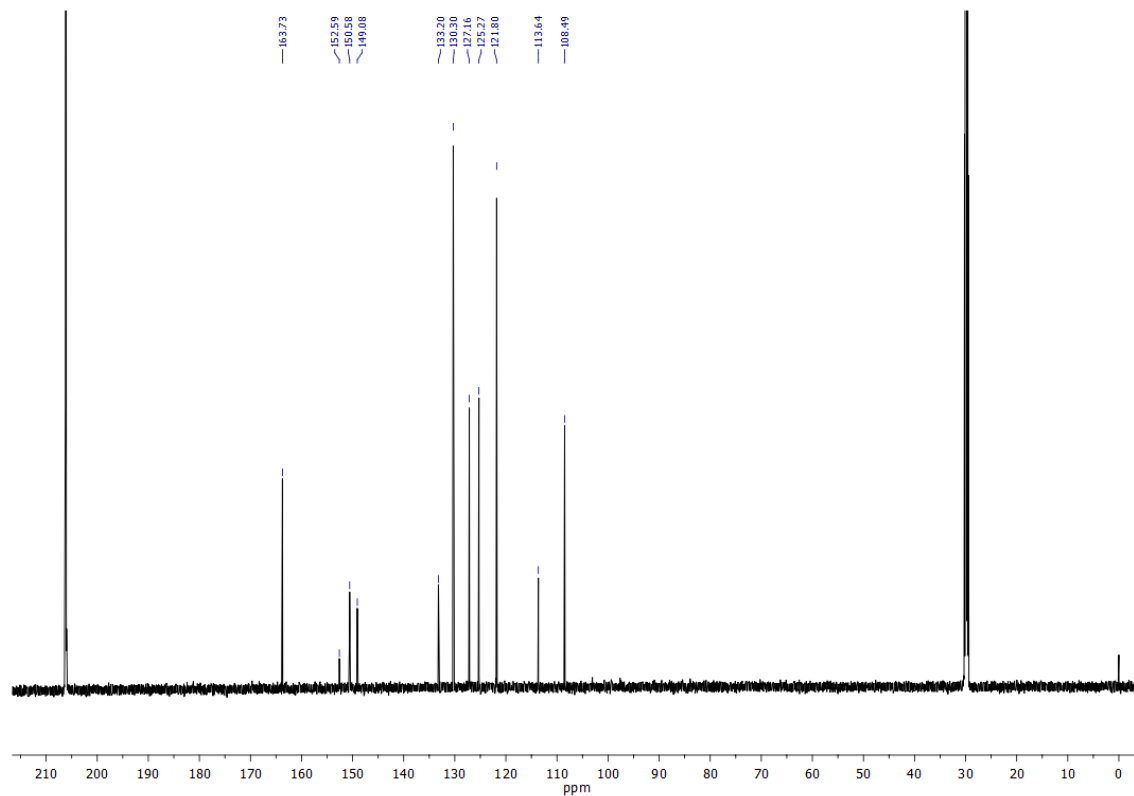
Fonte: Autor, 2024.

Figura 38. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – Acetona- d_6) do composto 5.



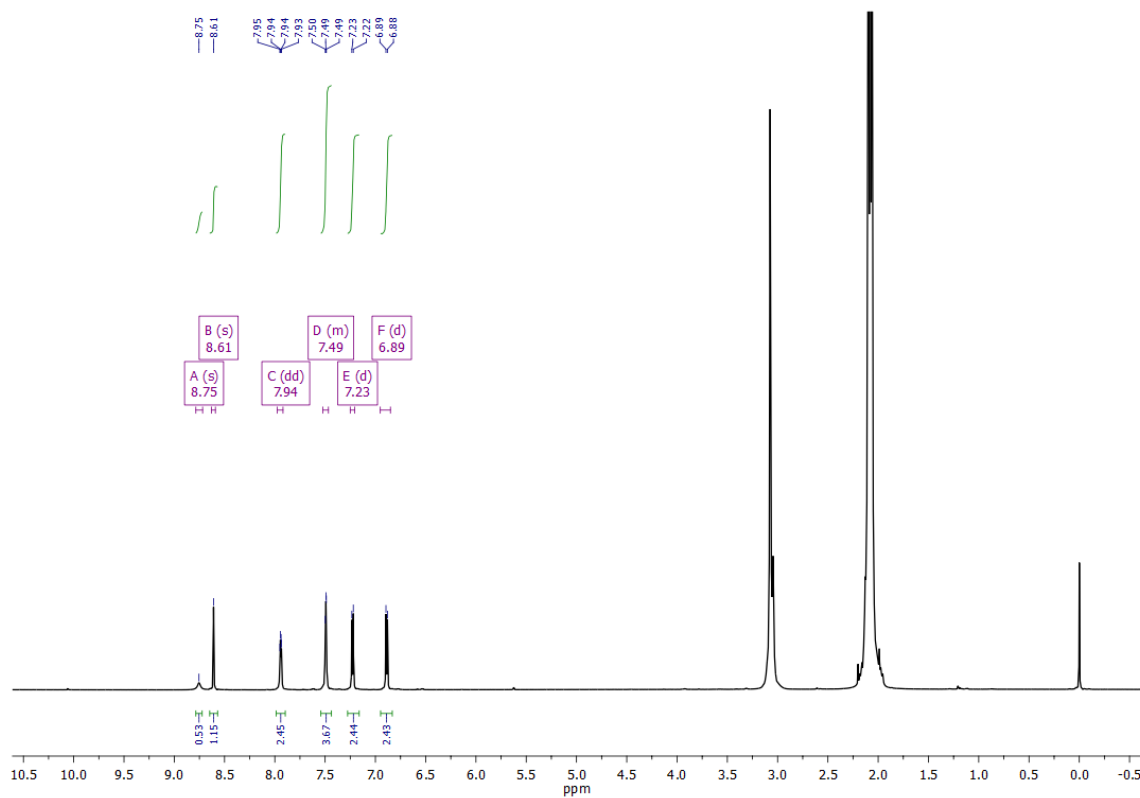
Fonte: Autor, 2024.

Figura 39. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – Acetona- d_6) do composto 5.



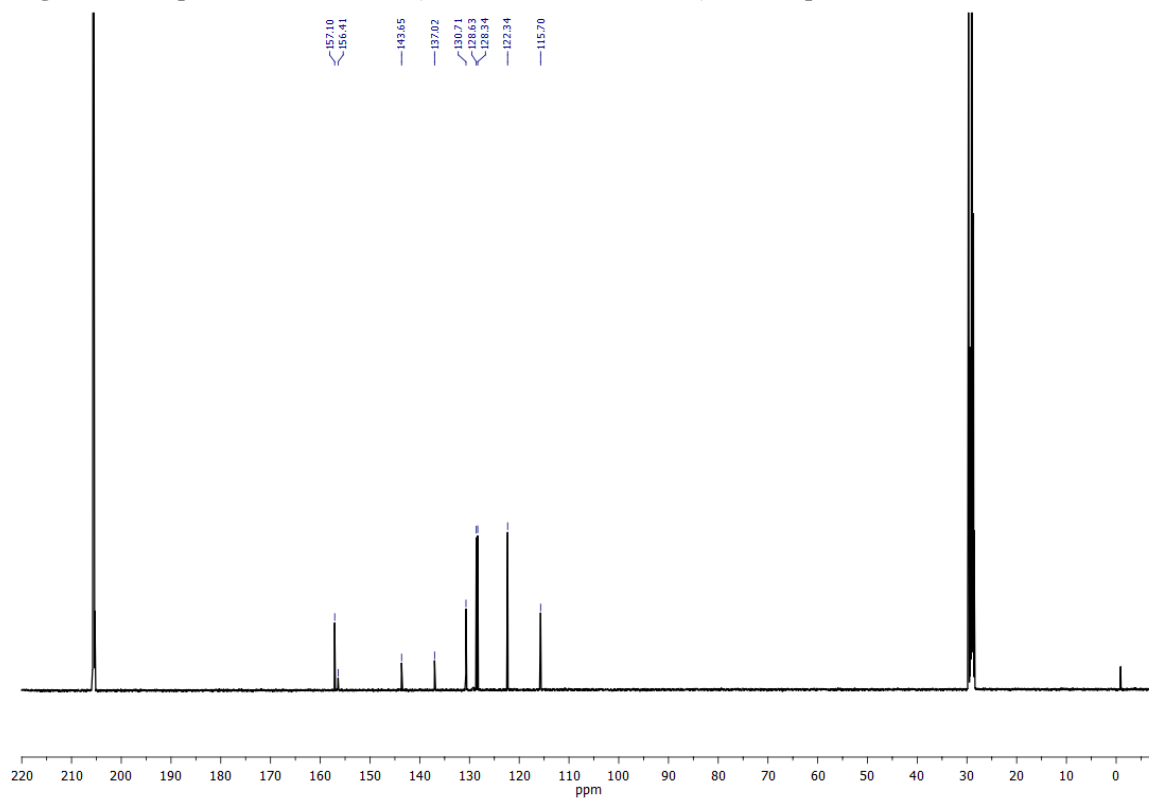
Fonte: Autor, 2024.

Figura 40. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – Acetona- d_6) do composto **6**.



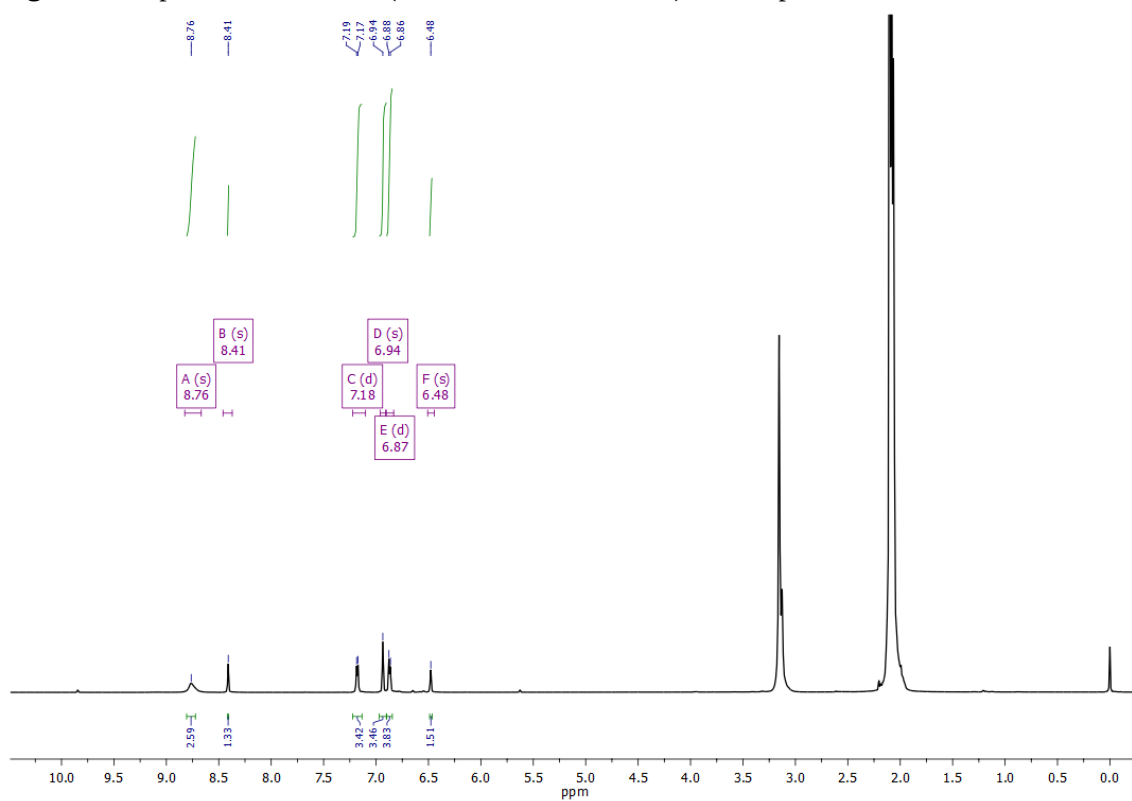
Fonte: Autor, 2024.

Figura 41. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – Acetona- d_6) do composto **6**.



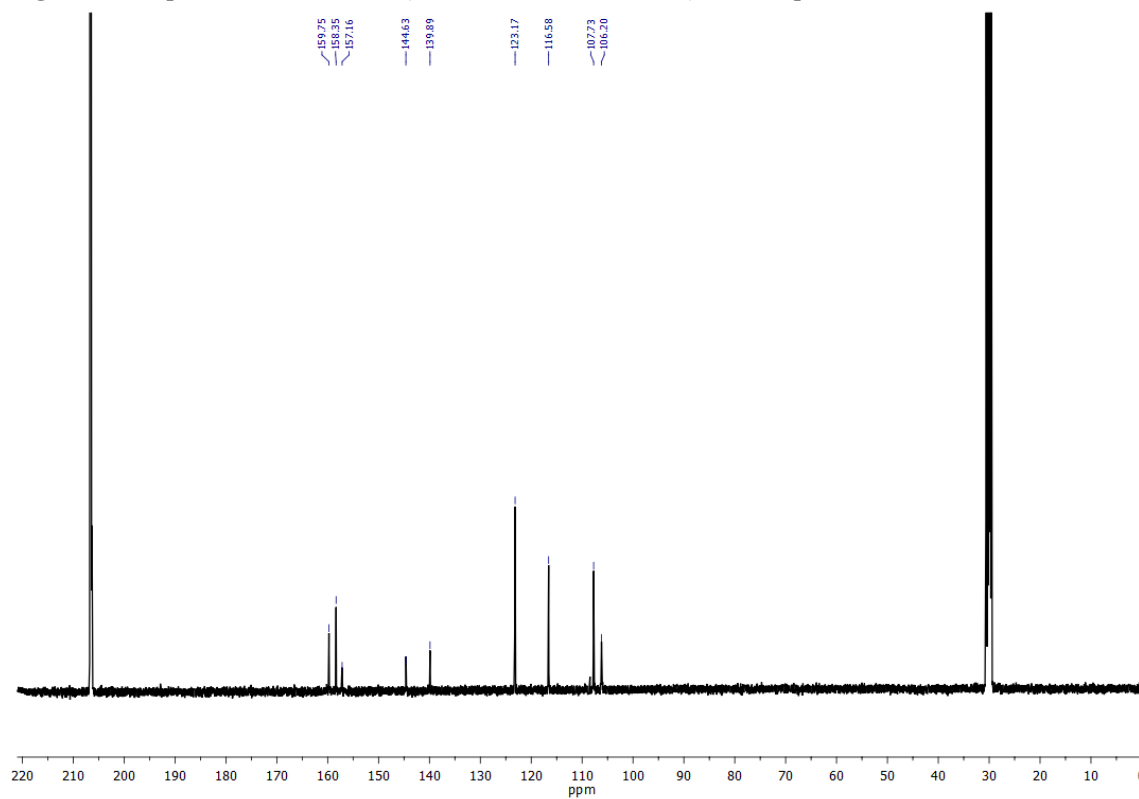
Fonte: Autor, 2024.

Figura 42.Espectro de RMN ^1H (600 MHz – Acetona- d_6) do composto 7.



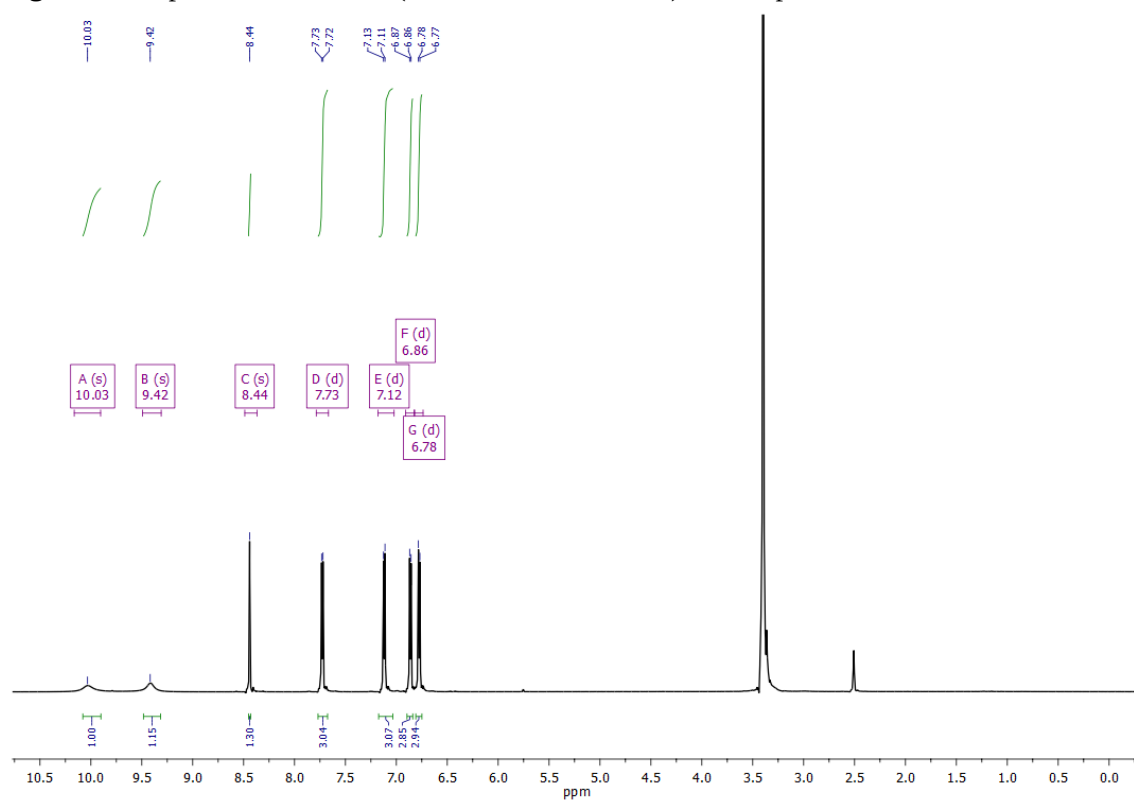
Fonte: Autor, 2024.

Figura 43.Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – Acetona- d_6) do composto 7.



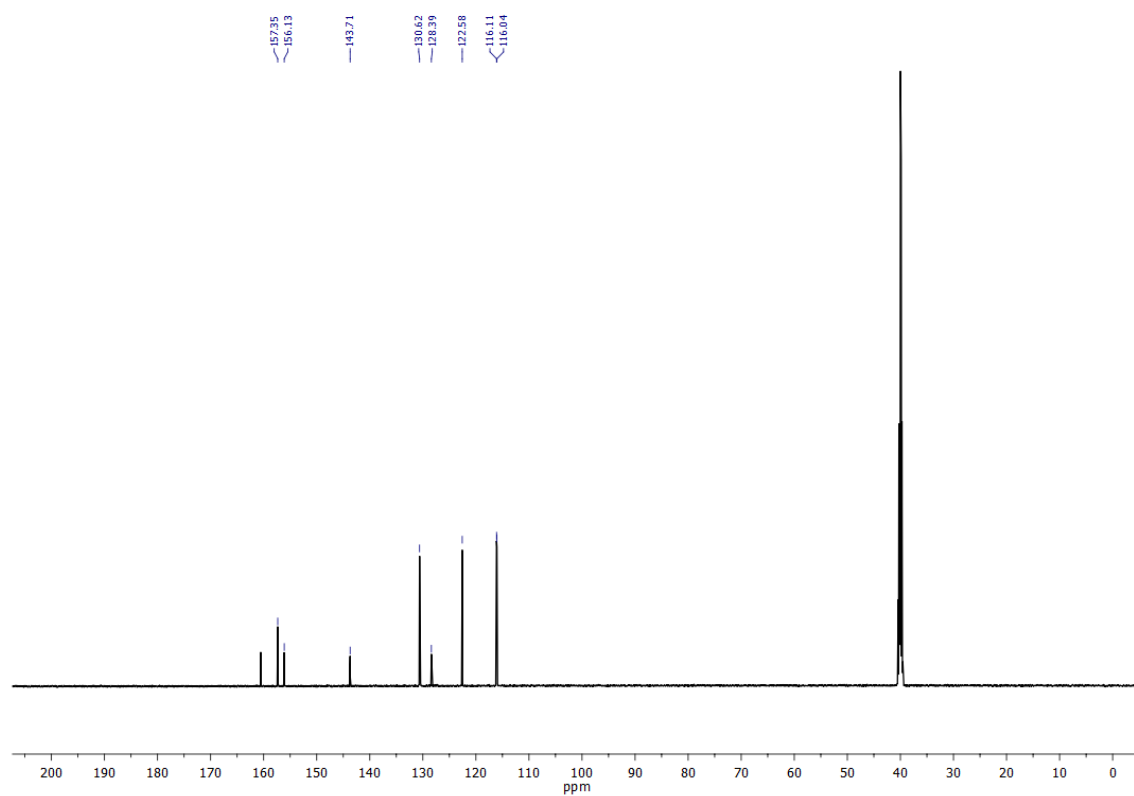
Fonte: Autor, 2024.

Figura 44. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – DMSO- d_6) do composto **8**.



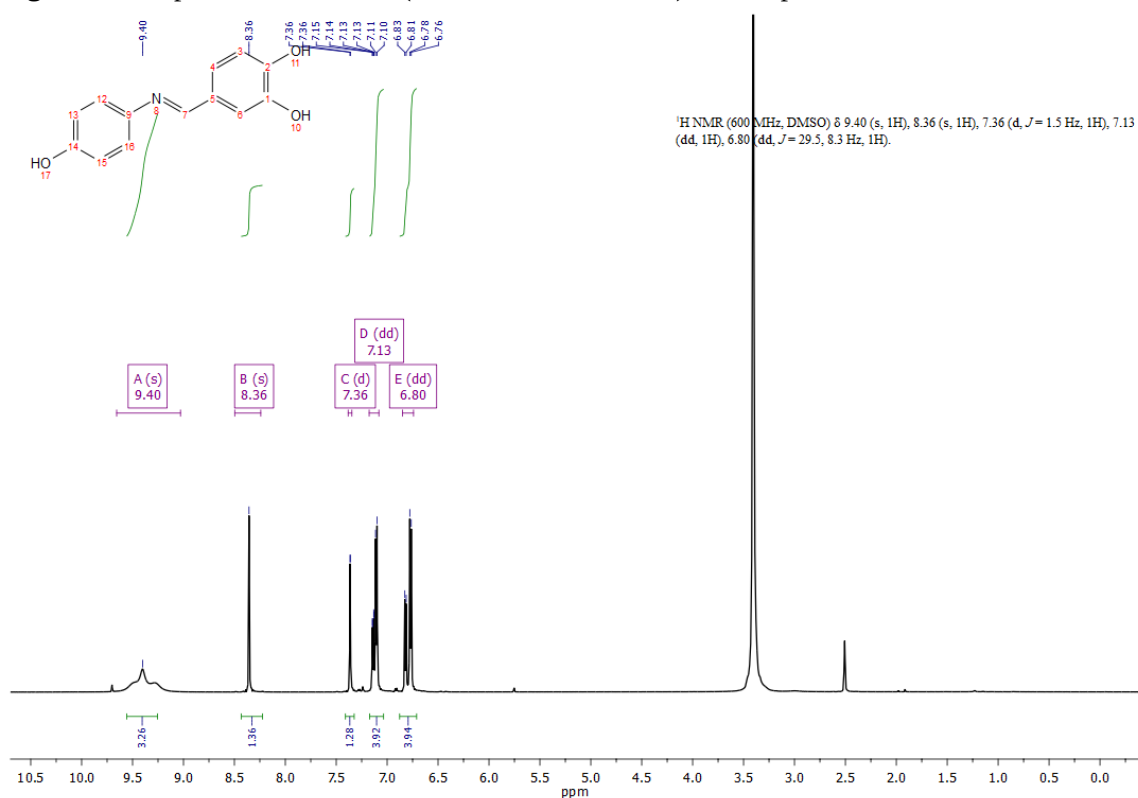
Fonte: Autor, 2024.

Figura 45. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – DMSO- d_6) do composto **8**.



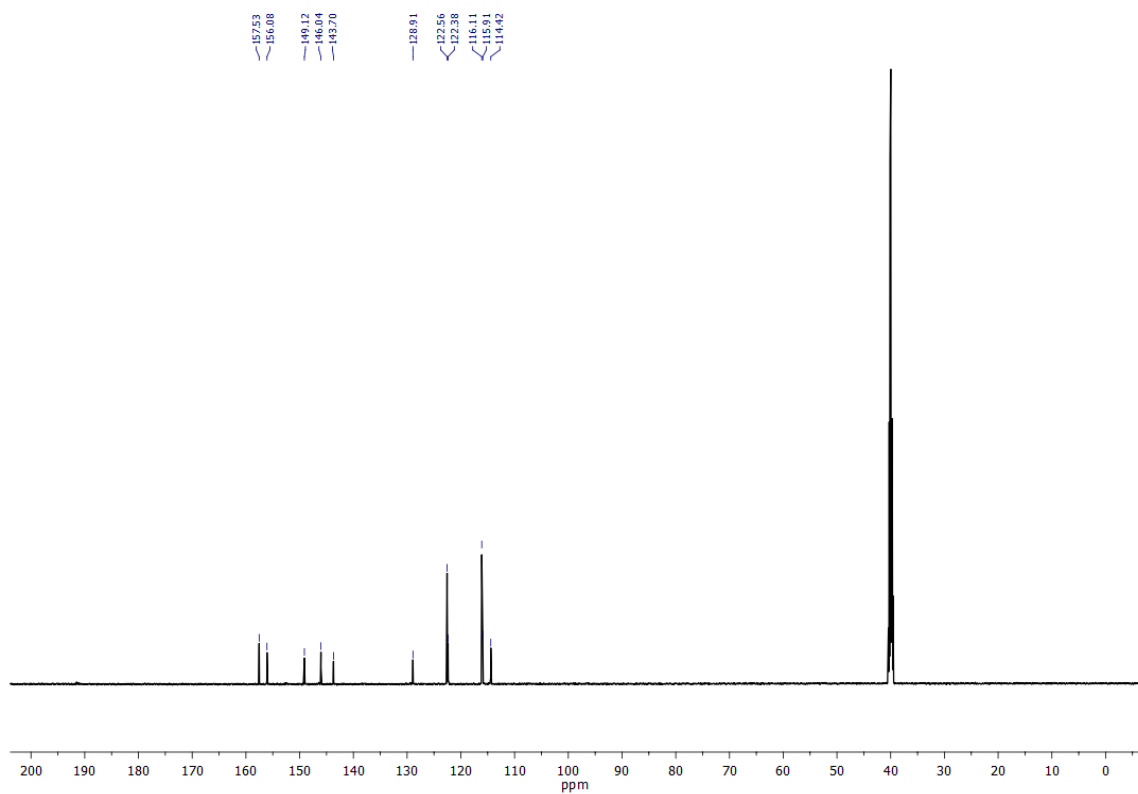
Fonte: Autor, 2024.

Figura 46.. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – DMSO- d_6) do composto **9**.



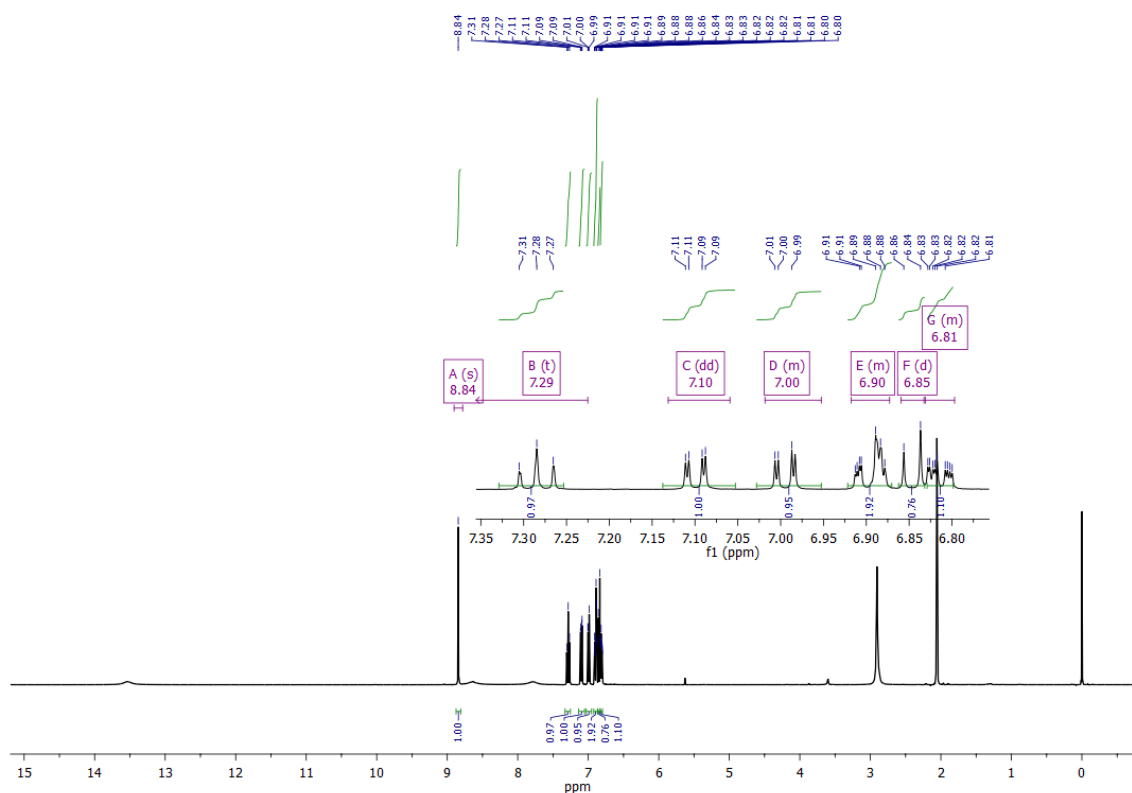
Fonte: Autor, 2024.

Figura 47. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – DMSO- d_6) do composto **9**.



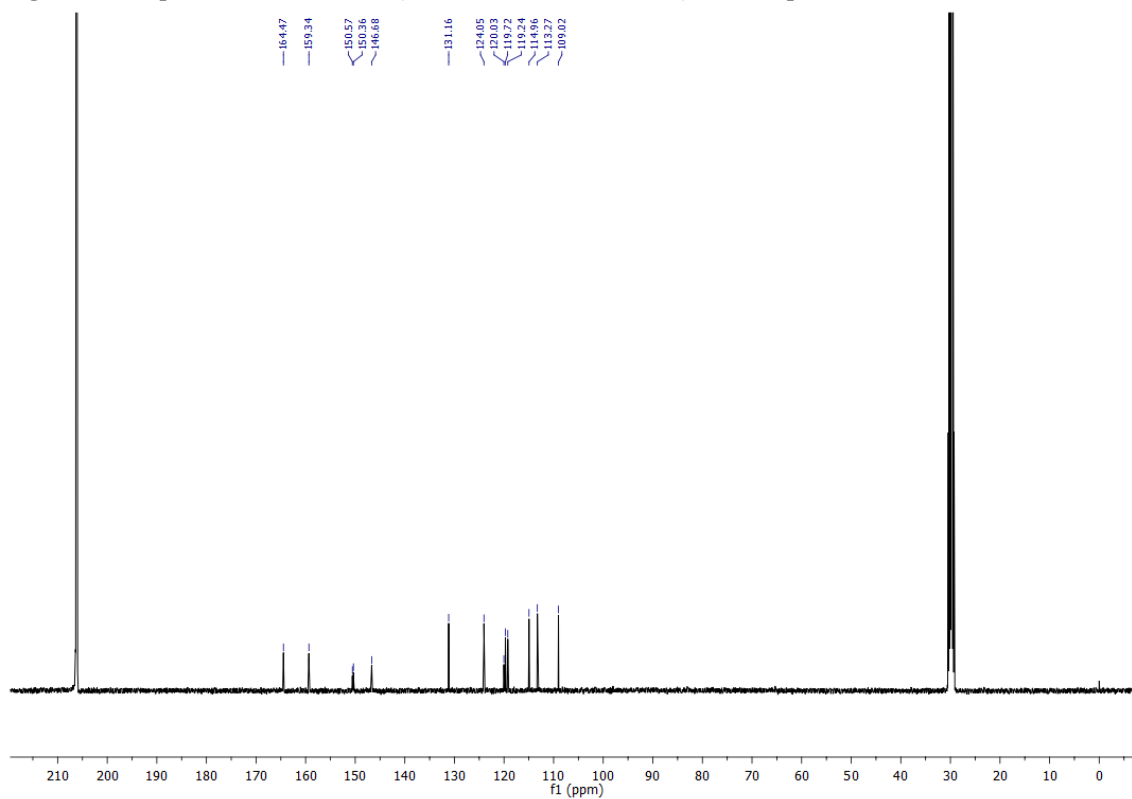
Fonte: Autor, 2024.

Figura 48.Espectro de RMN ^1H (400 MHz – Acetona- d_6) do composto **10**.



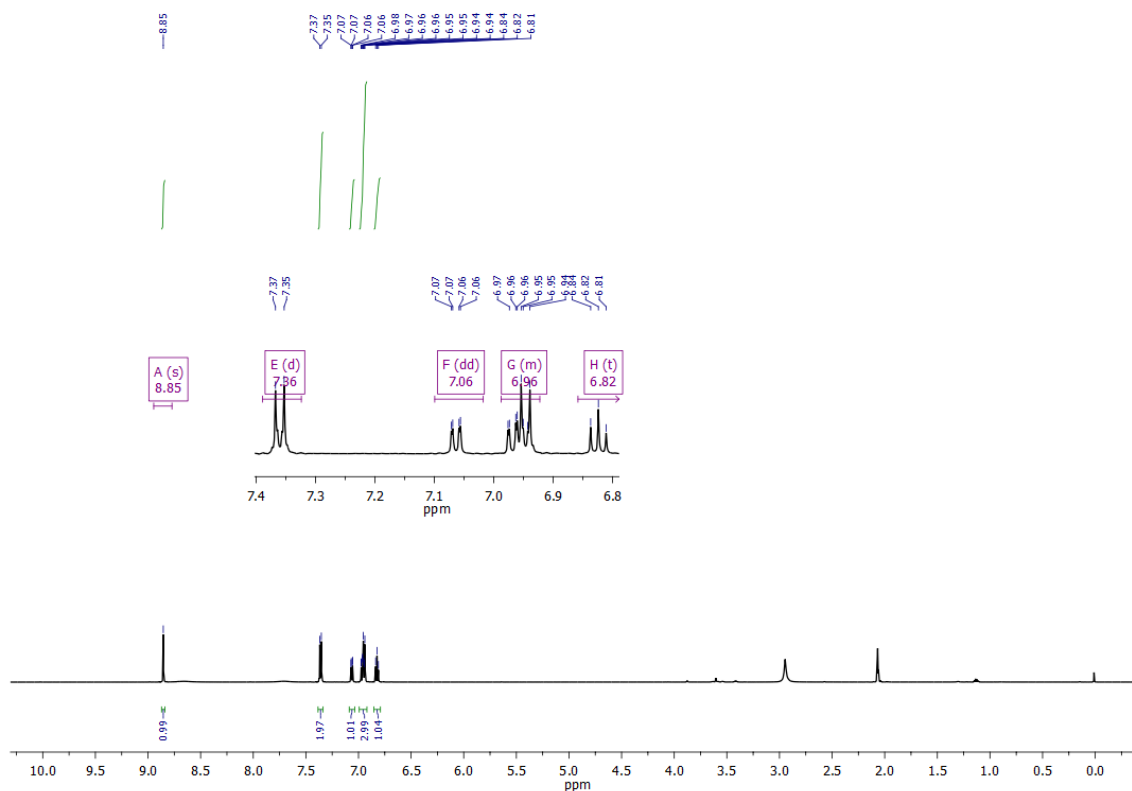
Fonte: Autor, 2024.

Figura 49.Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz – Acetona- d_6) do composto **10**.



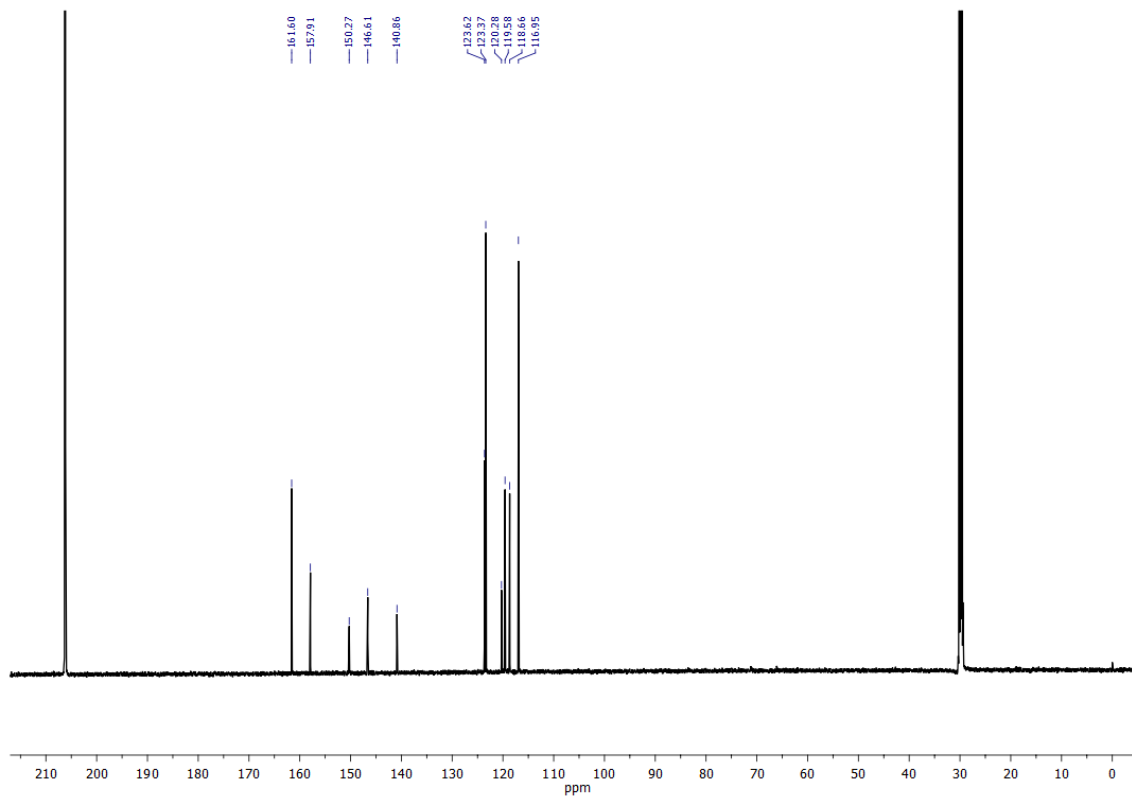
Fonte: Autor, 2024.

Figura 50.Espectro de RMN ^1H (600 MHz – Acetona- d_6) do composto **11**.



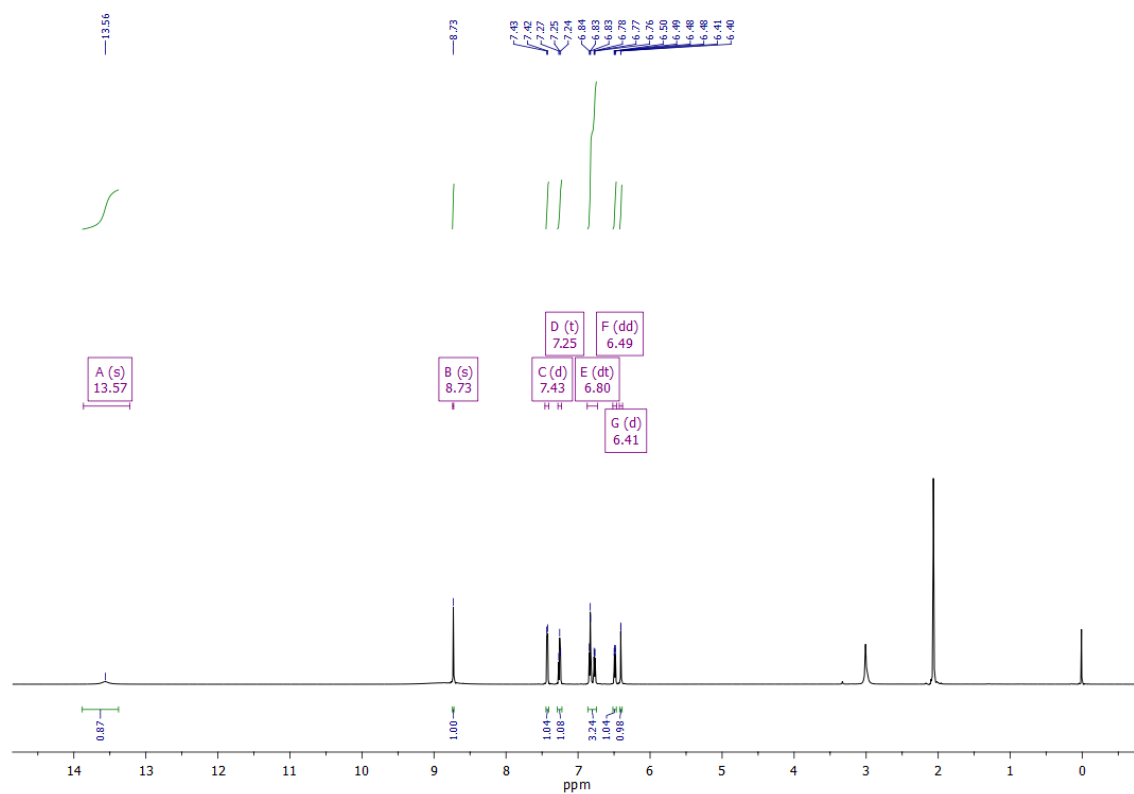
Fonte: Autor, 2024.

Figura 51.Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – Acetona- d_6) do composto **11**.



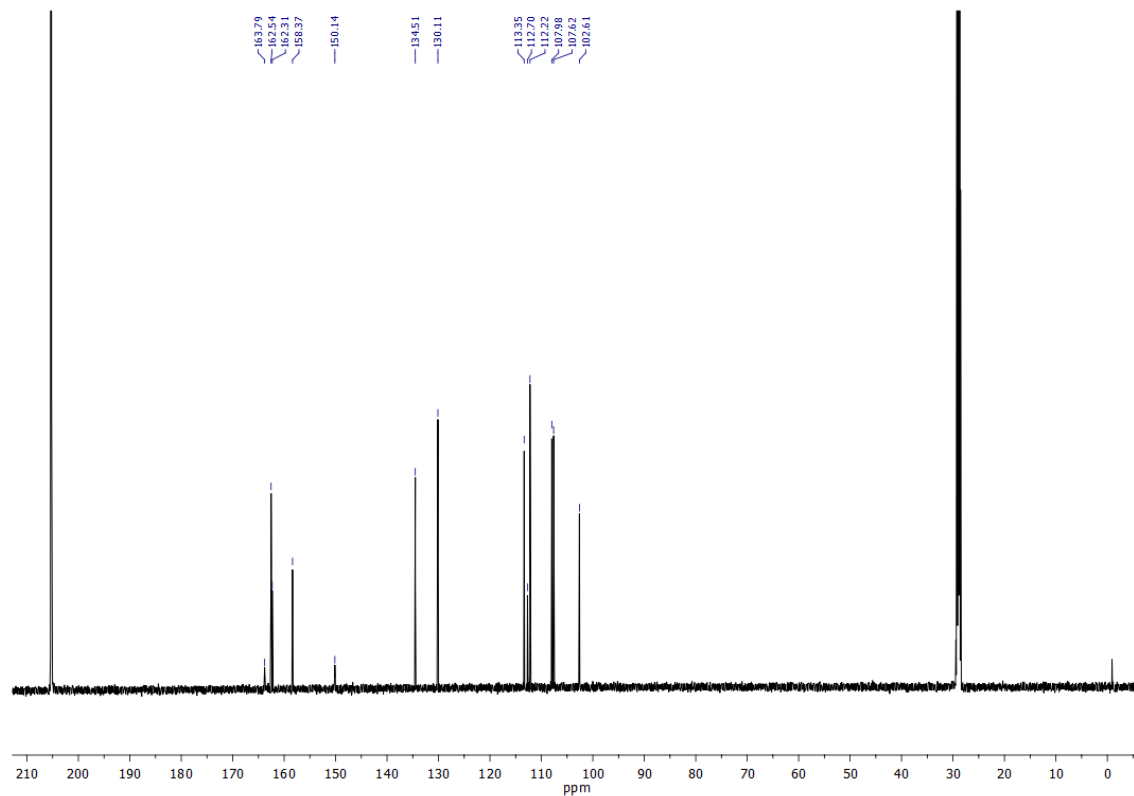
Fonte: Autor, 2024.

Figura 52.Espectro de RMN ^1H (600 MHz – Acetona- d_6) do composto **12**.



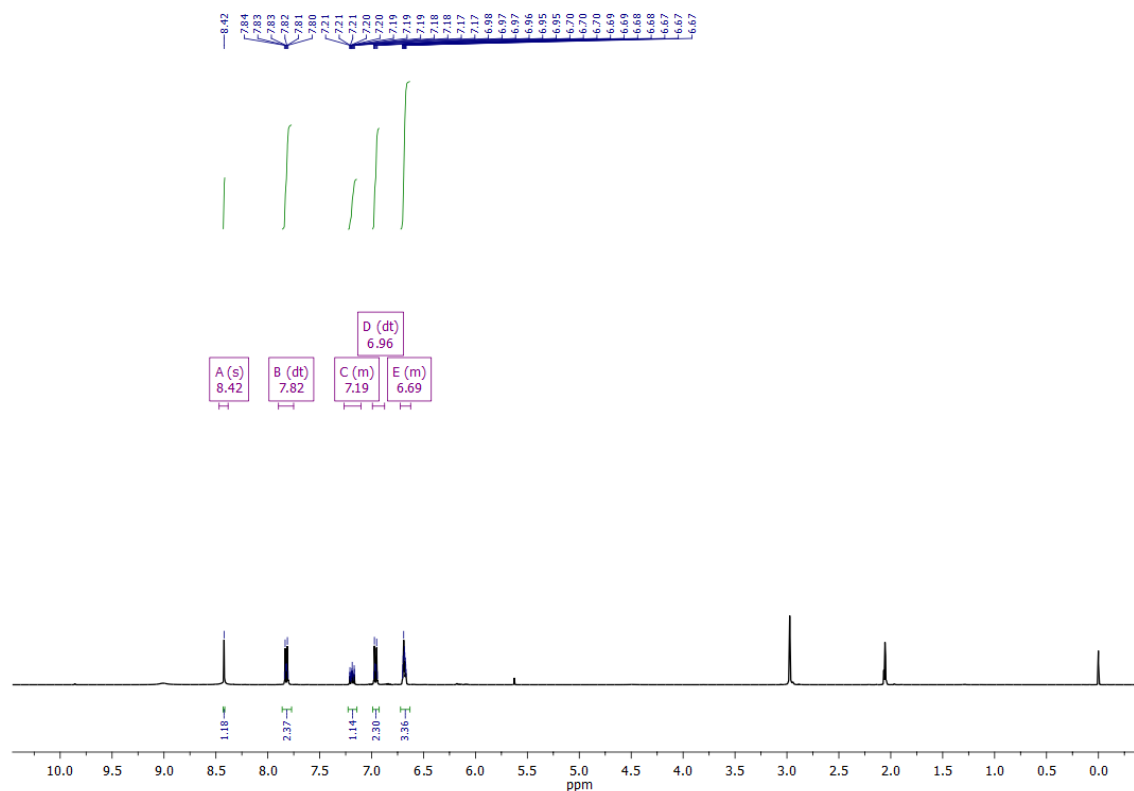
Fonte: Autor, 2024.

Figura 53.Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – Acetona- d_6) do composto **12**.



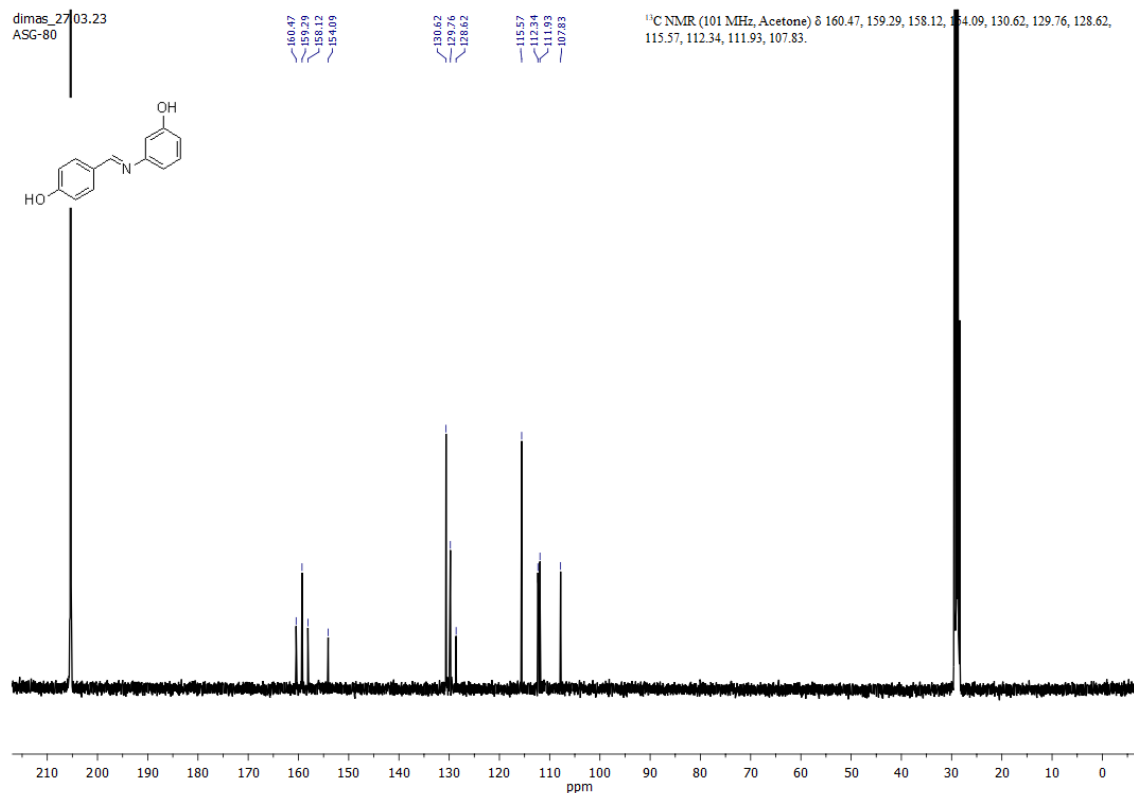
Fonte: Autor, 2024.

Figura 54.Espectro de RMN ^1H (400 MHz – Acetona- d_6) do composto **13**.



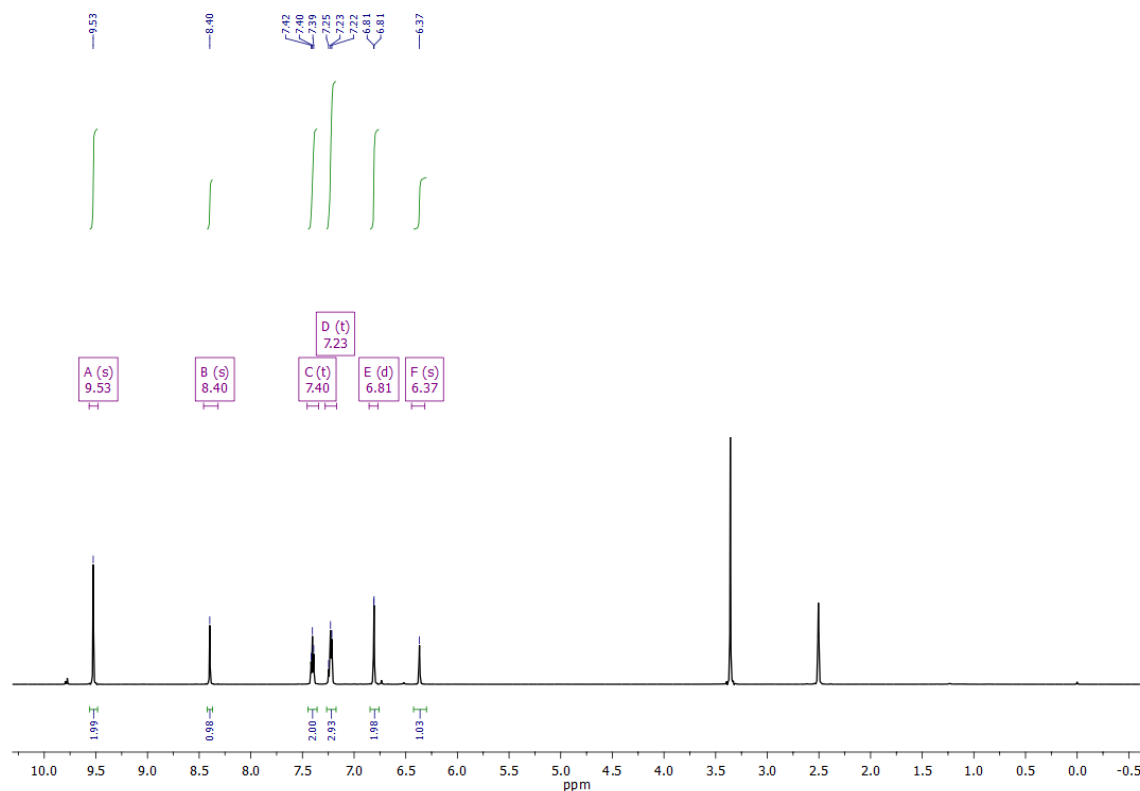
Fonte: Autor, 2024.

Figura 55.Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz – Acetona- d_6) do composto **13**.



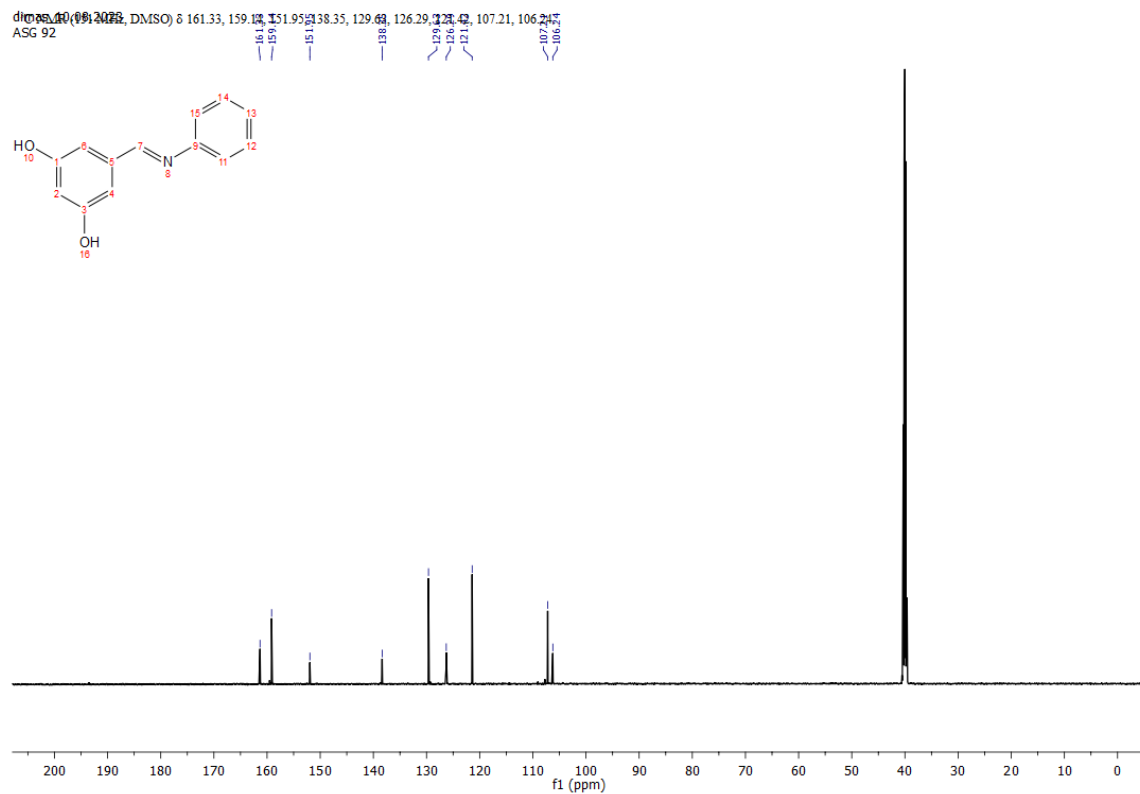
Fonte: Autor, 2024.

Figura 56.Espectro de RMN ^1H (600 MHz – DMSO-d6) do composto **14**.



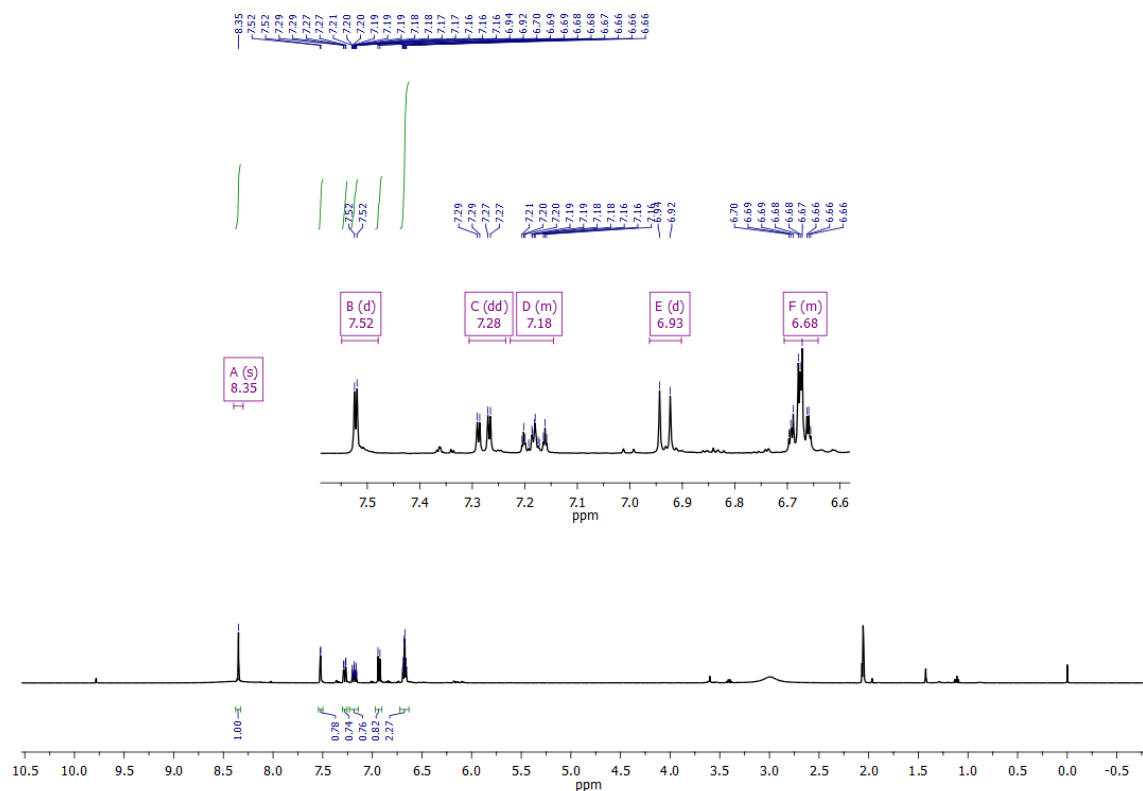
Fonte: Autor, 2024.

Figura 57.Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – DMSO-d6) do composto **14**.



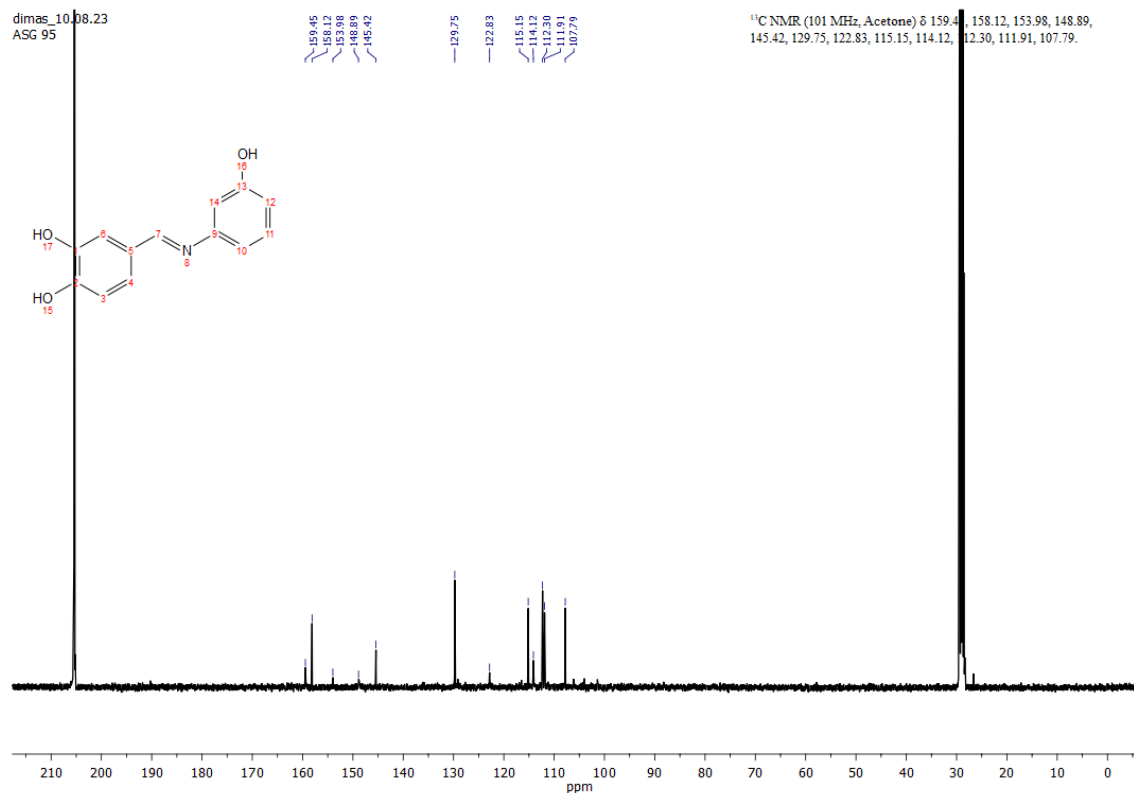
Fonte: Autor, 2024.

Figura 58. Espectro de RMN ^1H (400 MHz – Acetona- d_6) do composto **15**.



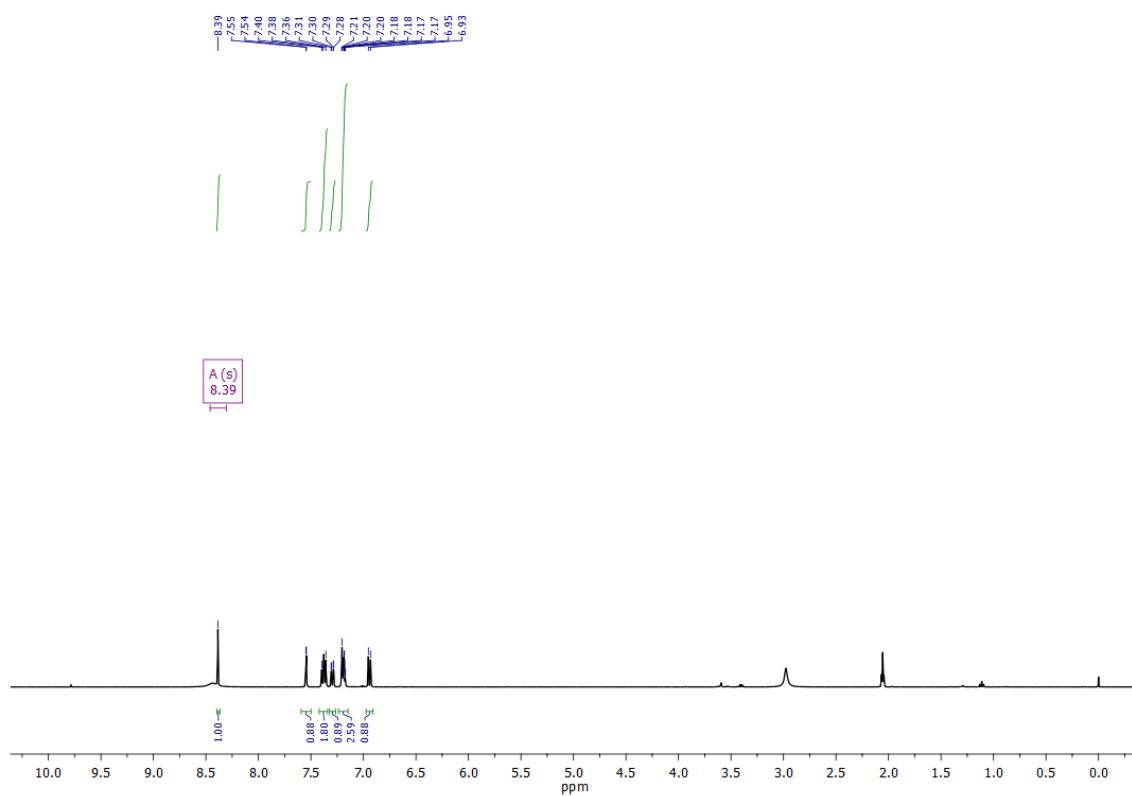
Fonte: Autor, 2024.

Figura 59. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz – Acetona- d_6) do composto **15**.



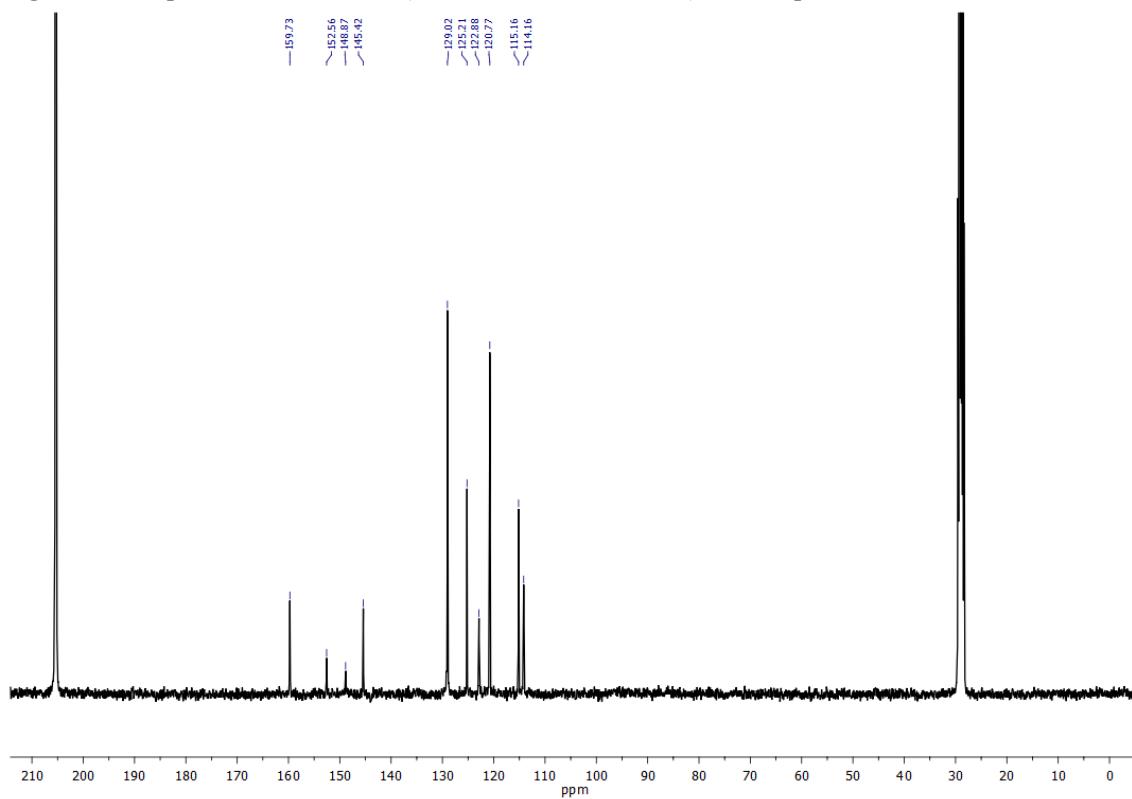
Fonte: Autor, 2024.

Figura 60. Espectro de RMN ^1H (400 MHz – Acetona- d_6) do composto **16**.



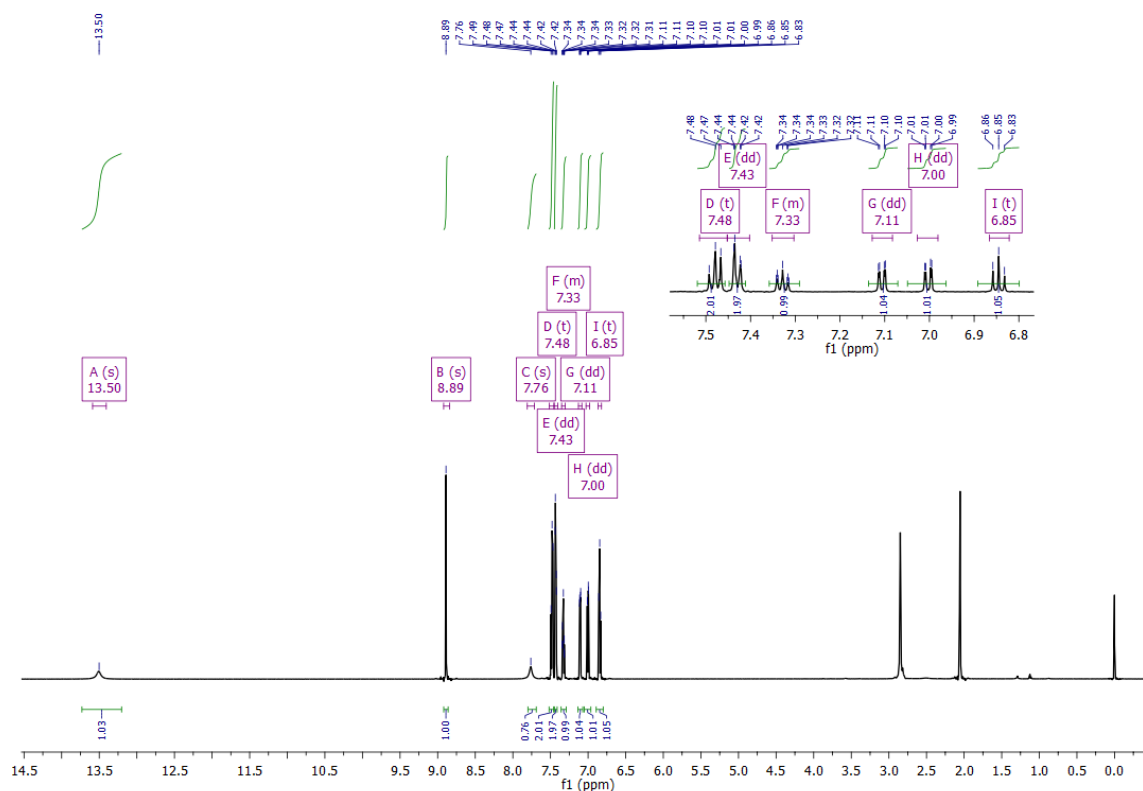
Fonte: Autor, 2024.

Figura 61. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – Acetona- d_6) do composto **16**.



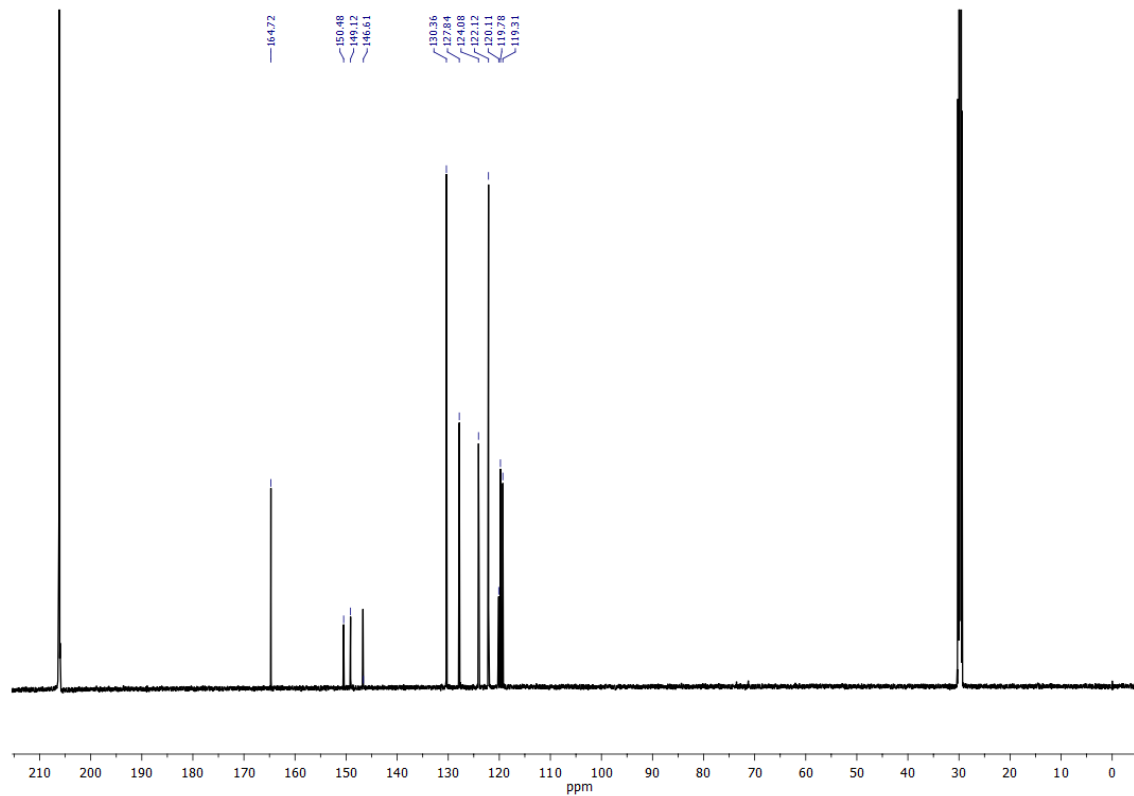
Fonte: Autor, 2024.

Figura 62. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – Acetona- d_6) do composto **17**.



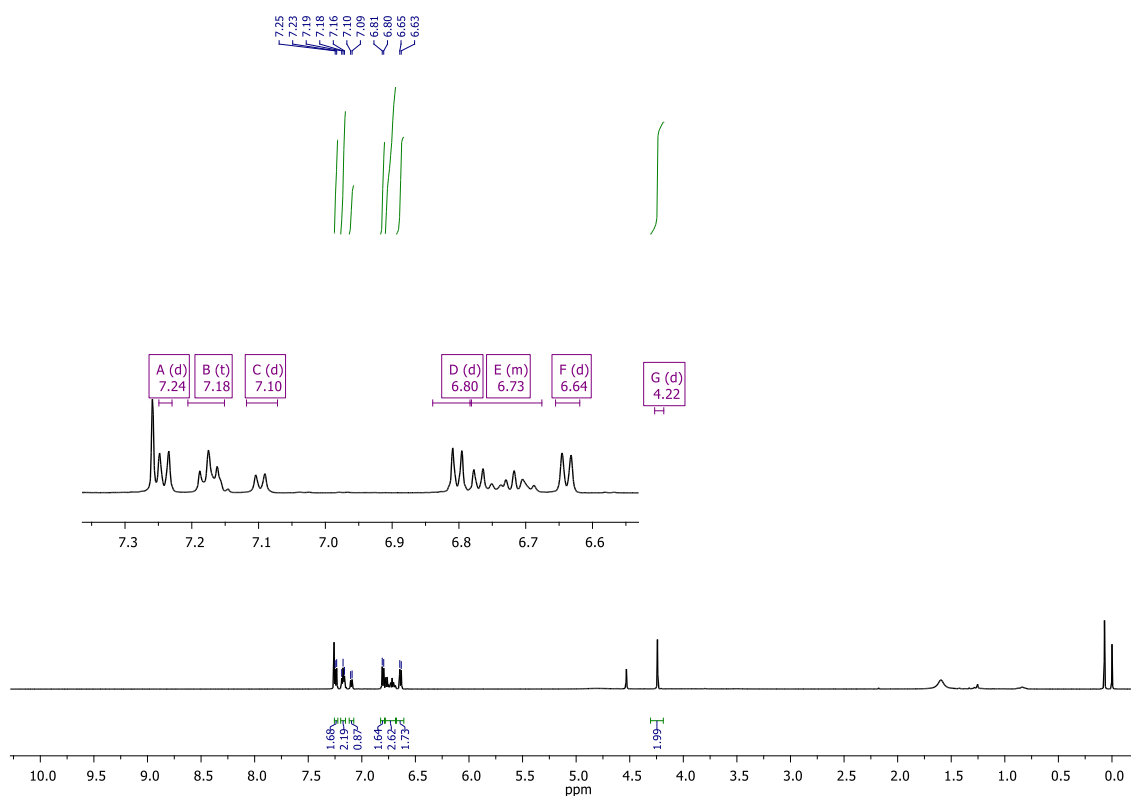
Fonte: Autor, 2024.

Figura 63. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – Acetona- d_6) do composto **17**.



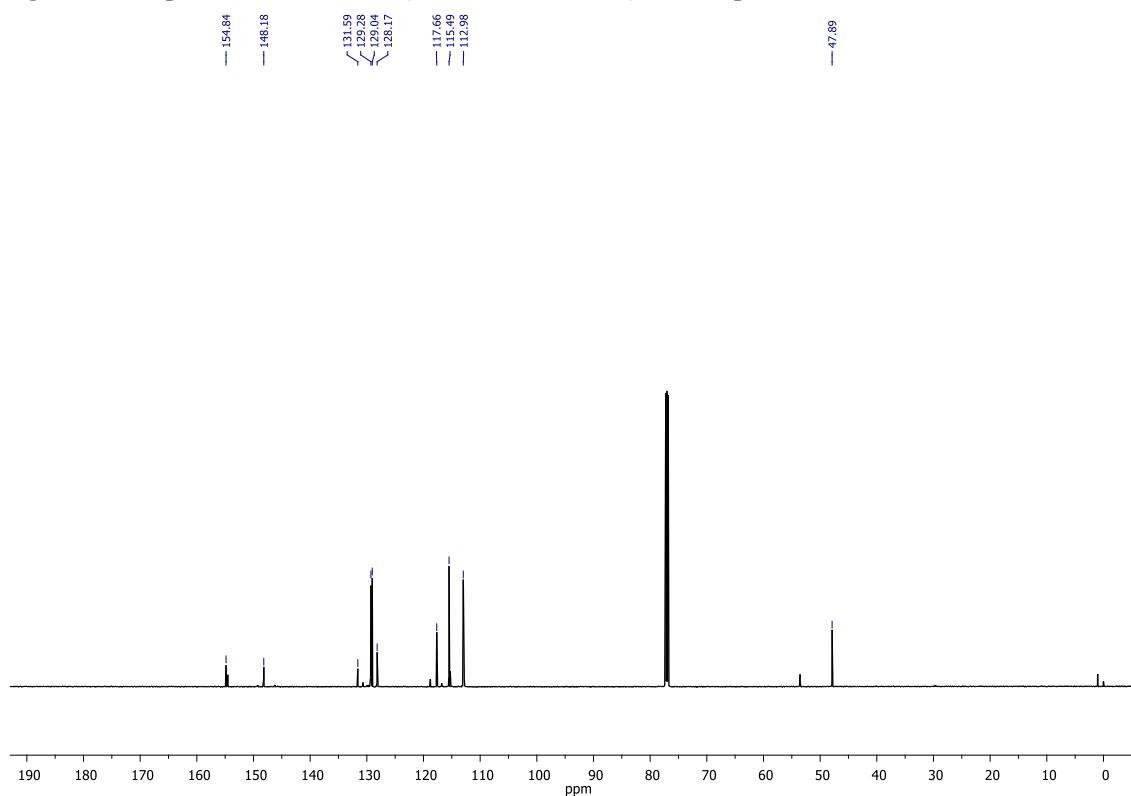
Fonte: Autor, 2024.

Figura 64. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – CDCl_3) do composto **18**.



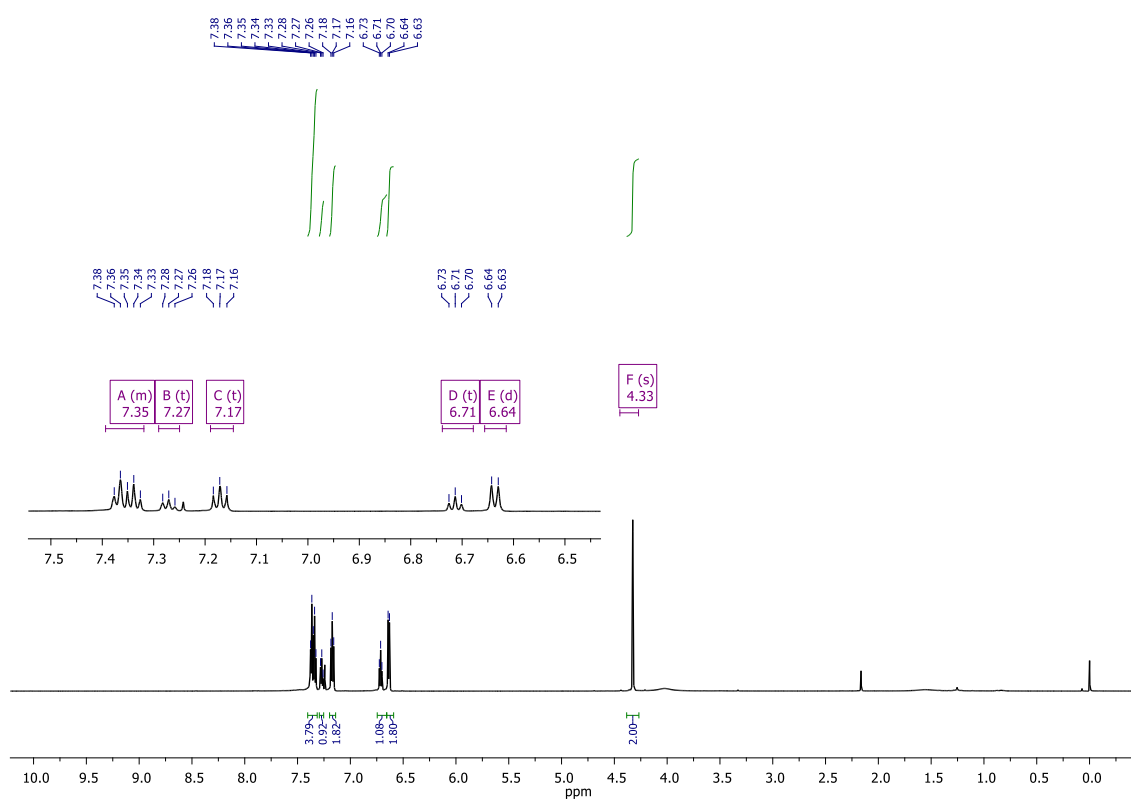
Fonte: Autor, 2022.

Figura 65. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz – CDCl_3) do composto **18**.



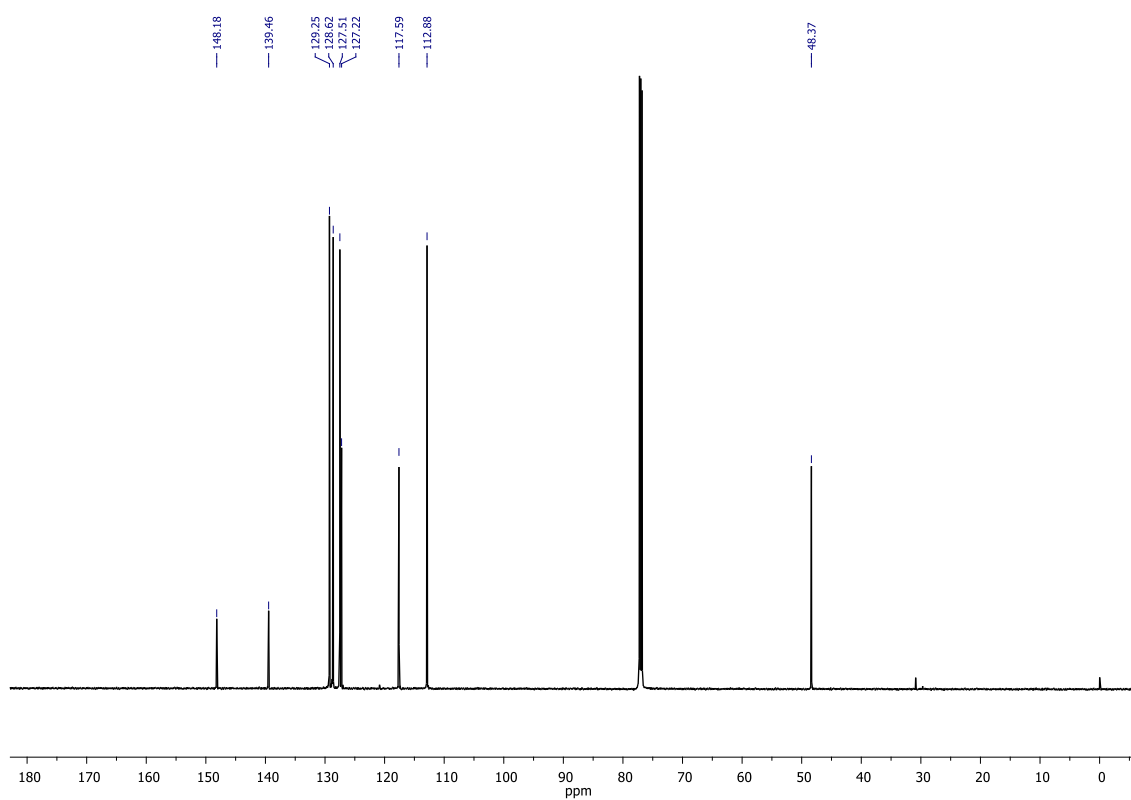
Fonte: Autor, 2024.

Figura 66. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – CDCl_3) do composto **19**.



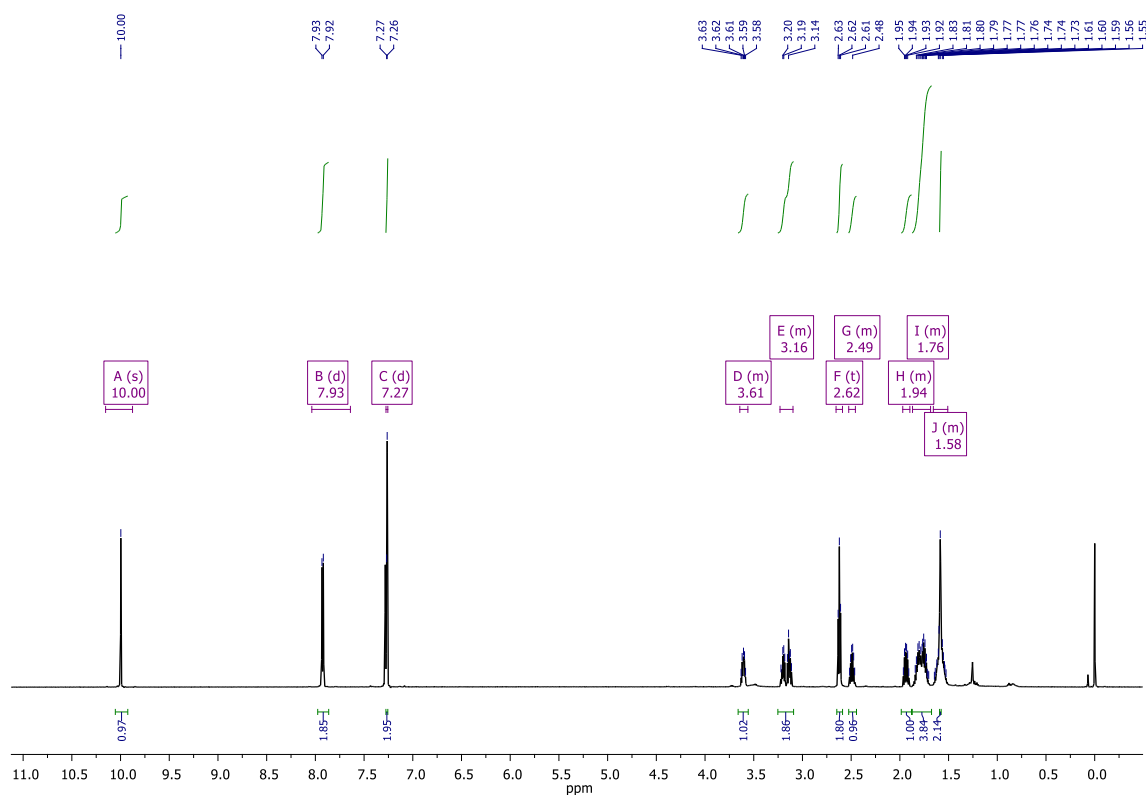
Fonte: Autor, 2024.

Figura 67. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz – CDCl_3) do composto **19**.



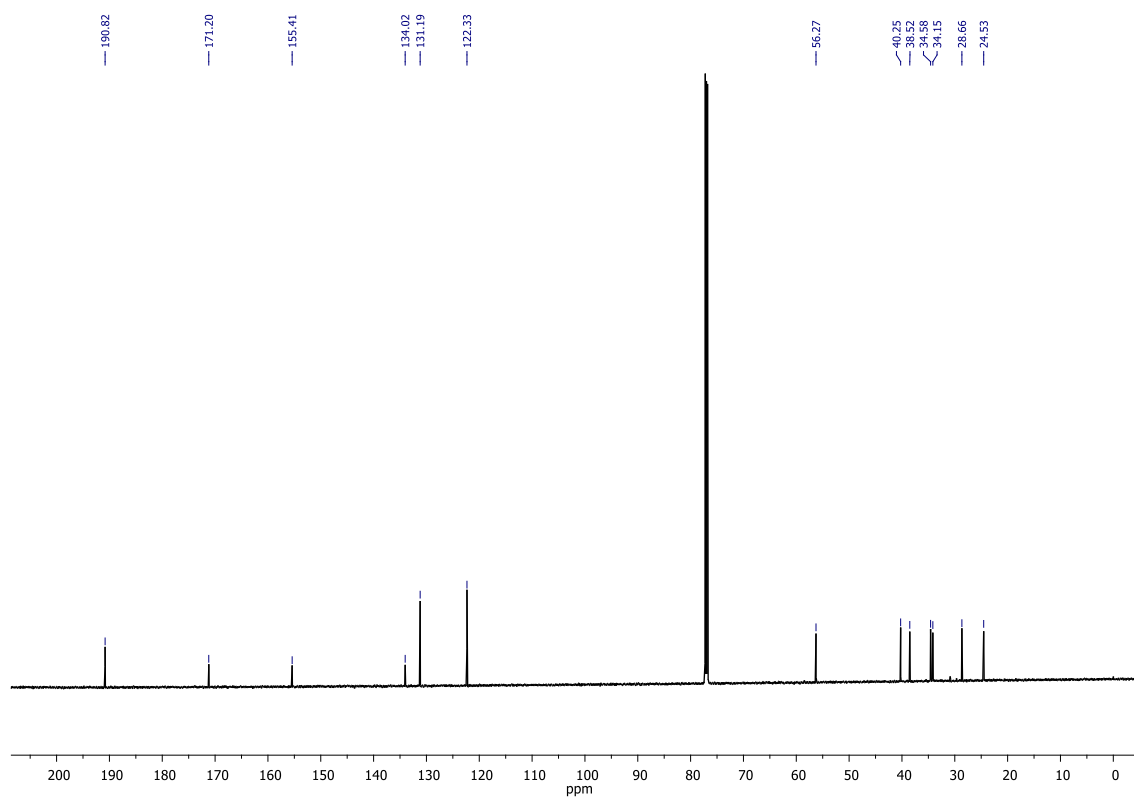
Fonte: Autor, 2024.

Figura 68. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – CDCl_3) do composto **20**.



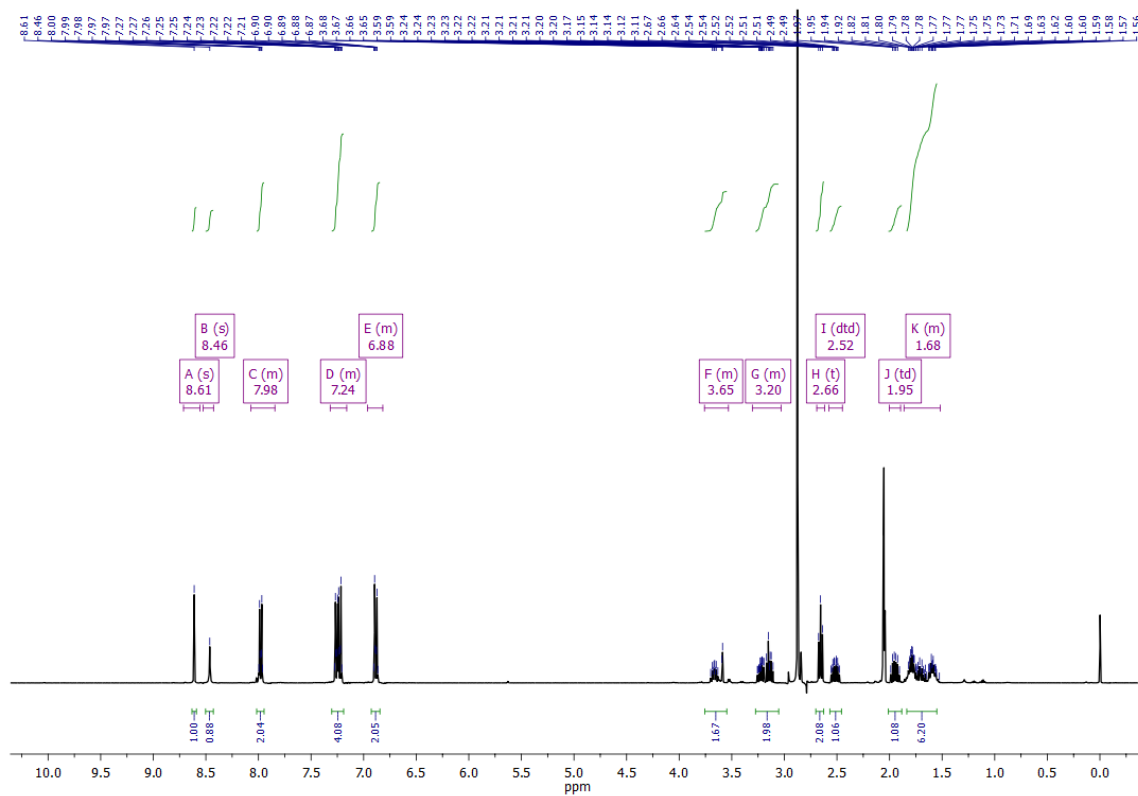
Fonte: Autor, 2024.

Figura 69. Espectro de RMN ^{13}C (600 MHz – CDCl_3) do composto **20**.



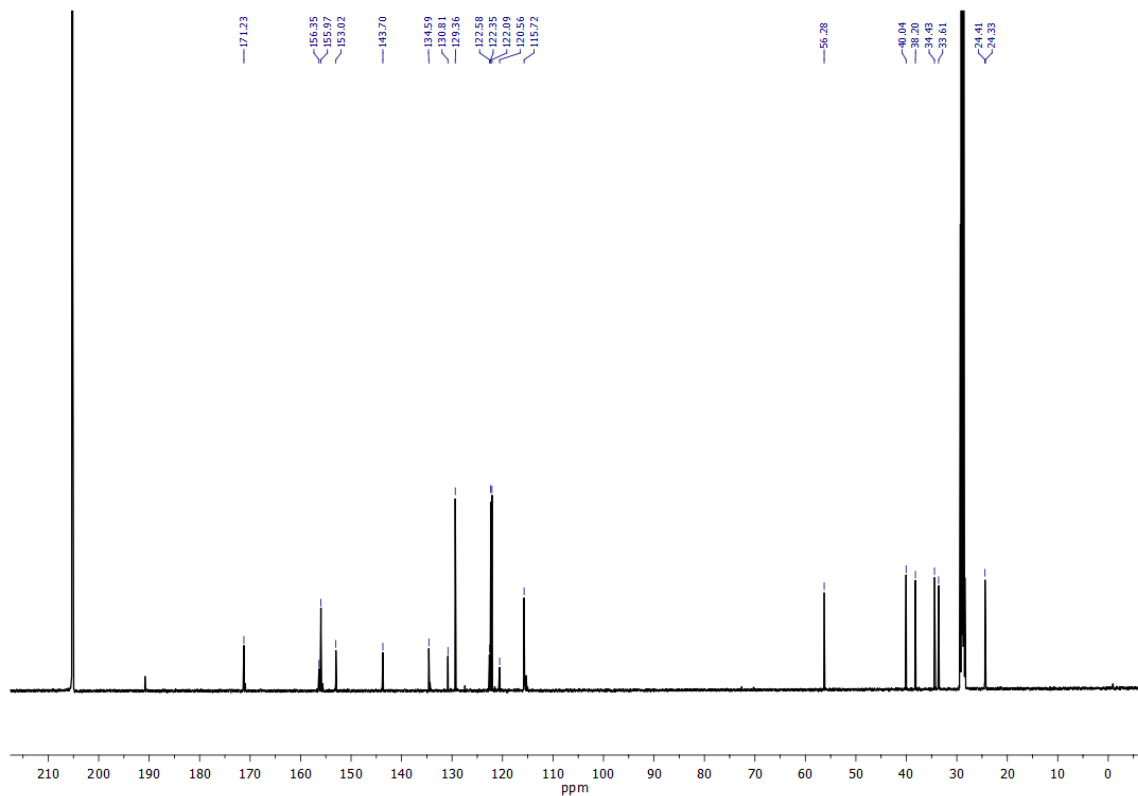
Fonte: Autor, 2024.

Figura 70. Espectro de RMN ^1H (400 MHz – Acetona- d_6) do composto **21**.



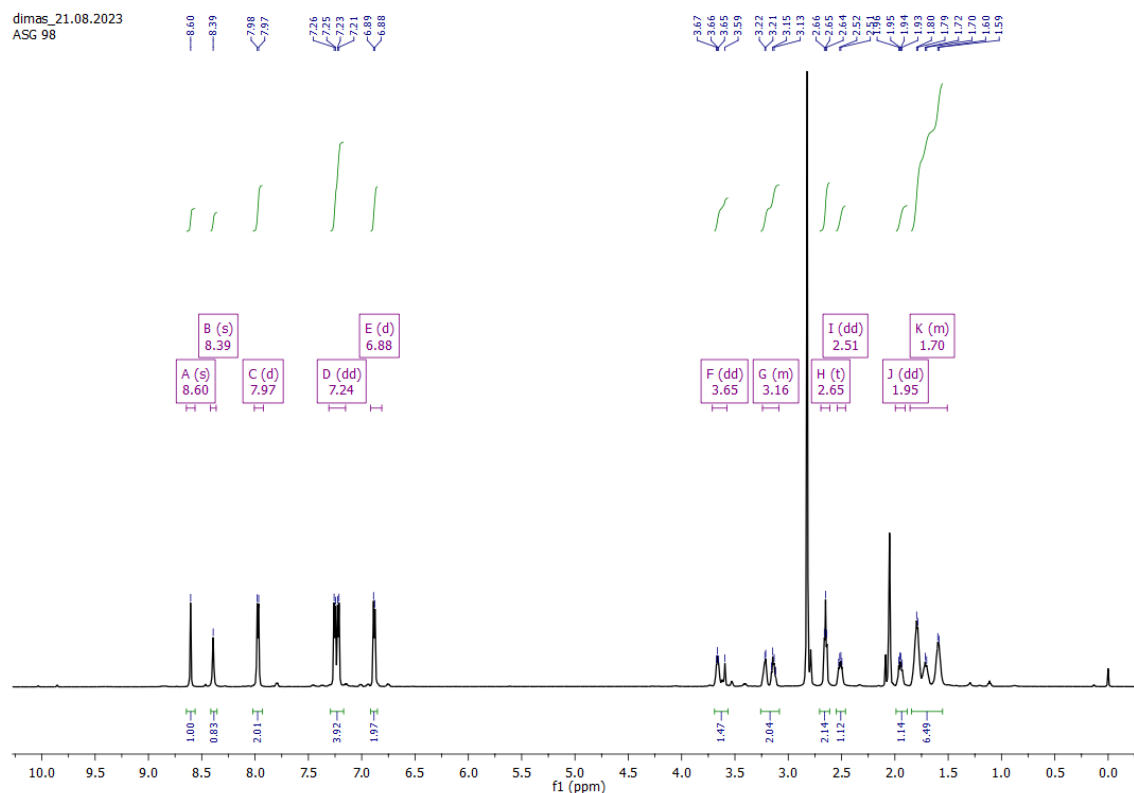
Fonte: Autor, 2024.

Figura 71. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – Acetona- d_6) do composto **21**.



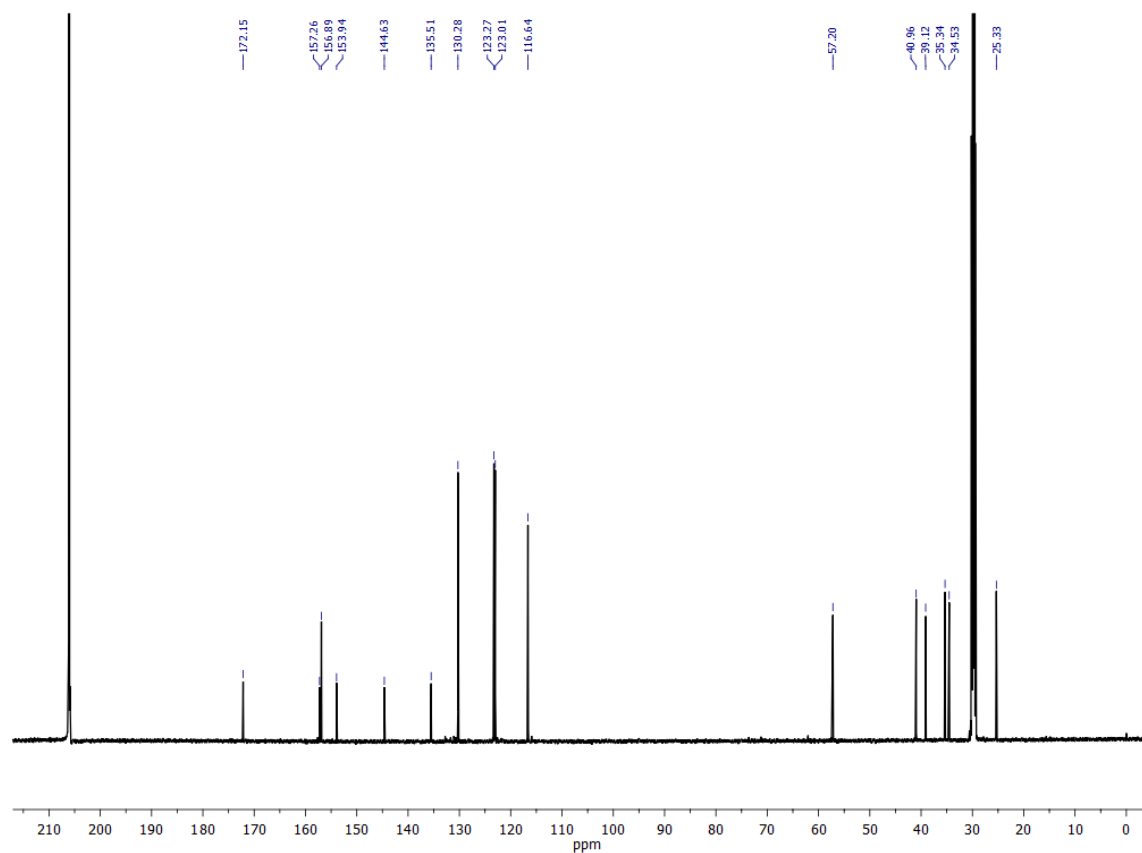
Fonte: Autor, 2024.

Figura 72. Espectro de RMN ^1H (600 MHz – Acetona- d_6) do composto **22**.



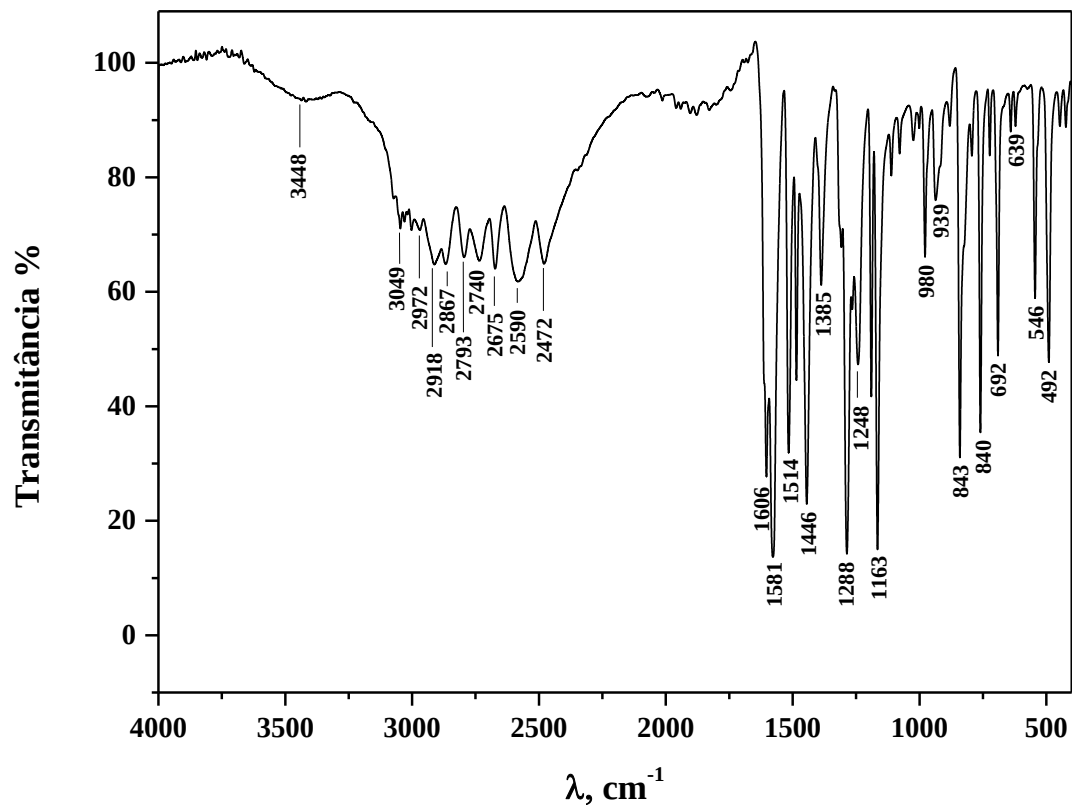
Fonte: Autor, 2024.

Figura 73. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz – Acetona- d_6) do composto **22**.



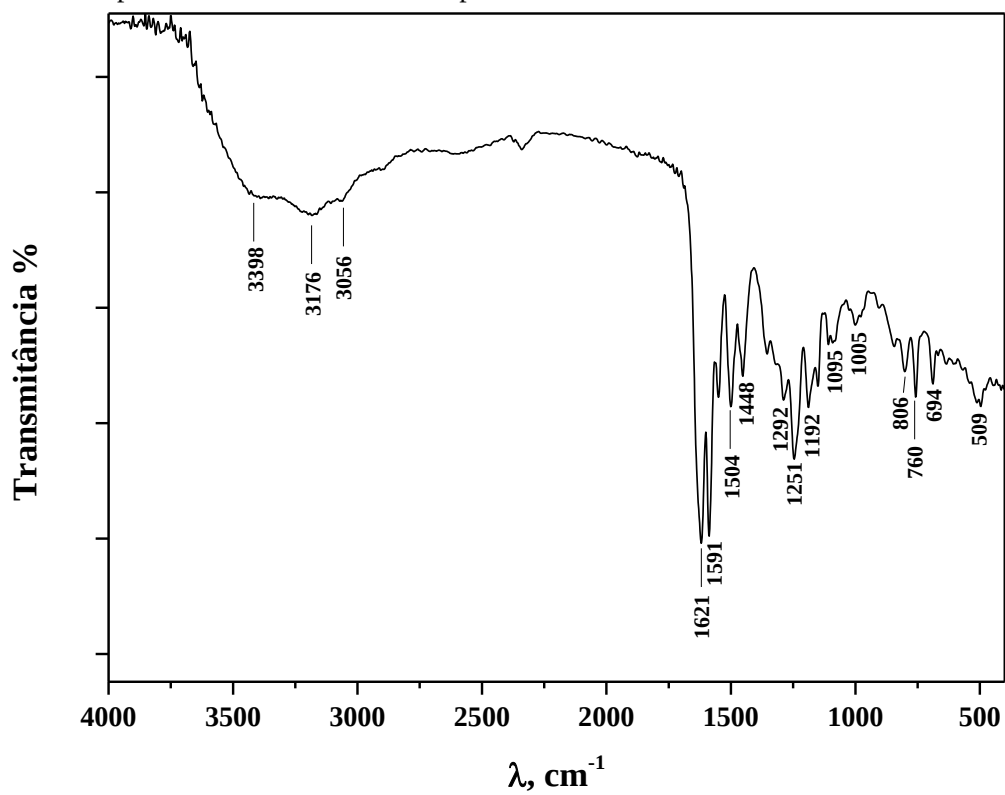
Fonte: Autor, 2024.

Figura 74. Espectro de FTIR-ATR do composto **1**.



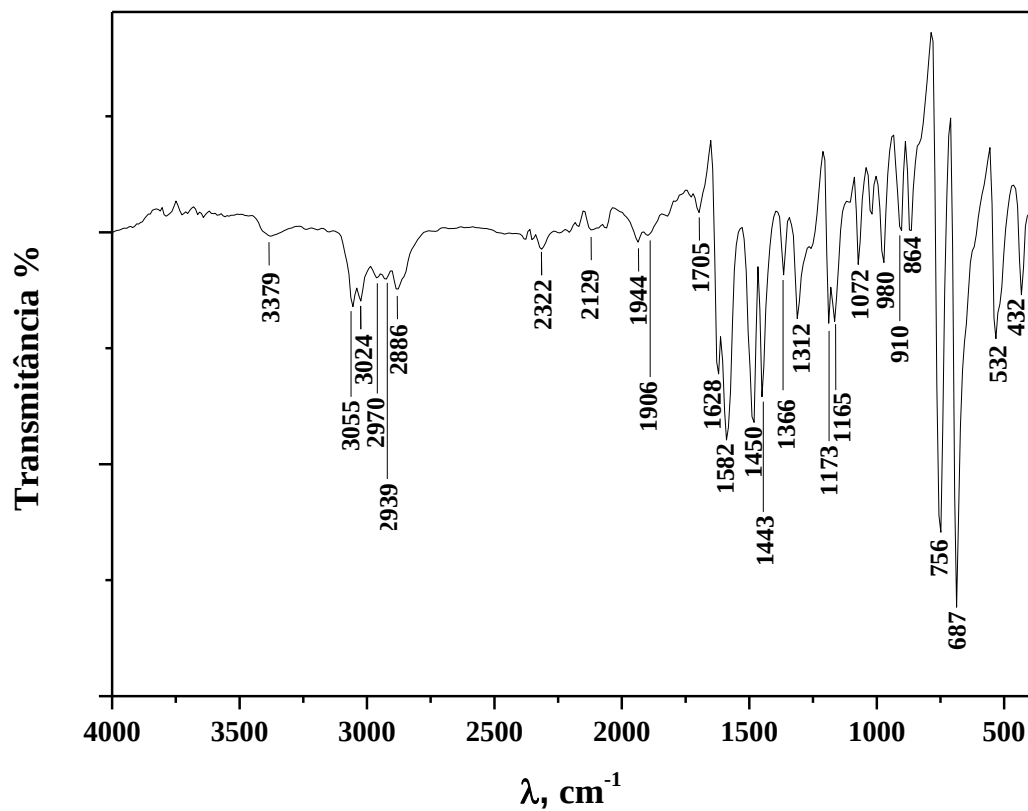
Fonte: Autor, 2024.

Figura 75. Espectro de FTIR-ATR do composto **2**.



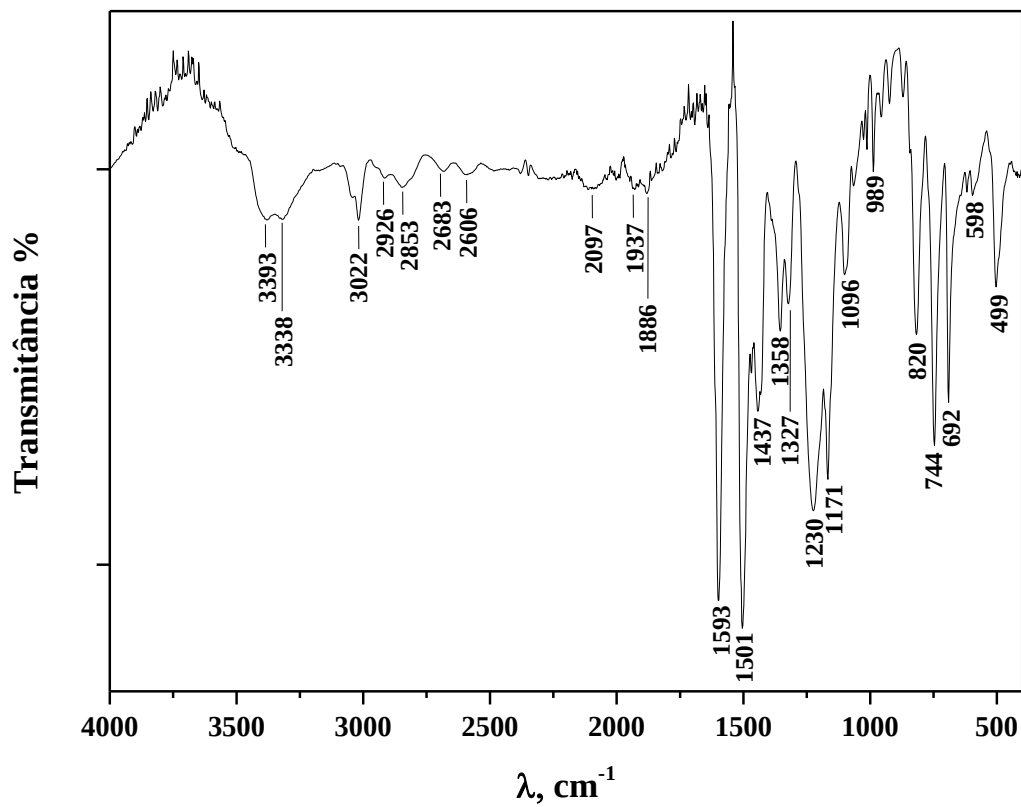
Fonte: Autor, 2024.

Figura 76. Espectro de FTIR-ATR do composto **3**.



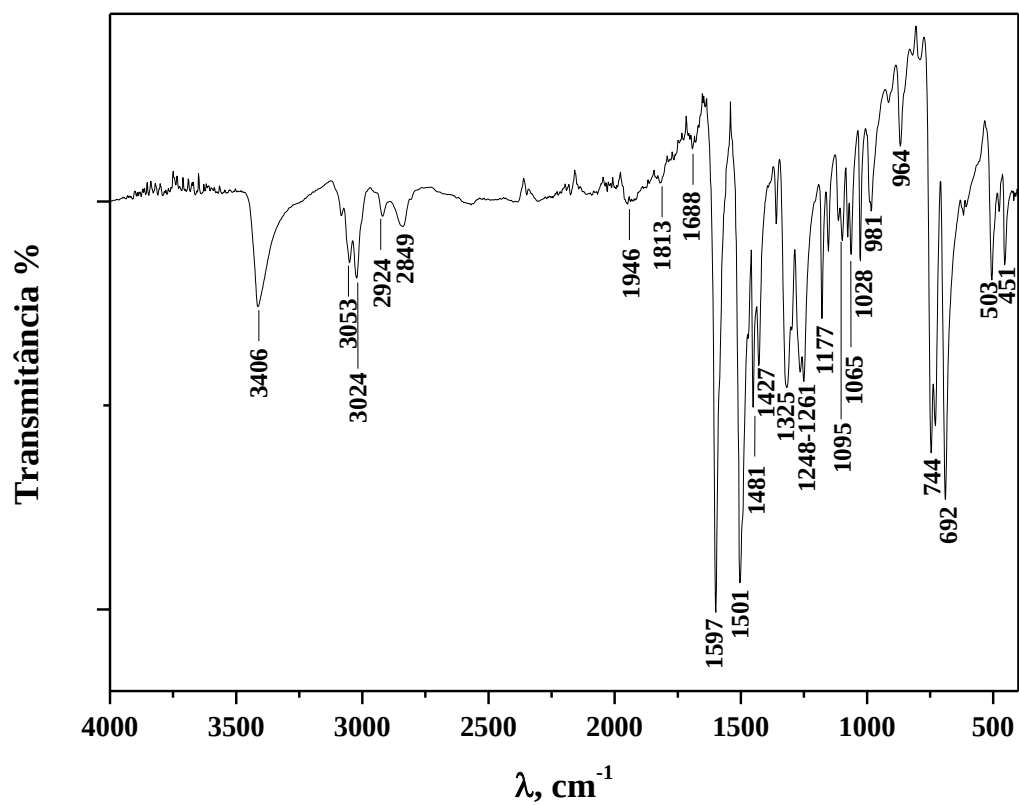
Fonte: Autor, 2024.

Figura 77. Espectro de FTIR-ATR do composto **18**.



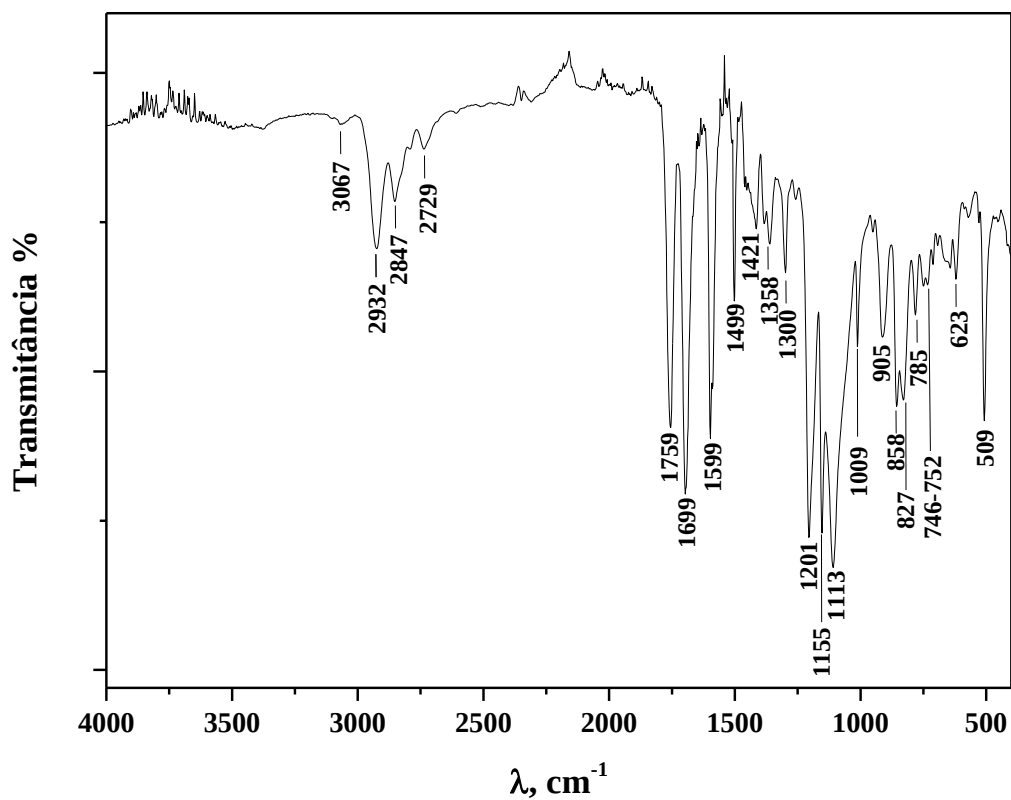
Fonte: Autor, 2024.

Figura 78. Espectro de FTIR-ATR do composto **19**.



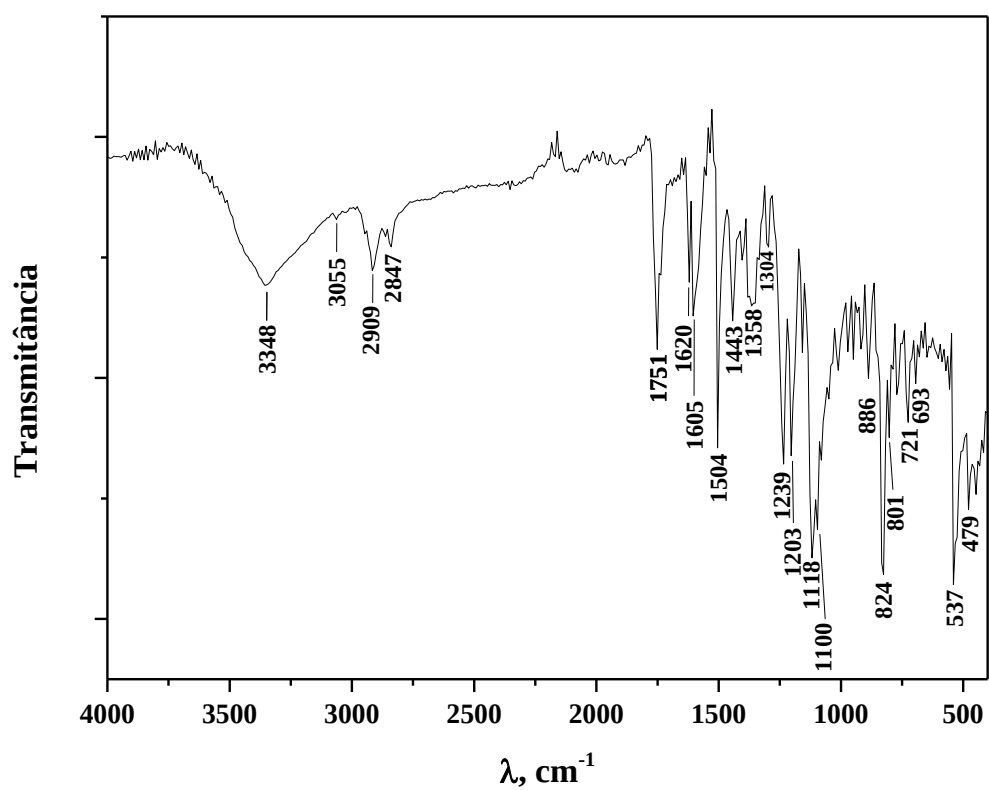
Fonte: Autor, 2024.

Figura 79. Espectro de FTIR-ATR do composto **20**.



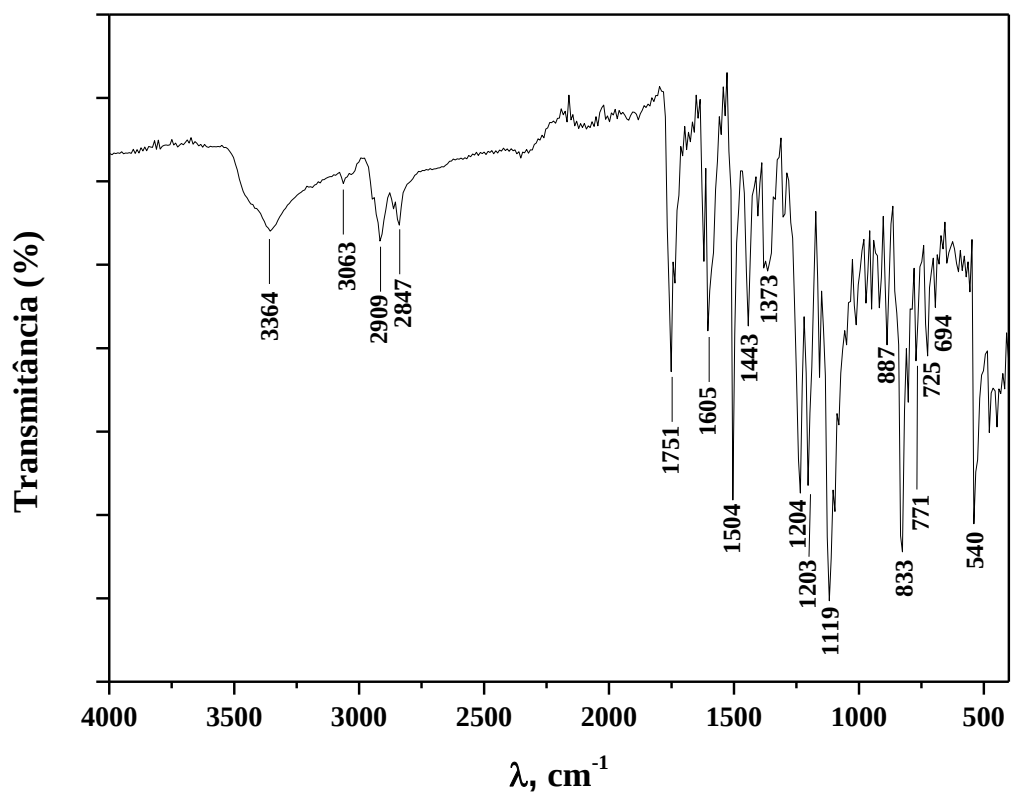
Fonte: Autor, 2024.

Figura 80. Espectro de FTIR-ATR do composto **21**.



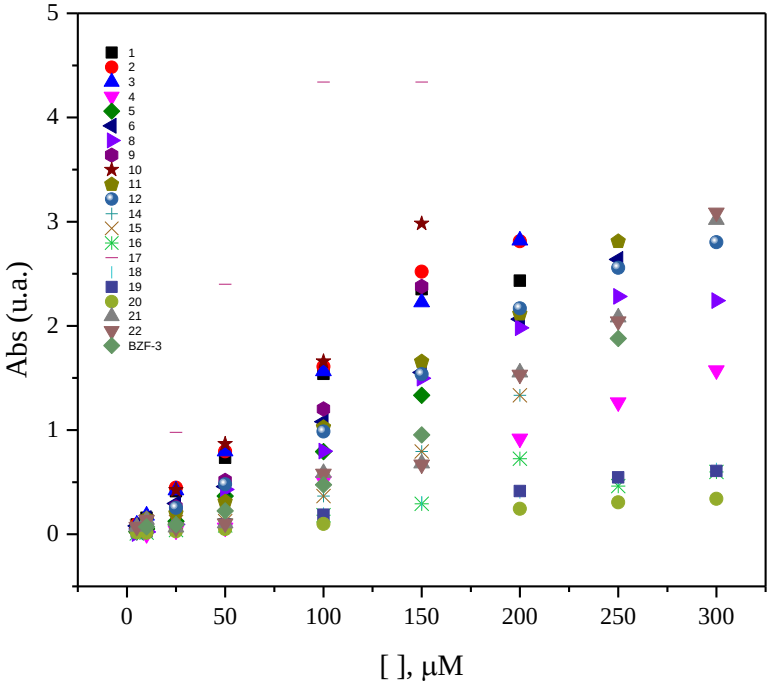
Fonte: Autor, 2024.

Figura 811. Espectro de FTIR-ATR do composto **22**.



Fonte: Autor, 2024.

Figura 82. Curvas analíticas dos compostos **1 – 22** e BZF-3 para posterior determinação do FPS-UVB.



Fonte: Autor, 2024.

Tabela 19. Parâmetros avaliados para os compostos e padrões avaliados frente ao método CUPRAC.

Compostos/Padrões	Faixa linear (μM)	$y = ax + b$		
		a	b	R^2
1	1 – 5	0,028 ($\pm 0,001$)	0,506 ($\pm 0,003$)	0,99145
2	1 – 5	0,027 ($\pm 0,001$)	0,506 ($\pm 0,003$)	0,99506
3	1 – 5	0,031 ($\pm 0,002$)	0,510 ($\pm 0,006$)	0,97918
4	1 – 5	0,130 ($\pm 0,015$)	0,222 ($\pm 0,050$)	0,94784
5	1 – 5	0,1729 ($\pm 0,003$)	0,3028 ($\pm 0,102$)	0,97411
6	1 – 5	0,188 ($\pm 0,010$)	0,178 ($\pm 0,033$)	0,98863
7	1 – 5	0,185 ($\pm 0,035$)	0,155 ($\pm 0,035$)	0,98708
9	1 – 5	0,0364 ($\pm 0,002$)	0,3901 ($\pm 0,084$)	0,98082
10	1 – 5	0,0543 ($\pm 0,003$)	0,2646 ($\pm 0,008$)	0,99056
11	1 – 5	0,048 ($\pm 0,004$)	0,284 ($\pm 0,013$)	0,97451
12	1 – 5	0,192 ($\pm 0,017$)	0,705 ($\pm 0,057$)	0,96785
13	1 – 5	0,006 ($\pm 0,0001$)	0,034 ($\pm 0,002$)	0,96618
15	1 – 5	0,327 ($\pm 0,028$)	0,991 ($\pm 0,093$)	0,97111
16	1 – 5	0,308 ($\pm 0,018$)	11,887 ($\pm 0,060$)	0,98605
17	1 – 5	0,032 ($\pm 0,003$)	0,431 ($\pm 0,010$)	0,96367
18	1 – 4	0,031 ($\pm 0,002$)	0,510 ($\pm 0,004$)	0,9911
19	1 – 5	0,039 ($\pm 0,003$)	0,490 ($\pm 0,008$)	0,97572
20	1 – 5	0,033 ($\pm 0,001$)	0,482 ($\pm 0,003$)	0,99234
21	1 – 5	0,032 ($\pm 0,001$)	0,437 ($\pm 0,006$)	0,98879
22	1 – 5	0,179 ($\pm 0,045$)	0,862 ($\pm 0,153$)	0,93021
Resveratrol	1 – 5	0,237 ($\pm 0,013$)	0,257 ($\pm 0,041$)	0,98873
Quercetina	1 – 5	0,478 ($\pm 0,038$)	0,328 ($\pm 0,126$)	0,97524
Piacetanol	1 – 4	0,075 ($\pm 0,007$)	0,489 ($\pm 0,016$)	0,97026
Trolox [®]	1 – 5	0,044 ($\pm 0,002$)	0,485 ($\pm 0,005$)	0,99388

Fonte: Autor, 2024.