



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ILÁRIA MARTINA SILVA LINS

**MODIFICAÇÃO MOLECULAR DE 2-TIOPIRIMIDINONAS VISANDO O  
DESENVOLVIMENTO DE NOVOS INIBIDORES DA ENZIMA ALDOSE  
REDUTASE**

Recife

2020

ILÁRIA MARTINA SILVA LINS

**MODIFICAÇÃO MOLECULAR DE 2-TIOPIRIMIDINONAS VISANDO O  
DESENVOLVIMENTO DE NOVOS INIBIDORES DA ENZIMA ALDOSE  
REDUTASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

**Área de concentração:** Química Orgânica

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janaína Versiani dos Anjos

**Coorientadora:** Dr<sup>a</sup>. Larissa Gonçalves Maciel

Recife

2020

Catálogo na fonte  
Bibliotecária Mariana de Souza Alves CRB4-2105

L759m Lins, Ilária Martina Silva.

Modificação molecular de 2-tiopirimidinonas visando o desenvolvimento de novos inibidores da enzima aldose redutase / Ilária Martina Silva Lins. – 2020.

96 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Janaína Versiani dos Anjos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, Química. Recife, 2020.

Inclui referências e apêndice.

1. Química Orgânica. 2. 2-Tiopirimidin-4-onas. 3. Aldose redutase. 4. Diabetes.  
I. Anjos, Janaína Versiani dos. (orientadora) II. Título.

547

CDD (22. ed.)

UFPE-CCEN 2020-166

**ILÁRIA MARTINA SILVA LINS**

**MODIFICAÇÃO MOLECULAR DE 2-TIOPIRIMIDINONAS VISANDO O  
DESENVOLVIMENTO DE NOVOS INIBIDORES DA ENZIMA ALDOSE REDUTASE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em: 04/09/2020

**BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Janaína Versiani dos Anjos (Orientadora)**

Universidade Federal de Pernambuco  
Departamento de Química Fundamental

**Prof. Antônio Rodolfo de Faria**

Universidade Federal de Pernambuco  
Departamento de Ciências Farmacêuticas

**Prof. Ronaldo Nascimento de Oliveira**

Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Departamento de Química

*Dedico este trabalho a Deus por guiar os meus passos e a minha família e amigos por todo apoio e incentivo.*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Janaína, agradeço por todo conhecimento a mim passado, por toda dedicação, e por nunca poupar esforços para me ensinar e estar comigo em todas as fases deste trabalho, tornando-o leve e prazeroso.

À minha coorientadora Larissa, que sempre esteve disponível para contribuir com seus conhecimentos, conselhos e por sanar minhas frequentes dúvidas com paciência e dedicação.

Aos colegas de laboratório que tive a oportunidade de conhecer: Sidney, Sayonara, Michael e Hélder, pelo auxílio nos experimentos e pelos momentos de descontração.

Ao Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz por nos acolher e ceder um espaço para realização de parte deste trabalho.

Aos técnicos da central analítica, aos membros da pós-graduação e todos que contribuíram para realização deste trabalho de forma direta ou indireta.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

A Diabetes é um problema de saúde originado por altos níveis de glicose no sangue, e como consequência desse aumento, há necessidade de uma maior ação da via do poliol, cuja função é converter glicose a frutose, em decorrência da alta demanda da via do poliol, surgem os estresses osmótico e oxidativo, levando a complicações secundárias tais como a nefropatia, neuropatia e retinopatia diabética. Uma das formas de controlar o surgimento dessas complicações é pelo uso de inibidores da enzima aldose redutase (AR). Neste cenário, procurou-se desenvolver novos candidatos a inibidores da AR derivados das 2-tiopirimidin-4-onas, como também avaliar a inibição perante a AR através de um ensaio colorimétrico (*in vitro*) e *in silico*, utilizando simulações de *docking molecular*. A partir disso, foram sintetizados 20 candidatos a inibidores dos quais 12 apresentam-se como inéditos, todos caracterizados por ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Os ensaios *in vitro* mostraram que a maioria dos compostos possui percentual de inibição perante a AR acima de 74% numa concentração de 50  $\mu\text{M}$ . Além disto, o derivado ácido 2-[(5-ciano-6-oxo-4-fenil-1,6-diidropirimidin-2-il)tio]acético, exibiu uma  $\text{CI}_{50}$  de 8,0  $\mu\text{M}$ , comparando-se ao ácido [3-(3-nitrofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]butanóico ( $\text{CI}_{50} = 2,4 \mu\text{M}$ ), conhecido inibidor da AR. Adicionalmente, as simulações de *docking molecular* confirmaram as interações dos candidatos nos resíduos do sítio catalítico da AR, e trouxeram perspectivas para a descoberta de novos compostos-protótipo baseados em 2-tiopirimidin-4-onas.

**Palavras-chave:** 2-Tiopirimidin-4-onas. Aldose redutase. Diabetes. *Docking molecular*.

## ABSTRACT

Diabetes is a health problem developed by high blood sugar levels, and as a result, the polyol pathway is increased, its function is to convert glucose to fructose, due to the high demand of the polyol pathway, osmotic and oxidative stresses arise, leading to secondary complications such as nephropathy, neuropathy and diabetic retinopathy. One way to control these complications is using inhibitors against the enzyme aldose reductase (AR). In this scenario, we attempted to develop new compounds derived from 2-thiopyrimidin-4-ones that act as AR inhibitors. In addition, to evaluate the AR inhibition by the proposed compounds, in vitro (colorimetric assay) and in silico (molecular docking simulations) methods were used. Therefore, 20 compounds were synthesized, in which 12 are unpublished, all characterized by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance (NMR). The in vitro assays showed that most of the compounds exhibited inhibition percentage of, at least, 74% at 50  $\mu\text{M}$ . the 2-[(5-cyano-6-oxo-4-phenyl-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)thio] acetic acid derivative exhibited an  $\text{IC}_{50} = 8.0 \mu\text{M}$ , which can be compared to 3-(3-nitrophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl] butanoic acid ( $\text{IC}_{50} = 2.4 \mu\text{M}$ ), a known AR inhibitor. Additionally, the molecular docking simulations confirmed the interactions between the compounds and AR catalytic site and brought perspectives for the discovery of new prototype compounds based on 2-thiopyrimidin-4-ones.

**Keywords:** 2-Thiopyrimidin-4-ones. Aldose reductase. Diabetes. Docking molecular.

## LISTA DE FIGURAS

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 -  | Estrutura cristalográfica da enzima Aldose Redutase (rosa), seu cofator NADPH (laranja) e o seu ligante cristalográfico 53N (azul), disponível no banco de dados de proteínas com o código PDB 3DN5 .....                                                                                                                                                                          | 15 |
| Figura 2 -  | Papel da AR na via do poliol e complicações patogênicas relacionadas a Diabetes. A AR reduz aldeídos tóxicos produzidos por espécies reativas de oxigênio (EROs) em álcoois inativos. O excesso de glicose ativa a AR a reduzi-lo em sorbitol e o acúmulo de sorbitol ocasiona estresse osmótico nas células. A diminuição dos níveis de NADPH aumentam o estresse oxidativo ..... | 17 |
| Figura 3 -  | a) comparação entre a retina de um olho saudável com a retina de um olho acometido por retinopatia diabética. b) estruturas dos inibidores da AR: sorbinil, zenarestat e fidarestat .....                                                                                                                                                                                          | 19 |
| Figura 4 -  | Exemplos de inibidores da AR .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 20 |
| Figura 5 -  | Reação genérica de atuação da AR sem inibidor e com o inibidor Epalrestat, e as curvas de controles positivo (com inibidor, linha laranja) e negativo (sem inibidor, linha azul) obtidas em ensaios <i>in vitro</i> .....                                                                                                                                                          | 22 |
| Figura 6 -  | Estrutura da 2-tiouracila .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 23 |
| Figura 7 -  | Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (DMSO- $\text{d}_6$ , 400 MHz) de <b>6a</b> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 32 |
| Figura 8 -  | Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (DMSO- $\text{d}_6$ , 101 MHz) de <b>6a</b> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 33 |
| Figura 9 -  | Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (DMSO- $\text{d}_6$ , 400 MHz) de <b>8a</b> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 35 |
| Figura 10 - | Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (DMSO- $\text{d}_6$ , 101 MHz) de <b>8a</b> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 36 |
| Figura 11 - | Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (DMSO- $\text{d}_6$ , 400 MHz) de <b>10a</b> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 38 |
| Figura 12 - | Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (DMSO- $\text{d}_6$ , 101 MHz) de <b>10a</b> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 39 |
| Figura 13 - | Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (DMSO- $\text{d}_6$ , 400 MHz) de <b>13b</b> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 43 |
| Figura 14 - | Espectros de RMN de $^1\text{H}$ (DMSO- $\text{d}_6$ , 400 MHz) para os compostos <b>13b</b> e <b>12b</b> para fins de comparação .....                                                                                                                                                                                                                                            | 44 |
| Figura 15 - | Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (DMSO- $\text{d}_6$ , 101 MHz) de <b>13b</b> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 45 |
| Figura 16 - | Curva de dose-resposta de inibição da AR pelo composto <b>8a</b> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 48 |
| Figura 17 - | Exemplos de inibidores da enzima AR que apresentam semelhança estrutural com os compostos sintetizados nesse trabalho .....                                                                                                                                                                                                                                                        | 49 |

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 18 - | <i>Redocking</i> do ligante cristalográfico 53N na estrutura da AR para validação do método. (Código PDB: 3DN5) Cofator NADPH em laranja, 53N cristalográfico em azul, 53N após o DM posicionado dentro do sítio ativo e 53N em verde após o DM posicionado fora do sítio ativo ..... | 50 |
| Figura 19 - | DM da série <b>8a-e</b> em comparação ao 53N: Interações intermoleculares com os resíduos para o 53N a) e <b>8a</b> b). 53N e <b>8a</b> de forma comparativa c). Todos os compostos da série <b>8a-e</b> após DM no sítio ativo da AR d) ...                                          | 52 |
| Figura 20 - | Comparação direta entre os compostos <b>8a</b> e <b>8f</b> com o ligante 53N a) e entre os compostos <b>6f</b> , <b>8f</b> e <b>10f</b> .....                                                                                                                                         | 53 |
| Figura 21 - | Comparação das conformações dos compostos <b>8a</b> e <b>13a</b> no sítio ativo da AR. NADPH com carbonos em laranja .....                                                                                                                                                            | 56 |
| Figura 22 - | Representação da metodologia para realização do ensaio enzimático .....                                                                                                                                                                                                               | 66 |

## LISTA DE ESQUEMAS

|              |                                                                                                         |    |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Esquema 1 -  | Síntese das 6-aryl-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carbonitrilas ( <b>4a-e</b> ) .....      | 27 |
| Esquema 2 -  | Mecanismo proposto para formação das 2-tiopirimidin-4-onas .....                                        | 28 |
| Esquema 3 -  | Síntese dos acetatos de 2-[(4-aryl-5-ciano-6-oxo-1,6-diidropirimidin-2-il)tio]etila .....               | 30 |
| Esquema 4 -  | Equilíbrio tautomérico das 2-tiopirimidin-4-onas .....                                                  | 31 |
| Esquema 5 -  | Síntese dos ácidos 2-[(4-aryl-5-ciano-6-oxo-1,6-diidropirimidin-2-il)tio]acéticos .....                 | 34 |
| Esquema 6 -  | Síntese dos ácidos 3-[(4-aryl-5-ciano-6-oxo-1,6-diidropirimidin-2-il)tio] propanóicos .....             | 37 |
| Esquema 7 -  | Síntese das 2-[(2-hidróxi)etil]tio]-4-aryl-6-oxo-1,6-diidropirimidina-5-carbonitrilas .....             | 40 |
| Esquema 8 -  | Síntese das 7-Aryl-5-oxo-2,3-diidro-5 <i>H</i> -tiazolo[3,2- <i>a</i> ]pirimidina-6-carbonitrilas ..... | 41 |
| Esquema 9 -  | Mecanismo proposto para a formação do composto <b>13a</b> .....                                         | 41 |
| Esquema 10 - | Possíveis rotas sintéticas que serão abordadas para a síntese dos compostos <b>4f-g</b> .....           | 71 |

## LISTA DAS TABELAS

|            |                                                                                                                              |    |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - | Dados experimentais para os compostos da série <b>4a-e</b> .....                                                             | 28 |
| Tabela 2 - | Condições sintéticas testadas para funcionalização das 2-tiopirimidin-4-onas, monitorando a formação ou não do produto ..... | 29 |
| Tabela 3 - | Dados experimentais dos compostos <b>6a-e</b> .....                                                                          | 31 |
| Tabela 4 - | Dados experimentais dos compostos <b>8a-e</b> .....                                                                          | 34 |
| Tabela 5 - | Dados experimentais dos compostos <b>10a-e</b> .....                                                                         | 37 |
| Tabela 6 - | Dados experimentais dos compostos <b>13a-e</b> .....                                                                         | 42 |
| Tabela 7 - | Percentuais de inibição relativa para cada composto testado na enzima AR .....                                               | 46 |
| Tabela 8 - | Porcentagens de inibição relativa para diferentes concentrações do composto <b>8a</b> .....                                  | 48 |
| Tabela 9 - | Valores estimados de constante de inibição ( $K_i$ ) gerados pelo DM dos compostos na estrutura da AR .....                  | 54 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                     |                                                                                                              |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 53N                 | 3-[5-(3-nitrofenil)tiofen-2-il]propanóico                                                                    |
| AR                  | aldose redutase                                                                                              |
| CCD                 | cromatografia de camada delgada                                                                              |
| CI <sub>50</sub>    | concentração inibitória de 50% da atividade enzima                                                           |
| d                   | duplete                                                                                                      |
| DEAD                | dietil-azodicarboxilato                                                                                      |
| DIAD                | diisopropil-azodicarboxilato                                                                                 |
| DM                  | <i>Docking Molecular</i>                                                                                     |
| DMF                 | dimetilformamida                                                                                             |
| DMSO                | dimetilsulfóxido                                                                                             |
| DMSO-d <sub>6</sub> | dimetilsulfóxido deuterado                                                                                   |
| DTT                 | ditiotreitól                                                                                                 |
| EtOH                | etanol                                                                                                       |
| FTIR                | <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> - espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier |
| H <sub>Ar</sub>     | hidrogênio aromático                                                                                         |
| <i>J</i>            | constante de acoplamento                                                                                     |
| m                   | multiplete                                                                                                   |
| MCRs                | reações multicomponente                                                                                      |
| NADPH               | nicotinamida adenina dinucleótido fosfato                                                                    |
| P.F.                | ponto de fusão                                                                                               |
| PDB                 | <i>protein data bank</i> (banco de dados de proteínas)                                                       |
| PPh <sub>3</sub>    | trifenilfosfina                                                                                              |
| ppm                 | partes por milhão                                                                                            |
| q                   | quarteto                                                                                                     |
| R <sub>f</sub>      | fator de retenção                                                                                            |
| RMN                 | ressonância magnética nuclear                                                                                |
| s                   | simpleto                                                                                                     |
| t                   | triplete                                                                                                     |
| t.a.                | temperatura ambiente                                                                                         |

## SUMÁRIO

|            |                                                                                                                                                |           |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA .....</b>                                                                                                | <b>15</b> |
| <b>1.1</b> | <b>A enzima Aldose Redutase (AR) .....</b>                                                                                                     | <b>15</b> |
| <b>1.2</b> | <b>Patologias relacionadas à enzima AR .....</b>                                                                                               | <b>16</b> |
| <b>1.3</b> | <b>Retinopatia diabética: terapêutica atual .....</b>                                                                                          | <b>18</b> |
| <b>1.4</b> | <b>Inibidores da aldose redutase .....</b>                                                                                                     | <b>19</b> |
| <b>1.5</b> | <b>Pirimidinonas .....</b>                                                                                                                     | <b>22</b> |
| <b>1.6</b> | <b>Uso de simulações computacionais na descoberta de novos candidatos a fármacos .....</b>                                                     | <b>23</b> |
| <b>2</b>   | <b>OBJETIVOS .....</b>                                                                                                                         | <b>26</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Objetivo Geral .....</b>                                                                                                                    | <b>26</b> |
| <b>2.2</b> | <b>Objetivos Específicos .....</b>                                                                                                             | <b>26</b> |
| <b>3</b>   | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                            | <b>27</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Síntese dos candidatos a inibidores da enzima aldose redutase .....</b>                                                                     | <b>27</b> |
| 3.1.1      | Síntese das 6-aril-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carbonitrilas (4a-e) .....                                                      | 27        |
| 3.1.2      | Síntese dos Acetatos de 2-[(4-aril-5-ciano-6-oxo-1,6-diidropirimidin-2-il)tio]etila (6a-e) .....                                               | 29        |
| 3.1.3      | Síntese dos Ácidos 2-[(4-aril-5-ciano-6-oxo-1,6-diidropirimidin-2-il)tio]acéticos (8a-e) .....                                                 | 33        |
| 3.1.4      | Síntese dos ácidos 3-[(4-aril-5-ciano-6-oxo-1,6-diidropirimidin-2-il)tio]propanóicos (10a-e) .....                                             | 36        |
| 3.1.5      | Síntese das 2-[(2-hidróxietil)tio]-4-aril-6-oxo-1,6-diidropirimidina-5-carbonitrilas (12a-e) .....                                             | 39        |
| 3.1.6      | Hibridização molecular via Reação de Mitsunobu: síntese das 7-aril-5-oxo-2,3-diidro-5H- tiazolo[3,2-a]pirimidina-6-carbonitrilas (13a-e) ..... | 40        |
| <b>3.2</b> | <b>Ensaio in vitro para avaliação da inibição enzimática da aldose redutase (AR) .....</b>                                                     | <b>45</b> |
| <b>3.3</b> | <b><i>Docking</i> Molecular dos compostos na estrutura cristalográfica da AR .....</b>                                                         | <b>49</b> |
| <b>4</b>   | <b>METODOLOGIA .....</b>                                                                                                                       | <b>57</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Síntese dos candidatos a inibidores da enzima Aldose Redutase .....</b>                                                                     | <b>57</b> |
| 4.1.1      | Procedimentos gerais .....                                                                                                                     | 57        |

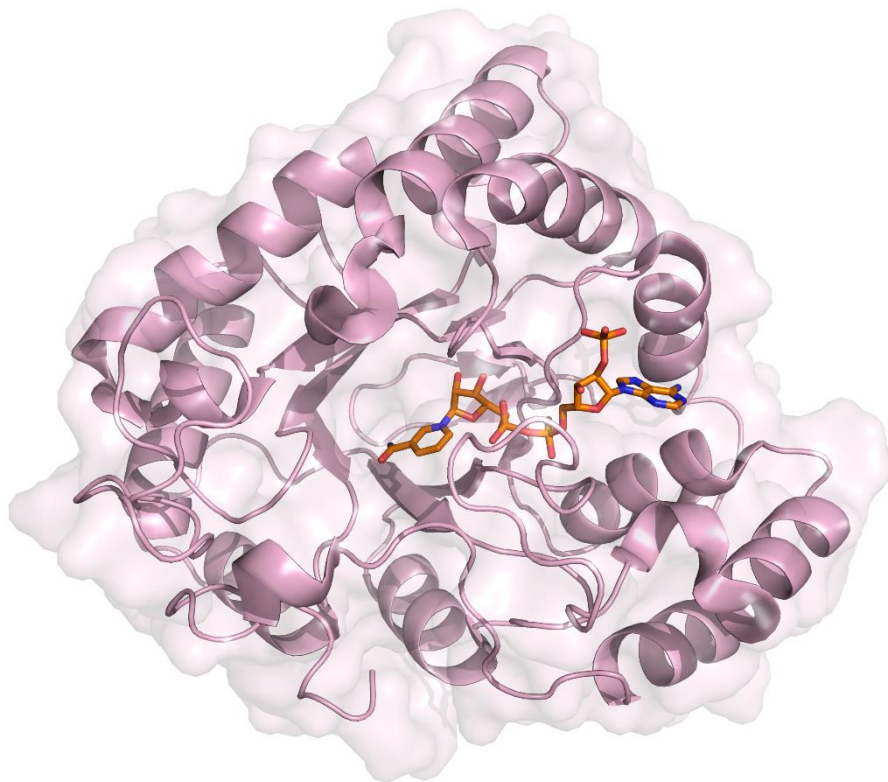
|       |                                                                                                      |    |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1.2 | Equipamentos e técnicas utilizadas .....                                                             | 57 |
| 4.1.3 | Síntese das 6-aryl-4-oxo-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-carbonitriles (4a-e) .....           | 57 |
| 4.1.4 | Síntese dos Acetatos de 2-[(4-aryl-5-ciano-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)thio]ethyl (6a-e) .....   | 58 |
| 4.1.5 | Síntese dos Ácidos 2-[(4-aryl-5-ciano-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)thio]acetic (8a-e) .....       | 59 |
| 4.1.6 | Síntese dos Ácidos 3-[(4-aryl-5-ciano-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)thio]propanoic (10a-e) .....   | 60 |
| 4.1.7 | Síntese das 2-[(2-hydroxyethyl)thio]-4-aryl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-carbonitriles (12a-e) ..... | 61 |
| 4.1.8 | Síntese das 7-Aryl-5-oxo-2,3-dihydro-5H-thiazolo[3,2-a]pyrimidin-6-carbonitriles (13a-e) .....       | 62 |
| 4.2   | <b>Ensaio in vitro para avaliação da inibição enzimática .....</b>                                   | 63 |
| 4.3   | <b>Docking Molecular dos compostos na estrutura cristalográfica da AR .....</b>                      | 66 |
| 5     | <b>CONCLUSÃO .....</b>                                                                               | 69 |
| 6     | <b>PERSPECTIVAS .....</b>                                                                            | 70 |
|       | <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                             | 72 |
|       | <b>APÊNDICE A – ESPECTROS DE RMN .....</b>                                                           | 77 |

## 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 A enzima Aldose Redutase (AR)

A aldose redutase (AR) (E.C. 1.1.1.21) (Figura 1) é uma enzima monomérica pertencente à superfamília das aldo-ceto redutases, e possui uma estrutura tridimensional associada a um barril, devido ao seu motivo estrutural do tipo  $\beta$ - $\alpha$ -barril (RAMANA, 2011). A função primária da AR é atuar na redução de glicose a sorbitol (HERS, 1956), que consiste no primeiro passo da via do poliol. Durante a conversão do substrato (aldeído) ao produto (álcool), a enzima necessita do seu cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), que participa como doador de hidreto, sofrendo então oxidação (BROWNLEE et al., 2016; KIRK, 1969; SINGH GREWAL et al., 2015).

**Figura 1.** Estrutura cristalográfica da enzima aldose redutase (rosa), seu cofator NADPH (carbonos em laranja), disponível no banco de dados de proteínas com o código PDB 3DN5.



Fonte: A autora (2020); extraído de EISENMANN et al., 2009;

A AR é uma enzima citosólica cuja principal função é catalisar a redução de aldeídos tóxicos produzidos por espécies reativas de oxigênio em álcoois não-reativos (BROWNLEE et

al., 2016). Além disso, a AR é uma enzima ubíqua; encontra-se presente em diversos órgãos, desempenhando funções que vão além da via do poliol e da desintoxicação de aldeídos, atuando no metabolismo de catecolaminas, esteróides, entre outros substratos (RAMANA, 2011; SINGH GREWAL et al., 2015). Muitos trabalhos comprovam que a ação da enzima AR em pacientes hiperglicêmicos está associada com as complicações causadas pelo diabetes (BROWNLEE et al., 2016; RAMANA, 2011; SINGH GREWAL et al., 2015; TANG; MARTIN; HWA, 2012). Mas, de que forma se dá o desenvolvimento dessas patologias diabéticas, e como podem ser tratadas ou ainda amenizadas?

## **1.2 Patologias relacionadas à enzima AR**

Nos mamíferos, a concentração de glicose considerada normal varia entre 3,8 e 6,1 mmol/L (TANG et al., 2012). Nestas condições, a glicose presente nas células é metabolizada na via glicolítica e posteriormente no ciclo de Krebs para produção de energia em forma de ATP (NELSON; COX, 2004). Apenas uma porcentagem residual de glicose, em torno de 3%, não participa da via glicolítica e, portanto, é metabolizada na via do poliol (MORRISON et al., 1970). Contudo, em situações de hiperglicemia, quando a concentração de glicose celular é maior que 7 mmol/L, há um aumento na demanda da via do poliol para consumir esta glicose residual. Estima-se que este aumento pode chegar a 30%, ou seja, uma quantidade dez vezes maior de glicose passa a ser metabolizada pela via do poliol no paciente hiperglicêmico em relação ao paciente normoglicêmico (RAMANA, 2011; TANG et al., 2012).

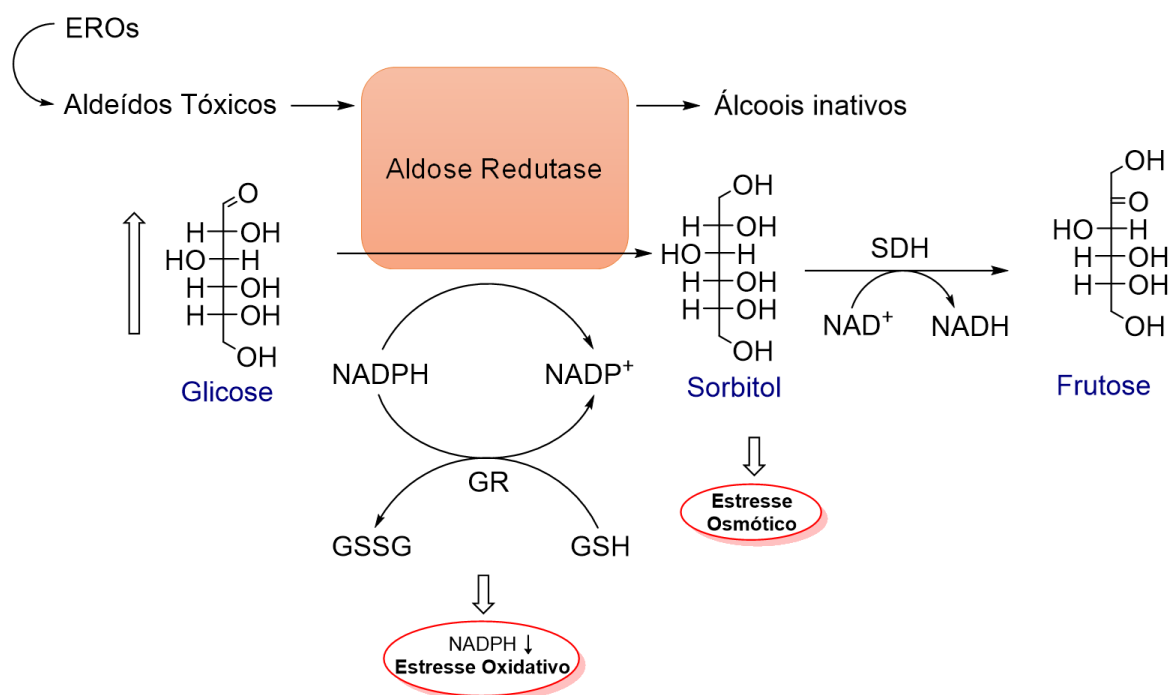
A via do poliol tem como principal função a conversão de glicose a frutose, e nesta via estão envolvidas as enzimas: aldose redutase (AR), responsável pela primeira parte da via do poliol, a redução de glicose a sorbitol; e a sorbitol desidrogenase (SDH), responsável pela segunda parte da via do poliol, em que há a oxidação do sorbitol à frutose (BROWNLEE et al., 2016; SINGH GREWAL et al., 2015) (Figura 2).

Durante a atividade da AR, a enzima utiliza em alta demanda o seu cofator NADPH. No entanto, o NADPH também é utilizado na produção de um importante agente antioxidante endógeno: a glutatona. Com isso, o uso em excesso do NADPH pela AR, resulta numa baixa disponibilidade de NADPH para outras enzimas, como a glutatona redutase (GR), resultando em um aumento do estresse oxidativo nas células (BROWNLEE et al., 2016; RAMANA, 2011; SINGH GREWAL et al., 2015).

Um outro problema causado pelo aumento da atividade da via do poliol é relacionado ao produto da primeira etapa, o sorbitol. O sorbitol, por ser um poliol, é altamente hidrofílico,

não se difundindo rapidamente pelas membranas celulares e se acumulando nos tecidos, o que provoca desequilíbrio iônico e leva ao estresse osmótico na célula (RAMANA, 2011; SINGH GREWAL et al., 2015). O acúmulo de sorbitol causado pelo aumento da atividade da AR na retina, nervos ciáticos e rins resulta em retinopatia, neuropatia e nefropatia, respectivamente, e essas condições estão quase sempre associadas ao diabetes (SINGH GREWAL et al., 2015).

**Figura 2.** Papel da AR na via do polioli e complicações relacionadas ao diabetes. A AR reduz aldeídos tóxicos produzidos por espécies reativas de oxigênio (EROs) em álcoois inativos. O excesso de glicose ativa a AR reduzi-la em sorbitol e o acúmulo de sorbitol leva ao estresse osmótico nas células. A diminuição dos níveis de NADPH aumenta o estresse oxidativo celular.



Fonte: A autora (2020); adaptada de: (BROWNLEE et al., 2016; SINGH GREWAL et al., 2015)

As complicações diabéticas ocorrem principalmente quando os níveis de açúcar não estão sendo controlados por um longo período. Com isso, lesões em vasos e nervos podem levar às seguintes condições:

- **Nefropatia diabética:** é a principal causa de mortalidade entre as complicações diabéticas, tanto nos pacientes com diabetes tipo 1, quanto em pacientes acometidos com o tipo 2 (BROWNLEE et al., 2016; SINGH GREWAL et al., 2015). Ocorre devido

a alterações nos vasos sanguíneos dos rins, o que leva à insuficiência renal, que pode ser detectada pela presença de proteína na urina do paciente e que pode progredir até completa paralisação do órgão (MURUSSI et al., 2003).

- **Neuropatia diabética:** é uma complicação que afeta os pacientes a longo prazo (BROWNLEE et al., 2016). É causada por alterações nos nervos que levam à perda de sensibilidade nos membros do corpo, como é o caso do pé diabético, caracterizado pela presença de feridas e perda de sensibilidade, podendo levar à amputação em casos mais graves (SACCO et al., 2007).
- **Retinopatia diabética:** é a complicação gerada por lesões nos microvasos da retina, que levam à turbidez na visão e, em casos mais graves, à completa cegueira (BOSCO et al., 2005; BROWNLEE et al., 2016).

### 1.3 Retinopatia diabética: terapêutica atual

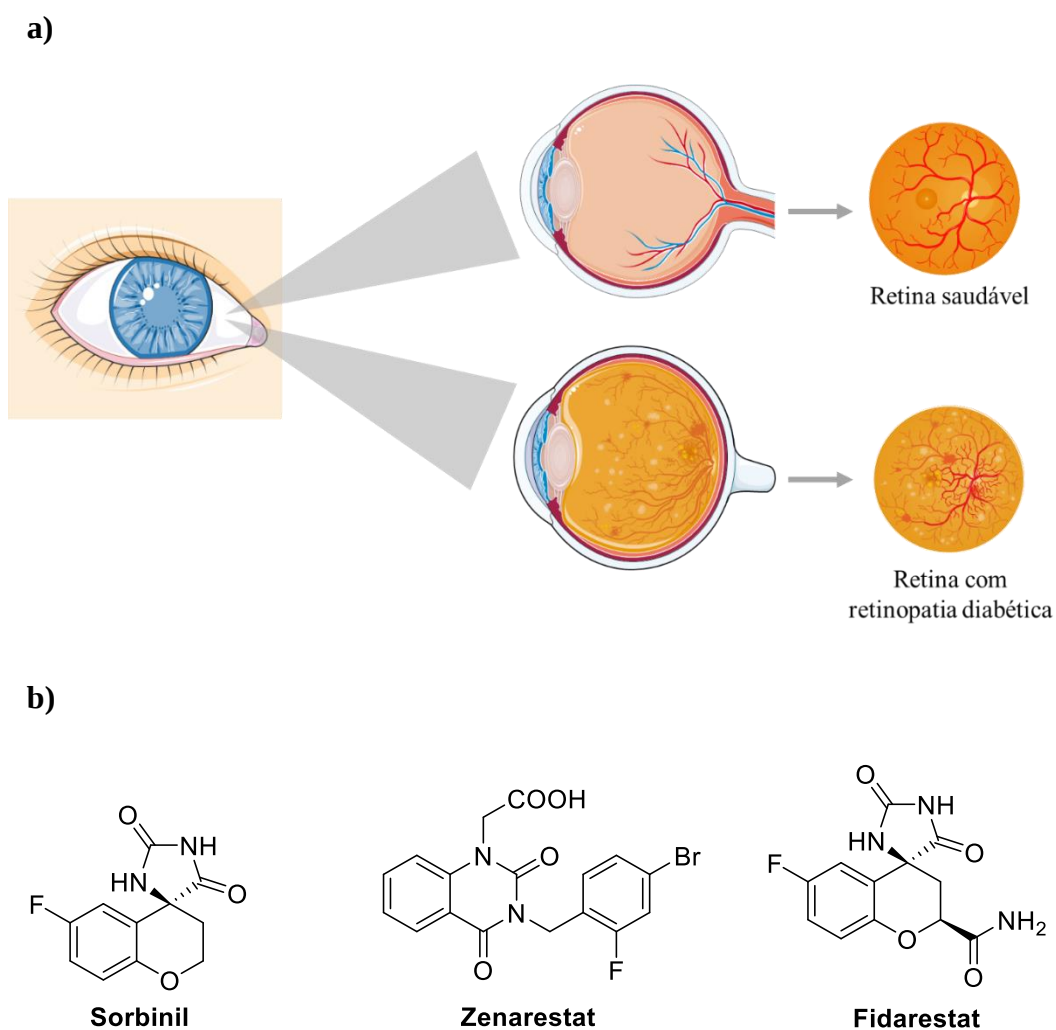
Dentre as complicações oculares ocasionadas pelo diabetes, a retinopatia diabética é uma das complicações microvasculares mais comuns, liderando os casos de perda de visão em adultos, tanto em países desenvolvidos, como em países em desenvolvimento (SINGH GREWAL et al., 2015), e podendo afetar cerca de 3 milhões de pessoas por ano (CHELONI et al., 2019).

A retinopatia diabética acomete o tecido da retina, membrana cuja principal função é a conversão da luz para formação das imagens. Todo o tecido da retina é irrigado por microvasos que podem ser lesionados quando o indivíduo está exposto a altos níveis de glicose no sangue por um longo período, sem que haja tratamento direto ou controle da hiperglicemia (BOSCO et al., 2005; BROWNLEE et al., 2016; SINGH GREWAL et al., 2015) (Figura 3a).

Para combater a retinopatia diabética, o tratamento consiste, principalmente, no controle dos níveis de açúcar na dieta e no uso de insulina ou medicamentos que diminuam os níveis de glicose no sangue, ou seja, através de medidas de controle da glicemia. Alguns medicamentos, contudo, podem ser utilizados com o propósito de prevenir a retinopatia *per se*, como é o caso do ácido acetil salicílico (BOSCO et al., 2005), de antioxidantes como a vitamina E (HAMMES et al., 1997), inibidores da AR (SINGH GREWAL et al., 2015), inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) (PRADHAN et al., 2002) e inibidores dos receptores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (NICHOLSON et al., 2010). Além disso, fotocoagulação e laserterapia também podem ser aplicados como tratamento para estágios mais graves, evitando a perda de visão (BOSCO et al., 2005).

Sorbinil (ROBISON et al., 1983), Zenarestat (SINGH GREWAL et al., 2015) e Fidarestat (KATO et al., 2003) (Figura 3b) são exemplos de inibidores da AR que apresentaram resultados promissores no combate à retinopatia diabética, mostrando a importância na busca e estudo de novos inibidores como forma de tratamento segura das condições relacionadas ao diabetes.

**Figura 3.** a) Comparação entre a retina de um olho saudável com a retina de um olho acometido por retinopatia diabética. b) estruturas dos inibidores da AR: sorbinil, zenarestat e fidarestat.



Fonte: A autora (2020)

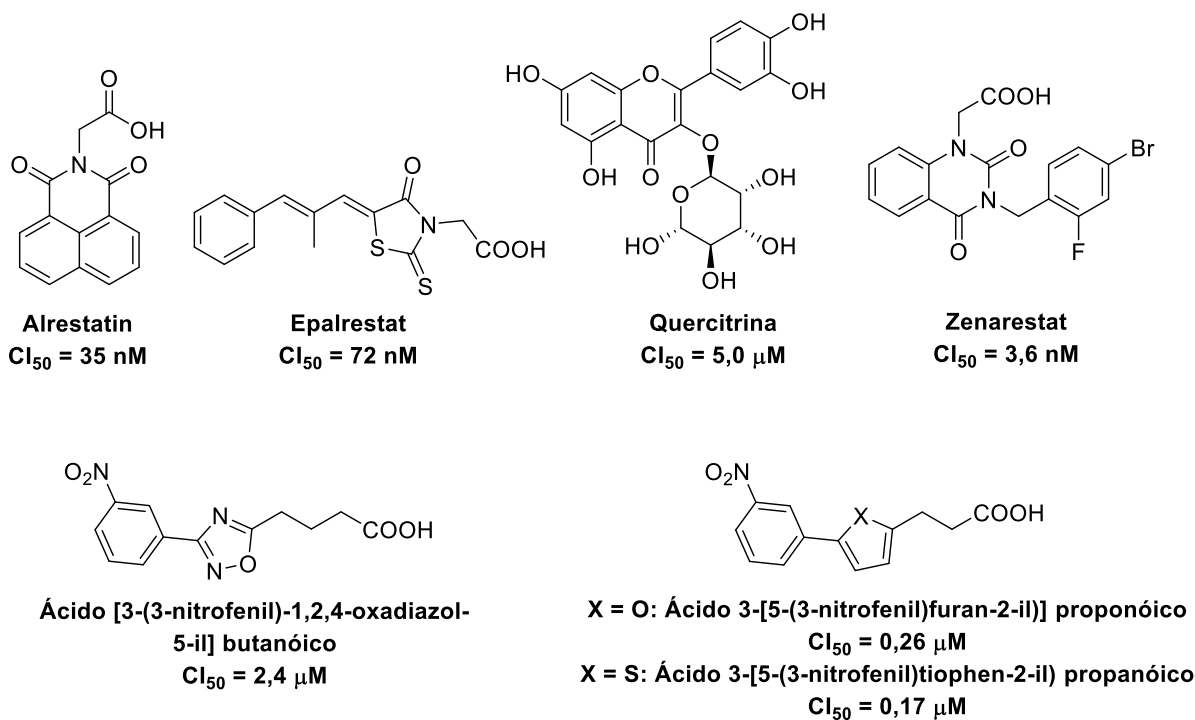
#### 1.4 Inibidores da aldose redutase

A ação da AR na via do poliol é vista como o gatilho para as complicações diabéticas; desta forma, inibidores da enzima AR atuam revertendo o estresse osmótico e oxidativo ocasionado pelo aumento da ativação da via do poliol, e com isso se apresentam como via de tratamento para essas patologias (SINGH GREWAL et al., 2015).

O trabalho de revisão de Singh Grewal e colaboradores relata o avanço no desenvolvimento dos inibidores da AR. Os inibidores da AR possuem ampla diversidade estrutural, a saber: derivados de ácido carboxílico, imidas cíclicas, derivados de ésteres, derivados de pirimidinonas, entre outros. (SINGH GREWAL et al., 2015). Um dos primeiros inibidores a ser desenvolvido foi o Alrestatin (Figura 4), relatado primeiramente em 1979 por Gabbay e colaboradores (GABBAY et al., 1979). Embora tenha apresentado resultados promissores na inibição da AR e combate à catarata, os ensaios clínicos relataram hepatotoxicidade e seu uso foi interrompido (SINGH GREWAL et al., 2015).

Muitas moléculas continuaram a ser desenvolvidas para a inibição da AR, a maioria delas apresentando em sua estrutura porções derivadas de ácido carboxílico. Além disso, compostos contendo heterociclos são bastante encontrados nas estruturas de inibidores, como é o caso de compostos naturais como os flavonóides (VARMA et al., 1976) e compostos contendo anéis de oxadiazóis (KRAEMER et al., 2004), pirimidinonas (OGAWVA et al., 1993a), furano (EISENMANN et al., 2009), tiofeno (EISENMANN et al., 2009), entre outros (ver Figura 4).

**Figura 4.** Exemplos de inibidores da AR.



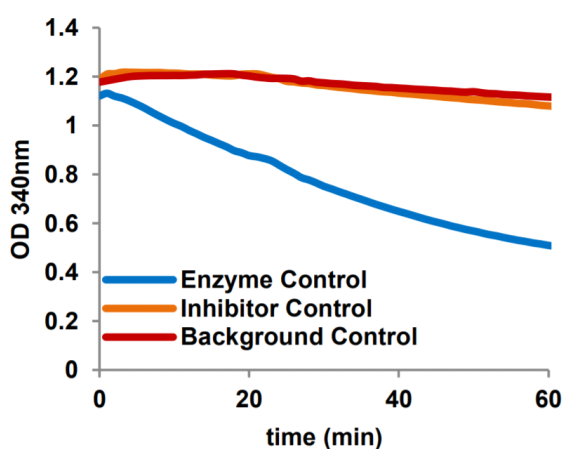
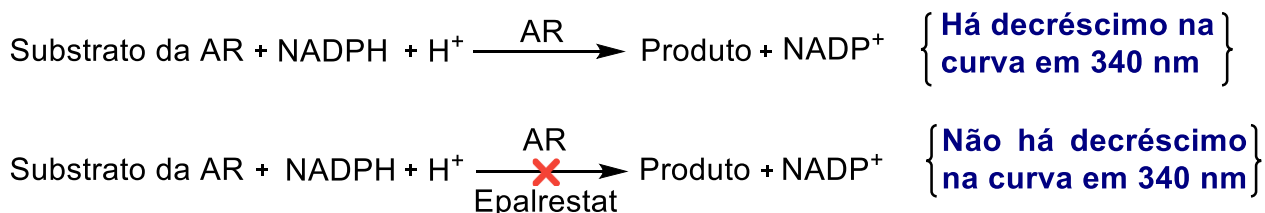
Fonte: A autora (2020) adaptado de (EISENMANN et al., 2009; SINGH GREWAL et al., 2015)

Muitas dessas moléculas relatadas levaram a resultados promissores em testes, como é o caso do Epalrestat (RAMIREZ et al., 2008; SINGH GREWAL et al., 2015). Utilizado

principalmente para o tratamento de neuropatia diabética no Japão, China e Índia, os estudos mostram que o Epalrestat atua diminuindo o acúmulo de sorbitol nos nervos ciáticos e tecidos oculares. Porém, seu uso leva ao surgimento de alguns efeitos colaterais que incluem o aumento dos níveis de enzimas hepáticas e eventos gastrointestinais como náuseas e vômitos (RAMIREZ et al., 2008).

Para muitos desses compostos, principalmente os mais antigos, os estudos de inibição da AR eram realizados por metodologia *in vivo* (experimento conduzido em organismo vivo), como é o caso do Alrestatin (GABBAY et al., 1979), Epalrestat (RAMIREZ et al., 2008) e alguns flavonóides como a Quercitrina (VARMA et al., 1976). No caso do Alrestatin, os testes foram realizados em pacientes diabéticos voluntários (GABBAY et al., 1979), e no caso do Epalrestat e flavonóides, os testes foram realizados em ratos (RAMIREZ et al., 2008; VARMA; KINOSHITA, 1976). Os ensaios *in vitro* (experimento conduzido fora de organismo vivo) são realizados principalmente através de método colorimétrico que se baseia no fato da AR catalisar a redução de aldeídos utilizando o cofator NADPH acompanhada de uma diminuição na absorbância a 340 nm (EISENMANN et al., 2009; KRAEMER et al., 2004). Desse modo, em condições de atuação normal da AR, um decréscimo é observado na curva de absorção a 340 nm (linha azul), e para situações em que a AR está em complexo com o seu inibidor, não se observa decréscimo na curva (linha laranja) (Figura 5).

**Figura 5.** Reação genérica de atuação da AR sem inibidor e com o inibidor Epalrestat, e as curvas de controles positivo (com inibidor, linha laranja) e negativo (sem inibidor, linha azul) obtidas em ensaios *in vitro*.



Fonte: extraído de manual do kit colorimétrico da BioVision Incorporated (Milpitas, CA, N° K174-100)  
([www.biovision.com](http://www.biovision.com))

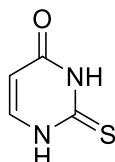
Como muitos desses compostos não avançaram em estudos clínicos e outros, mesmo avançando, ainda apresentam efeitos colaterais indesejáveis, além de muitos não apresentarem seletividade exclusiva para a aldose redutase (E.C. 1.1.1.21) e ligar-se a outras enzimas da superfamília das aldo-ceto redutases como é o caso da aldeído redutase (E.C. 1.1.1.2)(LA MOTTA et al., 2007), com isso, a busca por novos compostos, e sobretudo estudos que comprovem sua eficácia e segurança a curto e longo prazo, são de grande interesse como estratégia no combate às complicações diabéticas.

## 1.5 Pirimidinonas

Compostos contendo heterociclos pirimidínicos e seus derivados oxigenados são amplamente relatados devido aos seus diferentes papéis biológicos e terapêuticos, como em compostos antivirais (JIN et al., 2018), antimicrobianos (MADHU SEKHAR et al., 2018; MOHAMED et al., 2013), anti-inflamatórios (BORIK et al., 2018), antioxidantes (MOHAMED

et al., 2013) e anticancer (AHMED et al., 2019). Além destes, também já foram estudados candidatos a inibidores da AR contendo anéis pirimidínicos (LA MOTTA et al., 2007; OGAWA et al., 1993). De forma particular neste trabalho, serão investigados derivados das 2-tiopirimidin-4-onas, que possuem semelhança estrutural com o anel da tiouracila (Figura 6).

**Figura 6.** Estrutura da 2-tiouracila



Fonte: a autora (2020)

O heterociclo pirimidinônico pode ser sintetizado através de diversas metodologias (BROWN, 1984). Geralmente, para a preparação do anel, um intermediário de Michael e uma molécula dotada de uma porção “urônio” (derivados da uréia) são condensados em meio básico. Esta reação resulta em um derivado alicíclico que pode ser convertido no anel da pirimidina ou no seu derivado oxigenado, a pirimidinona (KAPPE, 2000). Esta reação pode ser realizada via síntese multicomponente (MCRs) (DE ANDRADE et al., 2017), que consiste em um procedimento em que três ou mais reagentes são misturados entre si para se obter um produto, levando a melhores rendimentos globais e menores tempos de reação (UGI; DÖMLING; HÖRL, 1994).

## 1.6 Uso de simulações computacionais na descoberta de novos candidatos a fármacos

A integração de estratégias computacionais com as experimentos é de grande interesse no desenvolvimento e estudos de novos candidatos a fármacos (MENG et al., 2011). As simulações computacionais são amplamente utilizadas no planejamento de novos medicamentos, pois oferecem a possibilidade de explorar as conformações que uma determinada molécula ou ligante pode adotar perante um alvo macromolecular. Dessa forma, a junção de técnicas *in silico* (experimento conduzido em âmbito computacional através de simulações) aos métodos experimentais (*in vitro*, *in vivo*) fornece um melhor entendimento de aspectos em um nível molecular (FERREIRA et al., 2015).

O *docking molecular* (DM) é uma das ferramentas computacionais mais utilizadas no design e estudo de novos compostos candidatos a fármacos (MORRIS; LIM-WILBY, 2008). O DM tem como principal função avaliar como as pequenas moléculas (ligantes) interagem no

sítio ativo de macromoléculas, como é o caso de proteínas e enzimas. Através do DM pode-se avaliar os modos de ligação, as interações intermoleculares que estabilizam o complexo ligante-receptor, e ainda prever por meio de cálculos computacionais as energias livres de ligação, sendo possível comparar e categorizar a afinidade de um determinado ligante a um receptor (FERREIRA et al., 2015; MENG et al., 2011; MORRIS; LIM-WILBY, 2008).

Os programas de DM executam duas tarefas principais na busca das conformações de ligação mais prováveis:

1. Explorar um grande espaço na macromolécula buscando os modos de ligação mais prováveis.
2. Estimar a energia de interação em cada conformação predita.

Estes processos são realizados de forma cíclica através de funções específicas, até convergirem a uma solução de mínima energia (FERREIRA et al., 2015).

No passo em que se faz a busca conformacional, a molécula é submetida a mudanças nos parâmetros estruturais como torção, rotação e translação. Os algoritmos de pesquisa atuam aplicando métodos sistemáticos e estocásticos (AGRAFIOTIS et al., 2007; YURIEV et al., 2011). O método de pesquisa sistemático atua variando gradualmente a conformação dos ligantes, enquanto o algoritmo avalia o cenário energético para cada conformação até chegar ao valor mínimo, que normalmente corresponde ao local mais provável de ligação. Uma desvantagem deste método é que, muitas vezes, ele pode levar a solução de um mínimo local ao invés de um mínimo global (FERREIRA et al., 2015).

O método de pesquisa estocástico, por outro lado, atua modificando a estrutura do ligante de forma aleatória, de modo que o algoritmo gere conjuntos de conformações moleculares e preencha uma ampla faixa energética. Essa estratégia evita que o resultado caia em um mínimo local e aumenta-se a probabilidade de se encontrar o mínimo global (GORELIK et al., 2007). Exemplos bem conhecidos do método de busca estocástico são os: algoritmo genético (AG) (FERREIRA et al., 2015) e o algoritmo genético Lamarckiano (AGL) (GORELIK et al., 2007), usado comumente em programas como o AutoDock (MORRIS et al., 1996; MORRIS et al., 2008) e Gold (JONES et al., 1997), que estão entre os *softwares* de DM mais utilizados (SOUSA et al., 2006).

No algoritmo genético aplicam-se conceitos da teoria da evolução e seleção natural, tratando cada parâmetro estrutural do ligante como um cromossomo. A população inicial de cromossomos (gerados pelo algoritmo de pesquisa aleatória) é avaliada e os cromossomos mais adaptados, que obtiveram os menores valores de energia, são escolhidos como base para gerar a próxima população. Seguindo este princípio de busca, a energia média do conjunto diminui,

e uma população transmite as características mais favoráveis para a população seguinte (FERREIRA et al., 2015; JONES et al., 1997; MORRIS et al., 1996).

No quesito que trata sobre precisar a energia de ligação para cada conformação prevista, os programas utilizam funções que avaliam a energia de interação do complexo ligante-receptor, baseadas nas constantes de ligação e energia livre de Gibbs (FERREIRA et al., 2015). Isso se dá através do estudo de fenômenos físico-químicos envolvidos no processo de interação, tais como: interações intermoleculares, efeitos entrópicos e dessolvatação (HUANG et al., 2010). Quanto mais variáveis estejam sendo avaliadas pelas funções, maior a precisão dos valores de energia encontrados, contudo, o custo computacional aumenta proporcionalmente (FERREIRA et al., 2015).

Neste cenário, procurou-se integrar o método *in vitro*, baseado no ensaio colorimétrico, aos meios *in silico* como a simulação computacional de *docking molecular*, com objetivo de desenvolver novos protótipos de inibidores para a enzima aldose redutase.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver novas moléculas derivadas das 2-tiopirimidin-4-onas e investigar por métodos *in vitro* e *in silico* o potencial de inibição dos candidatos perante a enzima aldose redutase (AR).

### 2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar candidatos a inibidores da aldose redutase por meio da funcionalização de derivados das 2-tiopirimidin-4-onas com agrupamentos ácido e éster.
- Sintetizar tiazolidinas condensadas ao anel da 2-tiopirimidin-4-ona via reação de Mitsunobu.
- Realizar testes *in vitro* para avaliar o potencial de inibição dos compostos em relação à AR.
- Realizar simulações de *docking molecular* para avaliar os modos de ligação dos compostos sintetizados perante a AR e auxiliar na descoberta de novos candidatos a fármacos.

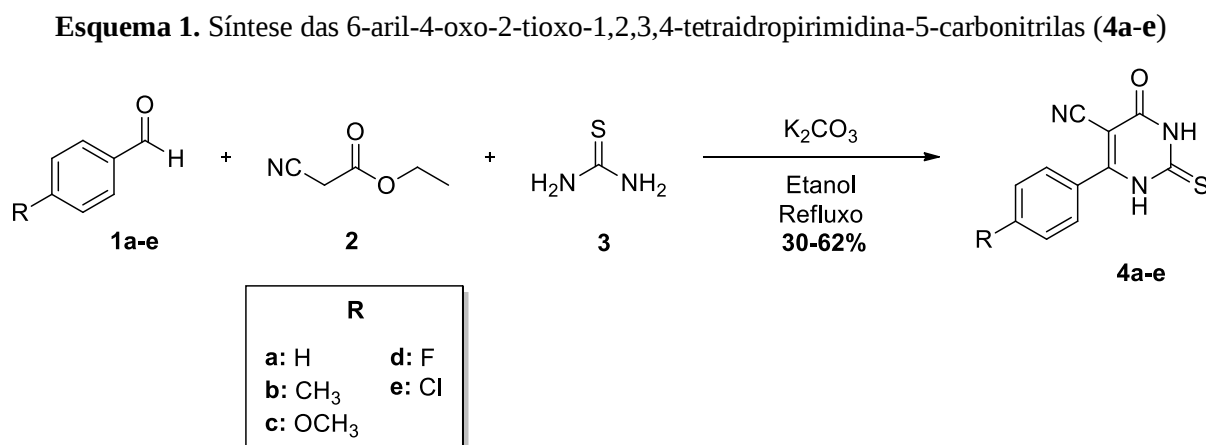
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Síntese dos candidatos a inibidores da enzima aldose redutase

Foram desenvolvidos 20 candidatos a inibidores da AR, por meio de diferentes funcionalizações no anel das 2-tiopirimidin-4-onas. A inibição dos compostos perante a AR foi avaliada através do estudo colorimétrico *in vitro* e por simulações computacionais de Docking Molecular.

##### 3.1.1 Síntese das 6-aryl-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carbonitrilas (4a-e)

Na síntese das 6-aryl-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carbonitrilas optou-se por uma via multicomponente, em que três ou mais reagentes são unidos para formação de um único produto (UGI; DÖMLING; HÖRL, 1994) Para isso, foram utilizados diferentes aldeídos aromáticos (**1a-e**), cianoacetato de etila (**2**) e tiouréia (**3**) em meio alcalino sob refluxo. (Esquema 1)



Fonte: A autora (2020)

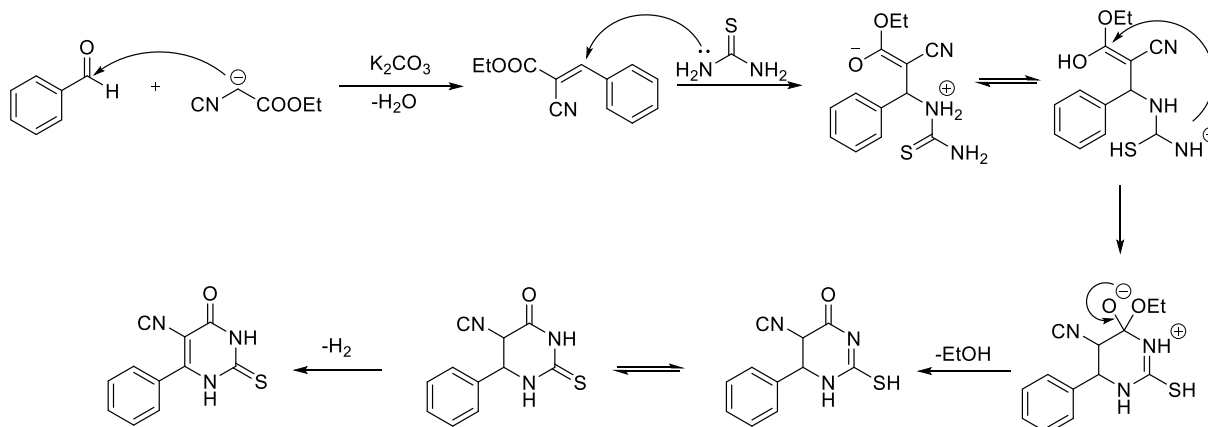
Os cinco produtos (**4a-e**) obtidos a partir desta reação apresentaram rendimentos entre 30-62% e seus respectivos pontos de fusão foram comparados aos da literatura (Tabela 1).

**Tabela 1.** Dados experimentais para os compostos da série **4a-e**.

| Composto  | Rendimento (%) | P.F. (°C) | P.F. lit. (°C)       | Solvente de recristalização |
|-----------|----------------|-----------|----------------------|-----------------------------|
| <b>4a</b> | 56             | 295-298   | 296-298 <sup>a</sup> | DMF/Metanol/Gelo            |
| <b>4b</b> | 48             | 293-296   | 290-291 <sup>b</sup> | DMF/Metanol/Gelo            |
| <b>4c</b> | 50             | 253-256   | 260-261 <sup>c</sup> | DMF/Metanol/Gelo            |
| <b>4d</b> | 62             | 267-270   | 270-272 <sup>d</sup> | DMF/Metanol/Gelo            |
| <b>4e</b> | 30             | 247-250   | 260-262 <sup>c</sup> | DMF/Metanol/Gelo            |

Fonte: A autora (2020); <sup>a</sup>: (RAMIZ et al., 2011) <sup>b</sup>: (KAMBE et al., 1979b) <sup>c</sup>: (JADHAV et al., 2019) <sup>d</sup>: (CHITRE et al., 2011)

O mecanismo da reação multicomponente para formação do anel pirimidínico é descrito por de Andrade e colaboradores (DE ANDRADE et al., 2017), em que a síntese tem seu início através de uma reação de Knoevenagel entre o composto metileno-ativo (cianoacetato de etila) e o respectivo aldeído para a formação do intermediário de Michael (Esquema 2). Esta etapa é mediada por base e há perda de água no processo. Na sequência, o intermediário de Michael reage com a tiouréia, levando à formação de um novo intermediário contendo a porção urônio. Ocorre então o ataque intramolecular do par de elétrons do nitrogênio fechando assim o anel; neste processo há perda de etanol. Por fim, o último passo envolve a oxidação da pirimidina, promovida pelo oxigênio atmosférico (XAVIER et al., 2013).

**Esquema 2.** Mecanismo proposto para formação das 2-tiopirimidin-4-onas.

Fonte: A autora (2020) extraído de (DE ANDRADE et al., 2017)

### 3.1.2 Síntese dos Acetatos de 2-[(4-aril-5-ciano-6-oxo-1,6-diidropirimidin-2-il)tio]etila (6a-e)

Para funcionalização das 2-tiopirimidin-4-onas com a porção acetato de etila, foi necessário realizar uma série de testes buscando a melhor estratégia de síntese. Para isso, foram testadas diferentes bases e solventes (Tabela 2). A estratégia em que se observou a formação exclusiva do produto de interesse e a melhor forma de tratamento e purificação, foi a rota sintética utilizando trietilamina como base e acetona como solvente, em temperatura ambiente (Tabela 2, entrada 2). Esse método de síntese foi replicado para a funcionalização nas outras séries com a porção ácido acético (**8a-e**) e com a porção ácido propiônico (**10a-e**), e também se demonstrou eficaz para a funcionalização com outros agentes alquilantes.

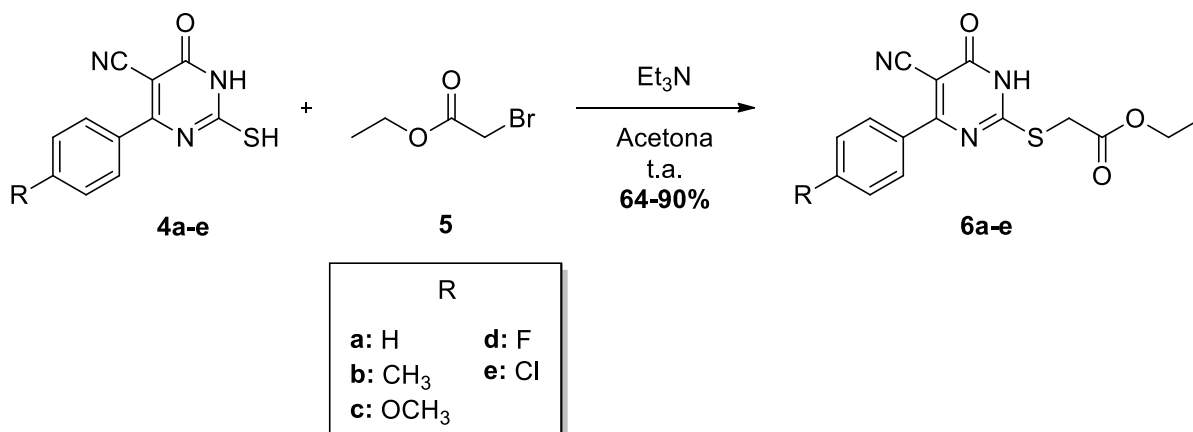
**Tabela 2.** Condições sintéticas testadas para funcionalização das 2-tiopirimidin-4-onas, monitorando a formação ou não do produto.

| Entrada | Base                           | Solvente | Condições | Rendimento (%) |
|---------|--------------------------------|----------|-----------|----------------|
| 1       | K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | DMF      | t.a.      | *              |
| 2       | Et <sub>3</sub> N              | Acetona  | t.a.      | 55             |
| 3       | Piridina                       | Piridina | t.a.      | 45             |
| 4       | AcONa                          | Etanol   | t.a.      | *              |

Fonte: A autora (2020)

\*Por causa da observação de muitos subprodutos na CCD, não foi realizada a purificação e isolamento do produto.

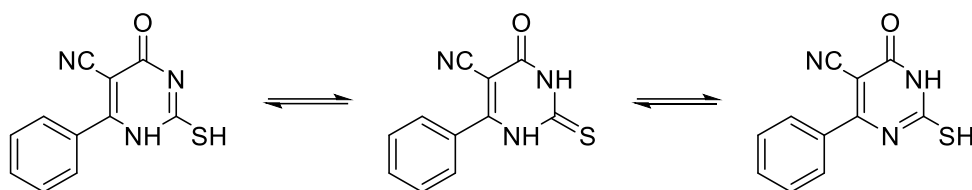
A reação com o bromoacetato de etila gerou cinco produtos alquilados exclusivamente no átomo de enxofre das 2-tiopirimidin-4-onas (Esquema 3). Embora a forma tiol não seja a predominante no equilíbrio, esta reação torna-se possível devido ao equilíbrio tautomérico tiol/tiona que ocorre nas 2-tiopirimidin-4-onas, semelhante ao equilíbrio ceto/enol (ALLEGRETTI et al., 2004).

**Esquema 3.** Síntese dos acetatos de 2-[(4-aryl-5-ciano-6-oxo-1,6-diidropirimidin-2-il)tio]etila.

Fonte: A autora (2020)

As 2-tiopirimidin-4-onas apresentam um equilíbrio tautomérico entre a forma tiol (-C-SH) e a forma tiona (-C=S), e isto ocorre devido à mobilidade do próton na porção urônio (Esquema 4). Martos-Calvente e colaboradores mostraram que o equilíbrio pode ser perturbado favorecendo um tautômero a outro, e pode ser afetado por diversos fatores, entre eles: estado físico em que se encontra a pirimidinona, solvente, temperatura, pH e concentração (MARTOS-CALVENTE et al., 2003). Diversas técnicas como IV, RMN e UV-vis já comprovaram este tipo de tautomerismo. Sabe-se que em estado sólido a forma tiona é preferível, e em fase líquida o solvente desempenha papel importante na formação dos tautômeros tiol e tiona. Solventes com alta constante dielétrica favorecem a forma tiona enquanto que solventes com baixa constante dielétrica favorecem a forma tiol. Outro estudo reforça este último dado, mostrando que solventes polares (normalmente com altas constantes dielétricas) favorecem a estabilidade da forma tiona e solventes apolares (frequentemente com baixas constantes dielétricas) favorecem a estabilidade da forma tiol (ABD EL-FATAH et al., 2017).

Um outro fato registrado por Abd El-Fatah e colaboradores mostra que a preferência de ataque nucleofílico no equilíbrio prevalece na região do enxofre em detrimento as regiões dos nitrogênios (ABD EL-FATAH et al., 2017). O enxofre é um átomo maior do que o nitrogênio e consequentemente mais polarizável, e portanto, possui natureza mole, enquanto o nitrogênio possui uma natureza dura (PEARSON, 1963). Por todos esses fatores, espera-se que as alquilações em 2-tiopirimidin-4-onas ocorram preferencialmente no átomo de enxofre, como relatado nos resultados obtidos.

**Esquema 4.** Equilíbrio tautomérico das 2-tiopirimidin-4-onas.

Fonte: A autora (2020)

As 2-tiopirimidin-4-onas sintetizadas apresentaram faixa de rendimento entre 64-90% e seus pontos de fusão foram obtidos e comparados aos disponíveis na literatura (Tabela 3).

**Tabela 3.** Dados experimentais dos compostos **6a-e**.

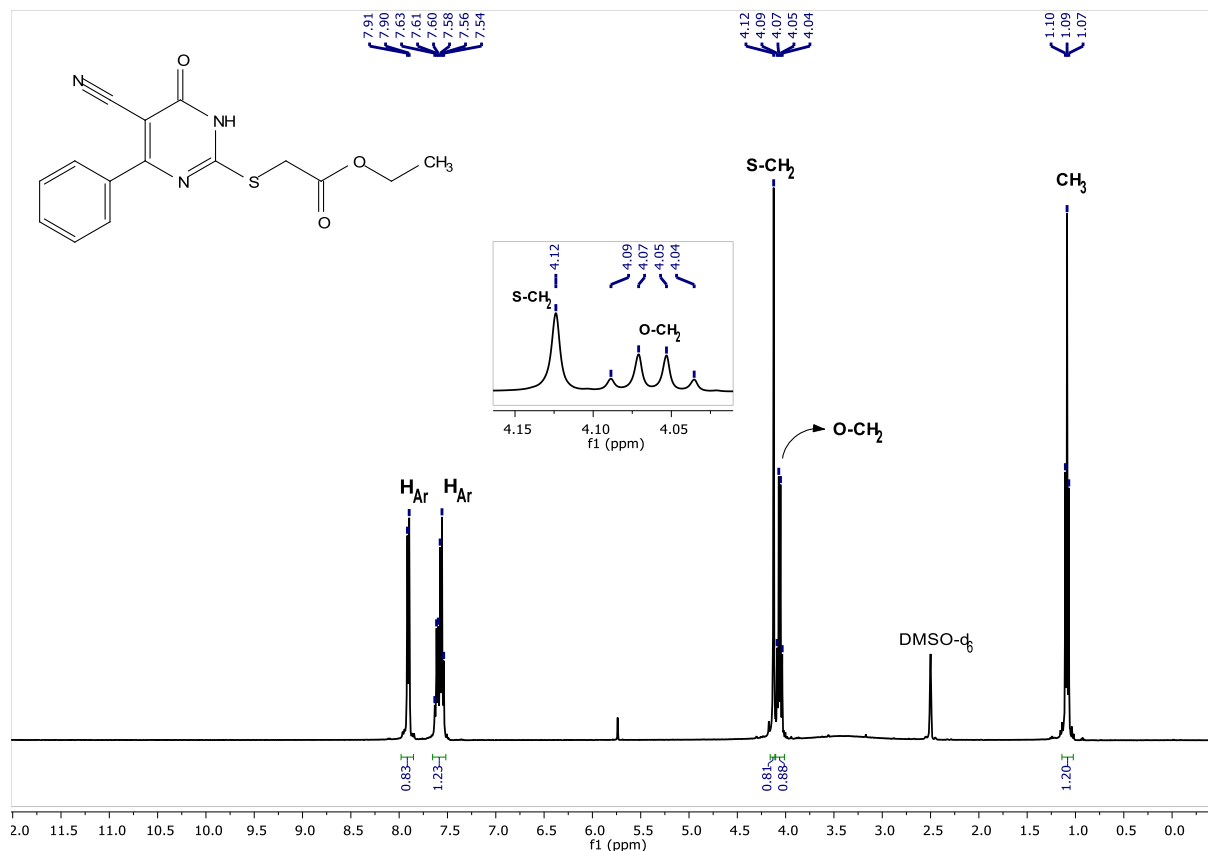
| Composto  | Rendimento (%) | P.F. (°C) | P.F. lit. (°C)   | Solvente de recristalização |
|-----------|----------------|-----------|------------------|-----------------------------|
| <b>6a</b> | 80             | 232-234   | 240 <sup>a</sup> | Acetona/Hexano              |
| <b>6b</b> | 90             | 230 (dec) | 215 <sup>a</sup> | Acetona/Hexano              |
| <b>6c</b> | 83             | 194-196   | 200 <sup>a</sup> | Acetona/Hexano              |
| <b>6d</b> | 70             | 228-230   | Não relatado     | Acetona/Hexano              |
| <b>6e</b> | 64             | 215 (dec) | 180 <sup>b</sup> | Acetona/Hexano              |

Fonte: A autora (2020) <sup>a</sup>:(KHALIL; HAFEZ; AHMED, 1989) <sup>b</sup>:(GALAL et al., 2018)

Para todos os 5 compostos sintetizados nesta série, foram adquiridos os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. Os espectros apresentados e discutidos a seguir para o composto **6a** podem ser extrapolados para os demais compostos desta série, disponíveis no apêndice.

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H para a substância **6a**, observa-se um tripleto em 1,09 ppm, e um quarteto em 4,06 ppm pertencentes aos hidrogênios da porção terminal etila do éster, ambos possuem constantes de acoplamento  $J = 7,1$  Hz (Figura 7). Em 4,12 ppm, encontra-se o simpleto referente aos dois hidrogênios metilênicos próximos ao enxofre. Por fim, na região entre 7,54 – 7,91 ppm, encontram-se os multipletos referentes ao anel aromático.

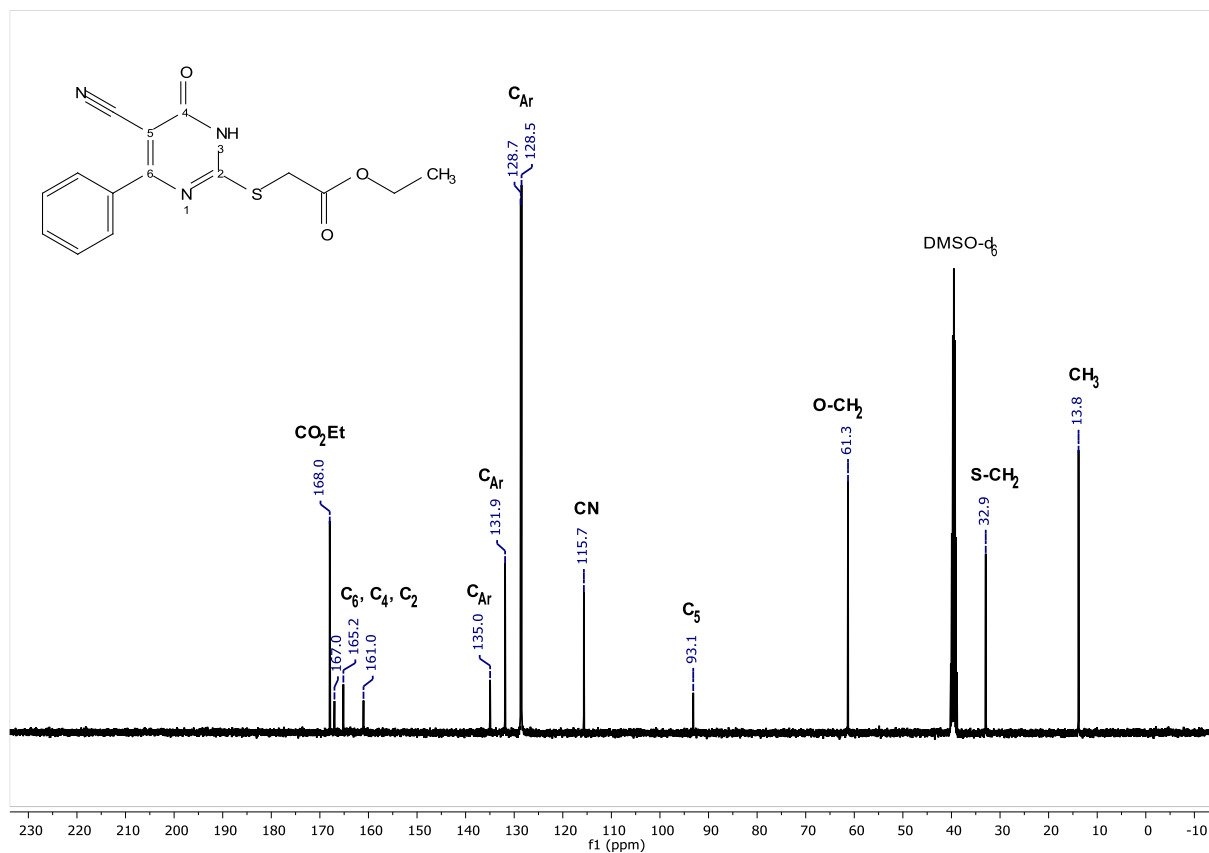
**Figura 7.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) de **6a**



Fonte: A autora (2020)

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para o composto **6a** (Figura 8) encontram-se mais informações do anel pirimidínico em comparação ao RMN de  $^1\text{H}$ . O pico em 13,8 ppm é referente ao carbono do grupo metila ao final da cadeia alifática. Em 32,9 e 61,3 ppm, encontram-se os sinais referentes aos carbonos metilênicos da cadeia alifática, ligados diretamente ao enxofre e ao oxigênio, respectivamente. Os picos em 93,1 e 115,7 ppm são referentes ao carbono  $\text{C}_5$  do anel pirimidínico e ao carbono da nitrila, respectivamente. Na região entre 128,5 a 135,0 ppm observam-se quatro picos relacionados aos seis carbonos do anel aromático, em que dois dos picos apresentam maior intensidade, pois, estão atribuídos a dois carbonos cada. Os picos em 161,0; 165,2; 167,0 ppm são relativos aos demais carbonos do anel pirimidínico  $\text{C}_2$ ,  $\text{C}_4$  e  $\text{C}_6$  e, por fim, em 168,0 ppm observa-se o pico referente a carbonila do éster.

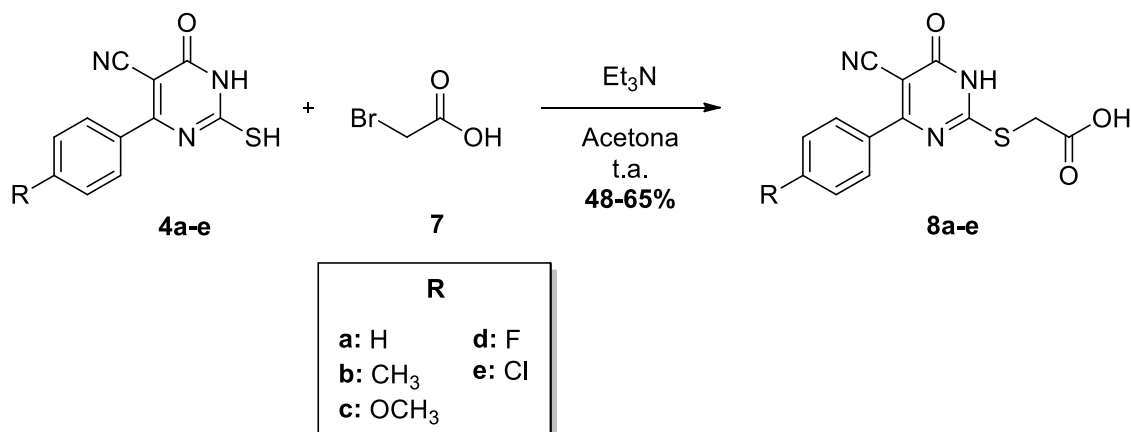
**Figura 8.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 101 MHz) de **6a**.



Fonte: A autora (2020)

### 3.1.3 Síntese dos Ácidos 2-[(4-aryl-5-ciano-6-oxo-1,6-diidropirimidin-2-il)tio]acéticos (**8a-e**)

A funcionalização das 2-tiopirimidin-4-onas com o ácido bromoacético, seguiu a rota sintética utilizando a trietilamina como base e acetona como solvente, com procedimento de preparação a análoga à série **6a-e**. (Esquema 5)

**Esquema 5.** Síntese dos ácidos 2-[(4-*aril*-5-ciano-6-oxo-1,6-diidropirimidin-2-il)tio]acéticos.

Fonte: A autora (2020)

Os cinco produtos (**8a-e**) sintetizados apresentaram faixa de rendimento entre 48-65% e seus pontos de fusão foram obtidos e comparados aos disponíveis na literatura (Tabela 4).

**Tabela 4.** Dados experimentais dos compostos **8a-e**.

| Composto  | Rendimento (%) | P.F. (°C) | P.F. lit. (°C)       | Solvente de recristalização |
|-----------|----------------|-----------|----------------------|-----------------------------|
| <b>8a</b> | 52             | 218-220   | 218 <sup>a</sup>     | Metanol/Gelo                |
| <b>8b</b> | 60             | 228-230   | Inédito              | Metanol/Gelo                |
| <b>8c</b> | 48             | 197-200   | 208-210 <sup>b</sup> | Metanol/Gelo                |
| <b>8d</b> | 60             | 202-205   | Inédito              | Metanol/Gelo                |
| <b>8e</b> | 65             | 230 (dec) | Inédito              | Metanol/Gelo                |

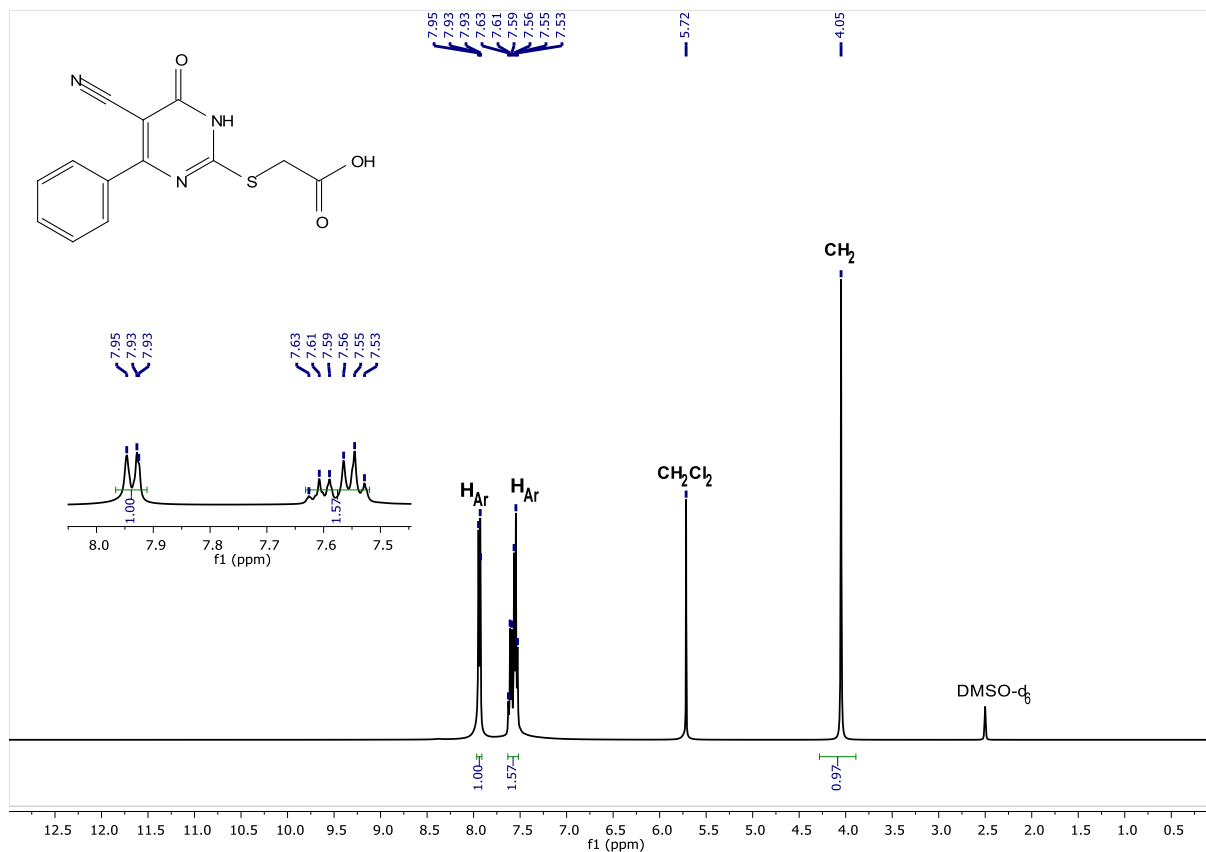
Fonte: A autora (2020); <sup>a</sup>: (HUSSAIN et al., 1987) <sup>b</sup>: (ABDEL-MEGID, et al., 2009)

Para todos os 5 compostos sintetizados nesta série, foram feitos os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, em que os espectros apresentados e discutidos a seguir para o composto **8a** podem ser extrapolados para os demais compostos da série, disponíveis no apêndice.

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H para a substância **8a**, observam-se ao todo três picos referentes a amostra (Figura 9). Um simpleto em 4,05 ppm referente aos hidrogênios do carbono metilênico, e os picos referentes aos hidrogênios aromáticos na região entre 7,53 – 7,95 ppm. Em 5,72 ppm apresenta-se um sinal extra referente a contaminação do solvente em que foi feita a análise, com diclorometano, sendo também possível observar um pico no espectro de RMN

de  $^{13}\text{C}$  no mesmo deslocamento do carbono do diclorometano (GOTTLIEB; KOTLYAR; NUDELMAN, 1997).

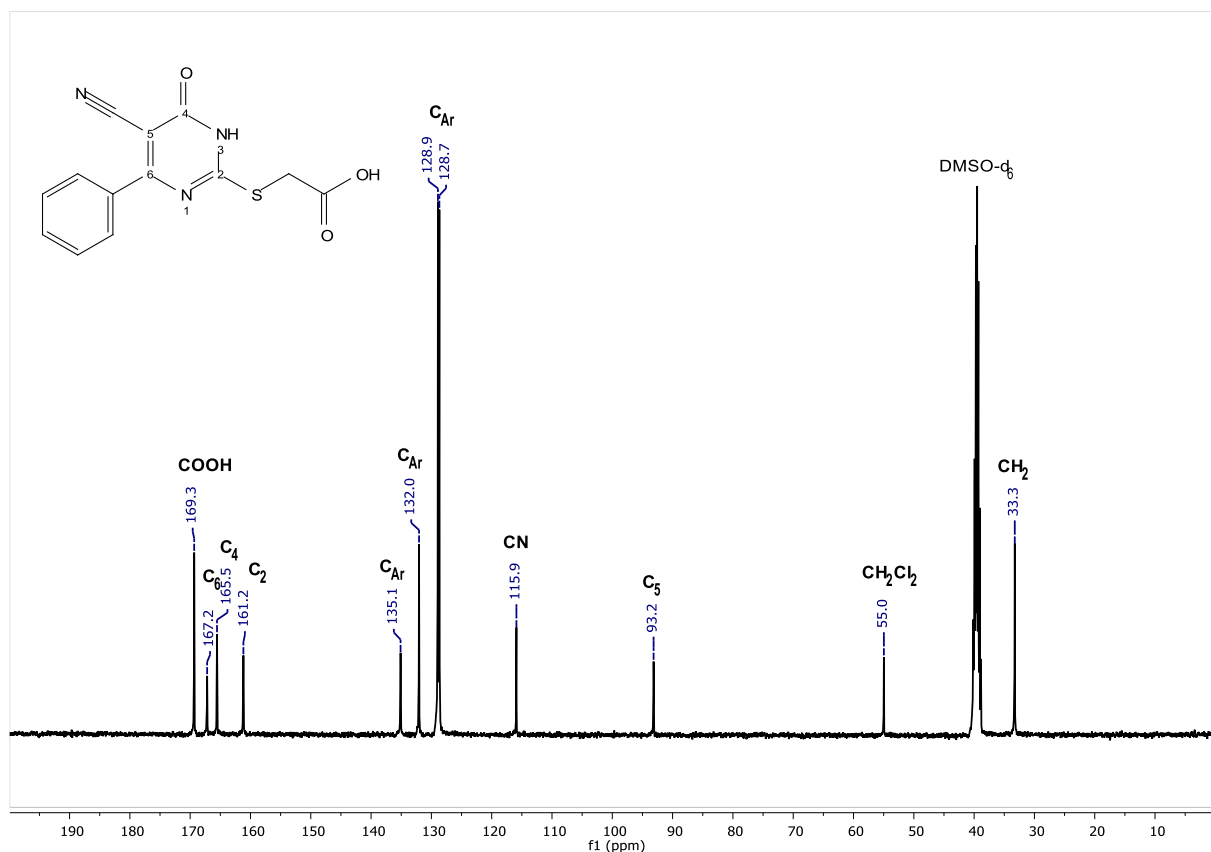
**Figura 9.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) de **8a**.



Fonte: A autora (2020)

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para o composto **8a**, observa-se um pico em 33,3 ppm referente ao carbono metilênico da cadeia alifática (Figura 10). Em 93,2 e 115,9 ppm encontram-se os picos referentes ao carbono  $\text{C}_5$  do anel pirimidínico e a ao carbono da nitrila, respectivamente. Na região entre 128,7 e 135,1 ppm, observam-se quatro picos relacionados aos seis carbonos do anel aromático, em que dois picos apresentam maior intensidade, pois, estão atribuídos a dois carbonos cada. Os picos em 161,2; 165,5 e 167,2 ppm pertencem aos carbonos do anel pimidínico  $\text{C}_2$ ,  $\text{C}_4$  e  $\text{C}_6$ . Em 169,3 ppm encontra-se o pico referente ao carbono da carboxila.

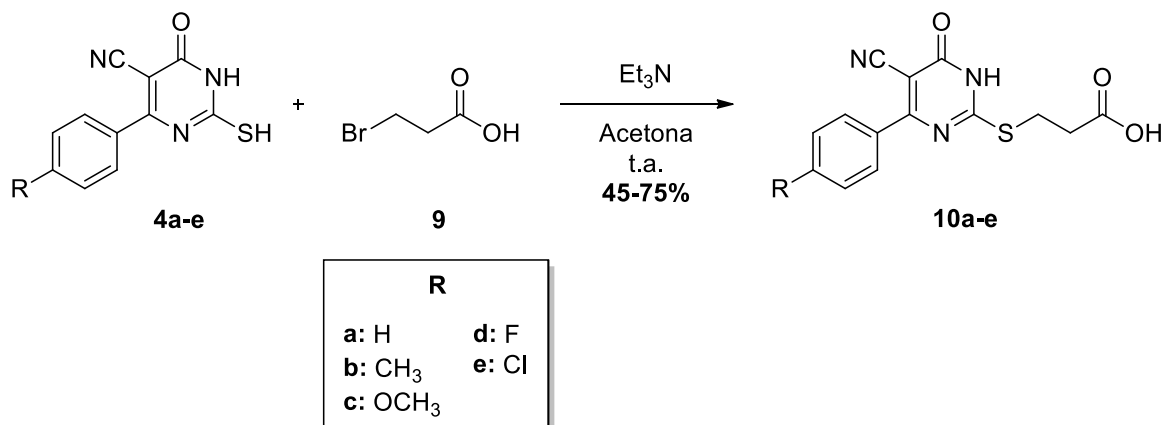
**Figura 10.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 101 MHz) de **8a**.



Fonte: A autora (2020)

### 3.1.4 Síntese dos ácidos 3-[(4-aril-5-ciano-6-oxo-1,6-diidropirimidin-2-il)tio] propanóicos (**10a-e**)

Assim como para as séries **6a-e** e **8a-e**, a funcionalização das 2-tiopirimidin-4-onas com o ácido bromopropiônico, foi realizada utilizando trietilamina como base e acetona como solvente, em temperatura ambiente, resultando nos cinco produtos **10a-e** (Esquema 6)

**Esquema 6.** Síntese dos ácidos 3-[(4-*aril*-5-ciano-6-oxo-1,6-diidropirimidin-2-il)tio] propanóicos.

Fonte: A autora (2020)

Os cinco produtos obtidos apresentaram faixa de rendimento entre 45-75% e seus respectivos pontos de fusão foram determinados (Tabela 5). Todos os compostos da série **10a-e** são inéditos.

**Tabela 5.** Dados experimentais dos compostos **10a-e**.

| Composto   | Rendimento (%) | P.F. (°C) | Solvente de recristalização |
|------------|----------------|-----------|-----------------------------|
| <b>10a</b> | 45             | 240 (dec) | Metanol/Gelo                |
| <b>10b</b> | 58             | 220-223   | Metanol/Gelo                |
| <b>10c</b> | 75             | 205-208   | Metanol/Gelo                |
| <b>10d</b> | 64             | 218-220   | Metanol/Gelo                |
| <b>10e</b> | 45             | 210-212   | Metanol/Gelo                |

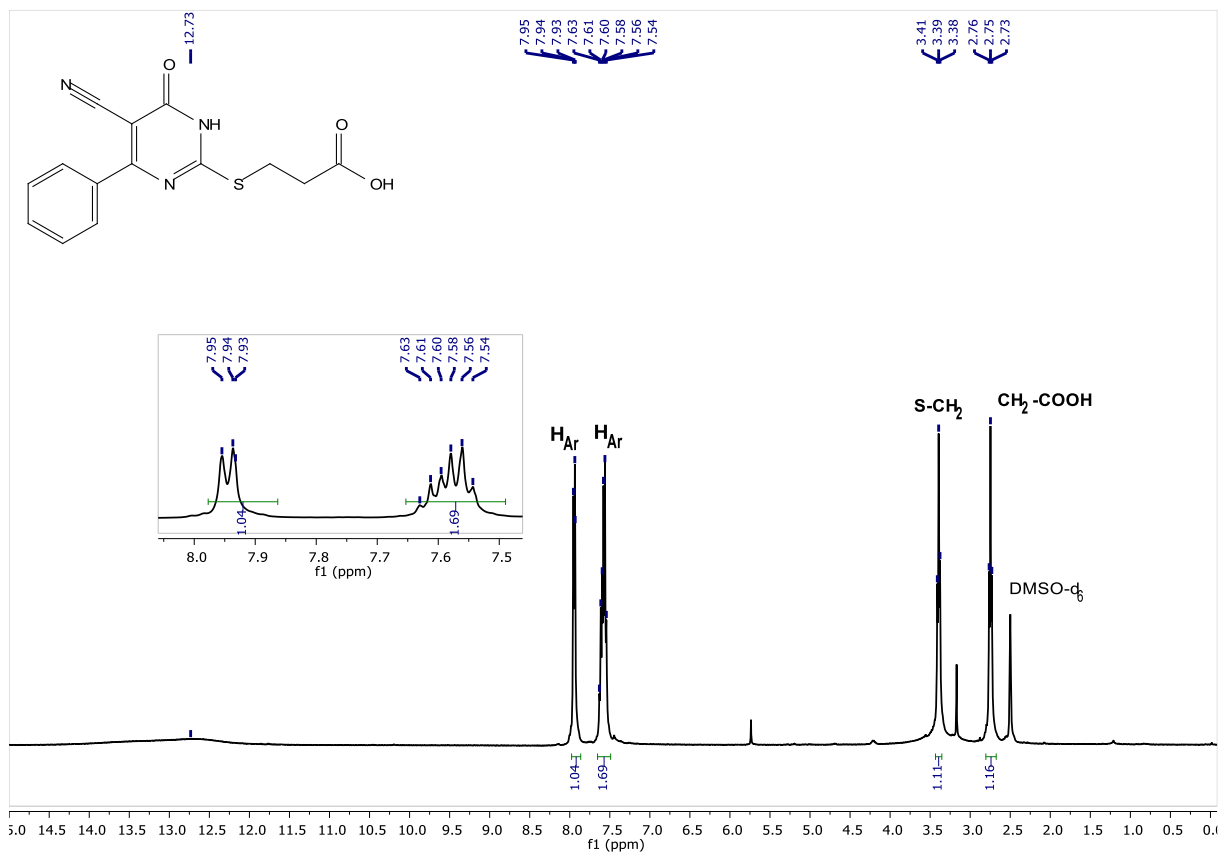
Fonte: A autora (2020)

Para todos os 5 compostos sintetizados nesta série, foi realizada a caracterização por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, em que os espectros apresentados e discutidos a seguir para o composto **10a**, podem ser extrapolados para os demais compostos da série, cujos espectros encontram-se disponíveis no apêndice.

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H para o composto **10a**, encontram-se dois tripletos em 2,75 e 3,39 ppm que apresentam uma constante de acoplamento igual a 6,7 Hz, referentes aos hidrogênios dos carbonos metilênicos (Figura 11). E na região entre 7,54 – 7,95 ppm observam-se os picos referentes aos hidrogênios aromáticos. Na região em 12,73 ppm encontra-se uma região de pico alargado que pode ser atrelada ao hidrogênio da hidroxila do ácido ou ao

hidrogênio ligado ao nitrogênio N<sub>3</sub> o anel pirimidínico, não se tem essa confirmação. Esta validação será realizada em experimentos futuros.

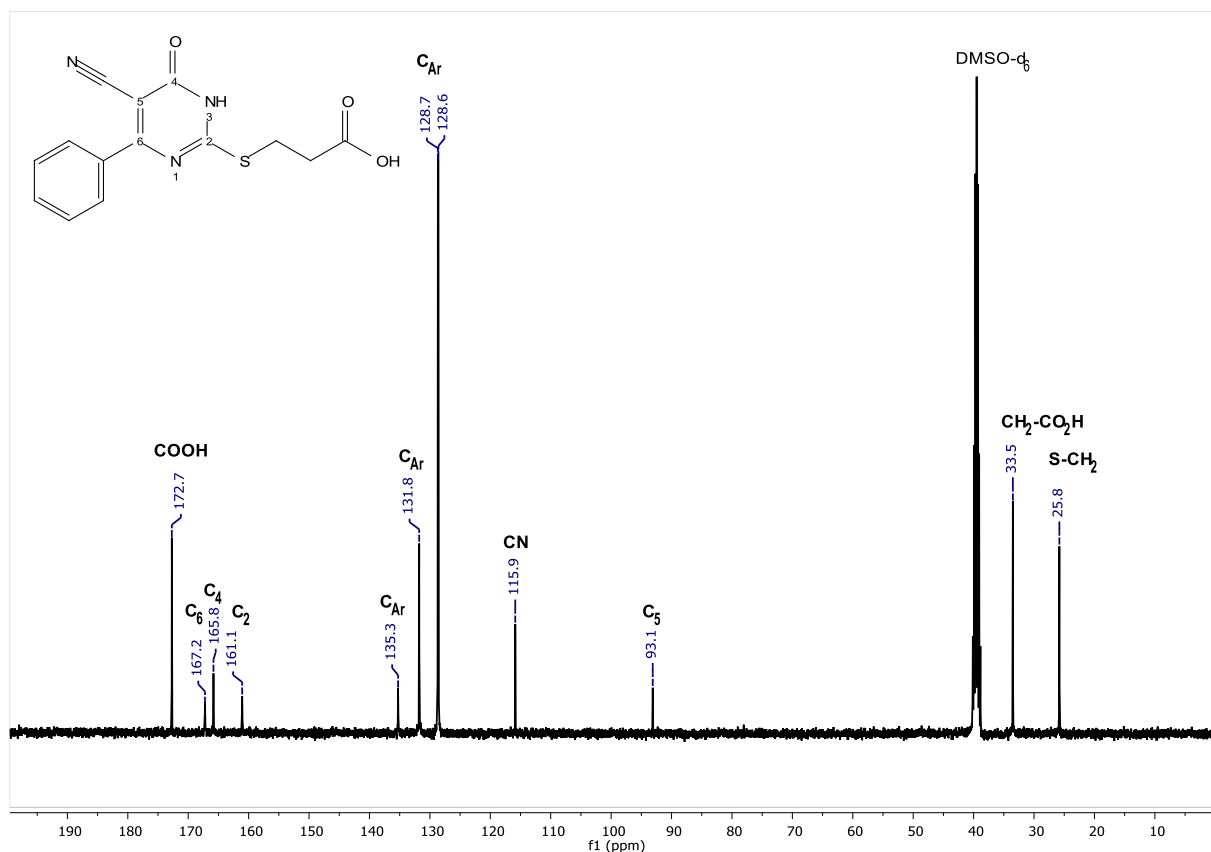
**Figura 11.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) de **10a**.



Fonte: A autora (2020)

No espectro de RMN de <sup>13</sup>C para o composto **10a** (Figura 12), observam-se dois picos nas regiões em 25,8 e 33,5 ppm referentes aos carbonos metilênicos da cadeia alifática. Em 93,1 e 115,9 ppm encontram-se os picos referentes ao carbono C<sub>5</sub> do anel pirimidínico e a ao carbono da nitrila, respectivamente. Na região entre 128,6 a 135,3 ppm observam-se quatro picos relacionados aos seis carbonos do anel aromático, em que dois dos picos apresentam maior intensidade, pois, estão atribuídos a dois carbonos cada. Os picos em 161,1; 165,8; 167,2 ppm pertencem aos carbonos do anel pirimidínico C<sub>2</sub>, C<sub>4</sub> e C<sub>6</sub>, respectivamente. Por fim, em 172,7 ppm encontra-se o pico referente ao carbono do grupo ácido carboxílico.

**Figura 12.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 101 MHz) de **10a**.

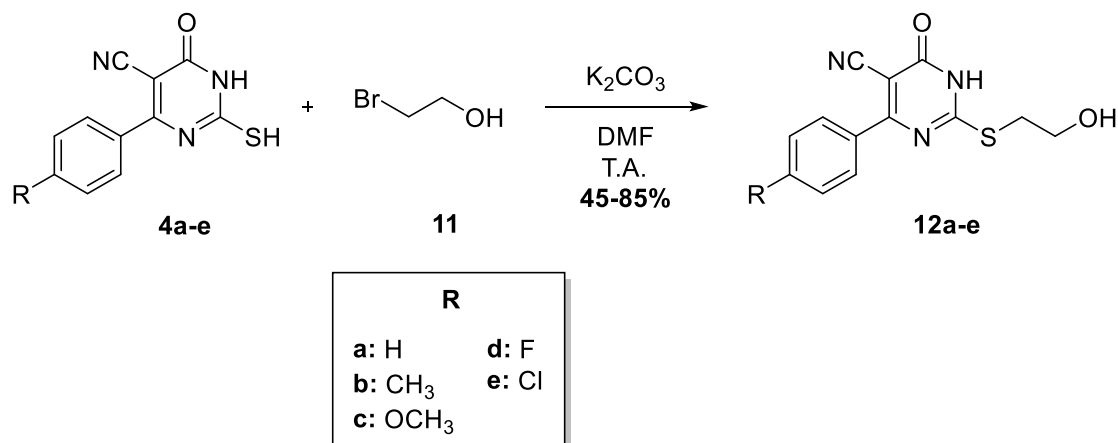


Fonte: A autora (2020)

### 3.1.5 Síntese das 2-[(2-hidróxietyl)tio]-4-aril-6-oxo-1,6-diidropirimidina-5-carbonitrilas (**12a-e**)

A funcionalização das 2-tiopirimidin-4-onas com a porção álcool é uma condição para a realização da reação de Mitsunobu (Esquema 7). As reações entre as 2-tiopirimidin-4-onas e o bromoetanol foram conduzidas em meio alcalino, utilizando carbonato de potássio como base e DMF como solvente, para estes produtos a metodologia utilizando trietilamina e acetona também foi testada, demonstrando-se eficaz para esta funcionalização. Os cinco produtos nesta série foram purificados por recristalização em uma mistura de metanol/gelo, e foram relatados e caracterizados em trabalhos prévios de nosso grupo de pesquisa (FEITOSA, 2020).

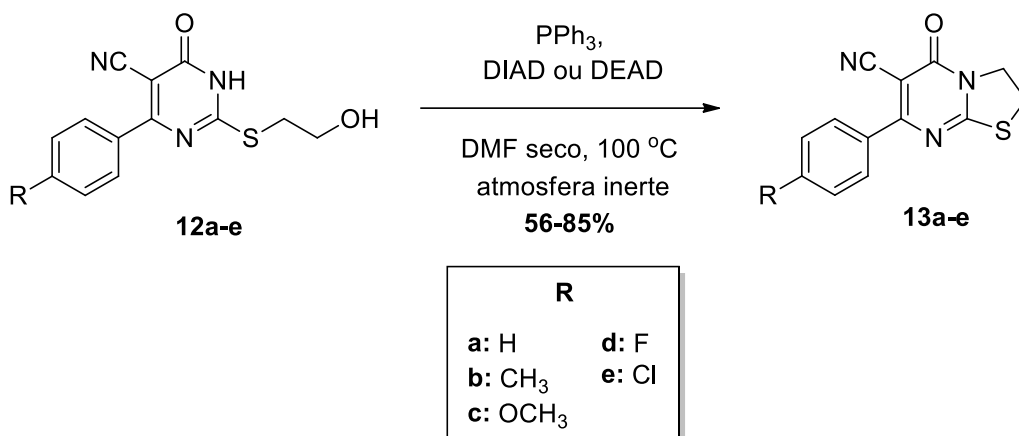
**Esquema 7.** Síntese das 2-[(2-hidróxi)etil]tio]-4-*aril*-6-oxo-1,6-diidropirimidina-5-carbonitrilas.



Fonte: A autora (2020)

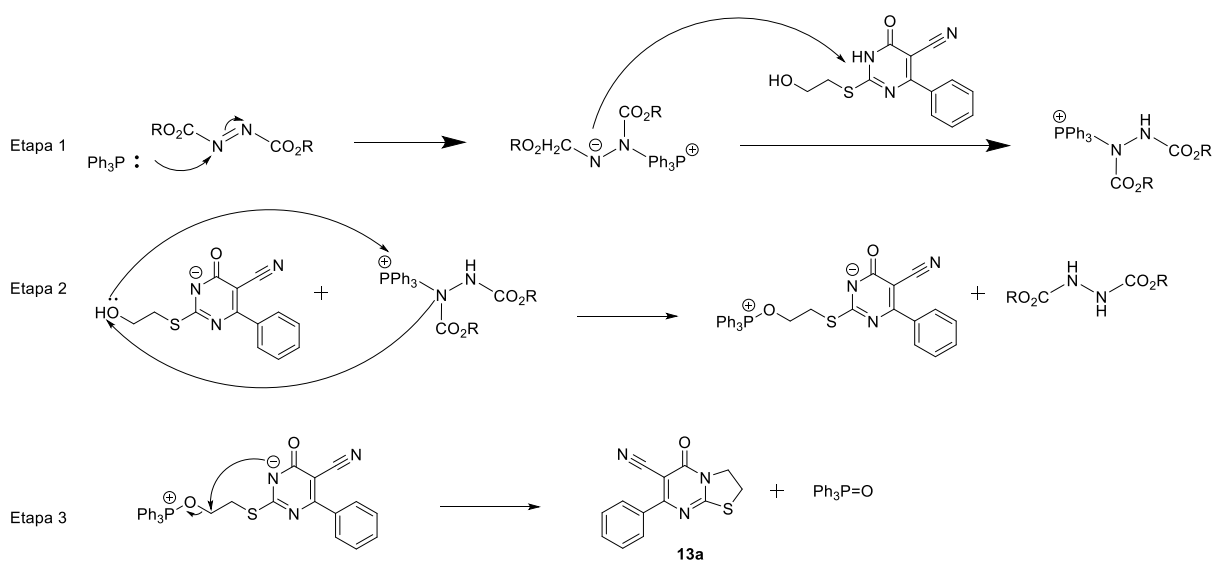
### 3.1.6 Hibridização molecular via Reação de Mitsunobu: síntese das 7-*aril*-5-oxo-2,3-diidro-5*H*-tiazolo[3,2-*a*]pirimidina-6-carbonitrilas (13a-e)

A estratégia utilizada para a síntese dos compostos da série **13a-e**, os híbridos contendo ambos os anéis de pirimidinona e tiazolidina, foi a reação de Mitsunobu, que consiste na conversão de álcoois primários ou secundários a uma diversidade de grupos funcionais, como: ésteres, éteres, amidas, lactonas, lactamas, entre outros (Esquema 8). A reação de Mitsunobu ocorre mediada pela combinação redox de azodicarboxilatos, como o azodicarboxilato de dietilo (DEAD) ou azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD) e trifetilfosfina (PPh<sub>3</sub>). Dentre as reações possíveis utilizando a estratégia descoberta por Oyo Mitsunobu, a reação para formação dos compostos **13a-e** consiste em uma reação intramolecular para formação de uma nova ligação carbono nitrogênio, levando a formação de um anel de 5 membros condensado ao anel pirimidínico (HUGHES, 1996).

**Esquema 8.** Síntese das 7-Aril-5-oxo-2,3-diidro-5H-tiazolo[3,2-a]pirimidina-6-carbonitrilas.

Fonte: A autora (2020)

Seguindo o mecanismo genérico da reação de Mitsunobu (HUGHES, 1996), foi proposto o mecanismo mais provável para a formação do composto **13a** (Esquema 9). Na primeira etapa, ocorre a reação entre a trifenilfosfina e o azodicarboxilato (DEAD ou DIAD) para formação do *zwitterion*, que é posteriormente protonado para formação do sal de fosfônio. Na segunda etapa, há a ativação do álcool à medida que trifenilfosfina é transferida para este, gerando como subproduto a hidrazina reduzida. Como última etapa, a reação intramolecular ocorre pelo ataque do nitrogênio desprotonado ao carbono adjacente ao grupo de saída, levando a formação do composto **13a** e o óxido de fosfônio.

**Esquema 9.** Mecanismo proposto para a formação do composto **13a**.

Fonte: A autora (2020)

O composto **13a** foi primeiramente sintetizado por Vlietinck e colaboradores (RAM; VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1987), cuja estratégia utilizada pelos autores consistia na reação das 2-tiopirimidin-4-onas com o dicloroetano mediada por carbonato de potássio em DMF. Mesmo tendo essa rota como alternativa à reação de Mitsunobu, optou-se por seguir a via de Mitsunobu uma vez que as condições de síntese são mais brandas, e a formação de subprodutos é mais controlada, já que, em tese, as 2-tiopirimidin-4-onas poderiam ser alquiladas no N<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, oxigênio exocíclico da porção lactama ligado a C<sub>4</sub> e no átomo de enxofre exocíclico ligado em C<sub>2</sub>.

Por meio da estratégia de Mitsunobu, foram sintetizados 5 novos produtos com rendimentos que variaram entre 56-85% e seus respectivos pontos de fusão foram obtidos e comparados, quando possível, aos dados da literatura (Tabela 6).

**Tabela 6.** Dados experimentais dos compostos **13a-e**.

| Composto   | Rendimento (%) | P.F. (°C) | P.F. lit. (°C)   |
|------------|----------------|-----------|------------------|
| <b>13a</b> | 85             | 148-150   | 170 <sup>a</sup> |
| <b>13b</b> | 60             | 233-235   | Inédito          |
| <b>13c</b> | 56             | 233-235   | Inédito          |
| <b>13d</b> | 78             | 228-230   | Inédito          |
| <b>13e</b> | 57             | 244-247   | 248 <sup>b</sup> |

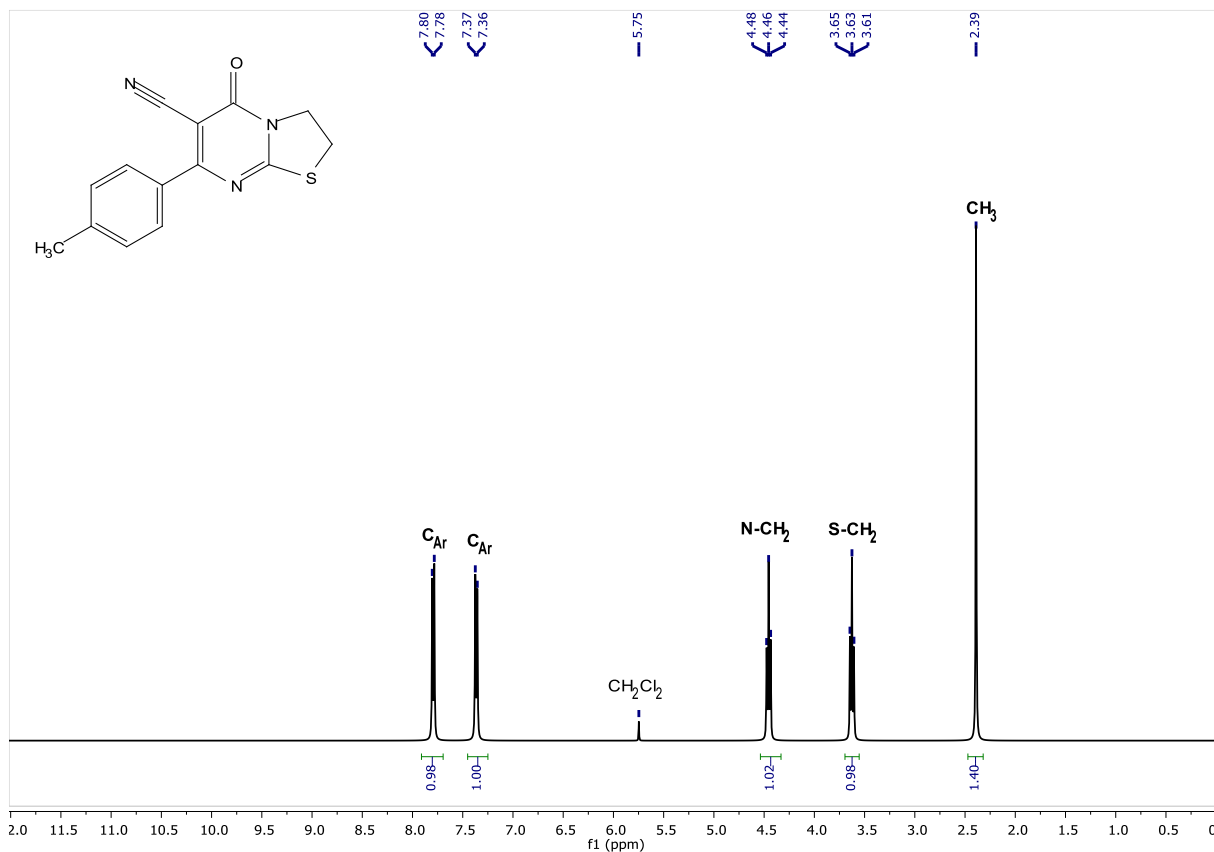
Fonte: A autora (2020); <sup>a</sup>: (VLIETINCK, 1984) <sup>b</sup>: (RAM; VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1987)

Os compostos obtidos pela reação de Mitsunobu foram caracterizados via espectroscopia no RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. Os espectros apresentados e discutidos a seguir são para o composto **13b** e podem ser extrapolados para os demais compostos da série, cujos espectros encontram-se disponíveis no apêndice. O composto canônico (sem grupos substituintes no anel aromático) foi discutido ao longo deste trabalho para as demais séries, entretanto, os espectros obtidos para o composto **13a** apresentaram picos residuais dos solventes de recristalização, e não houve possibilidade de se repetir as medidas espectroscópicas antes da finalização deste trabalho. Com isso, de forma particular para a esta série, serão discutidos os espectros para o composto **13b**.

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H para o composto **13b**, encontra-se um simpleto em 2,39 ppm referente ao substituinte metila do anel aromático (Figura 13). Em 3,63 e 4,46 ppm observam-se dois tripletos referentes aos hidrogênios dos carbonos metilênicos da tiazolidina, e ambos possuem constante de acoplamento igual a 8,0 Hz. Entre 7,36-7,80 encontram-se os dupletos

referentes aos hidrogênios do anel aromático, com constante de acoplamento de 8,0 Hz para ambos.

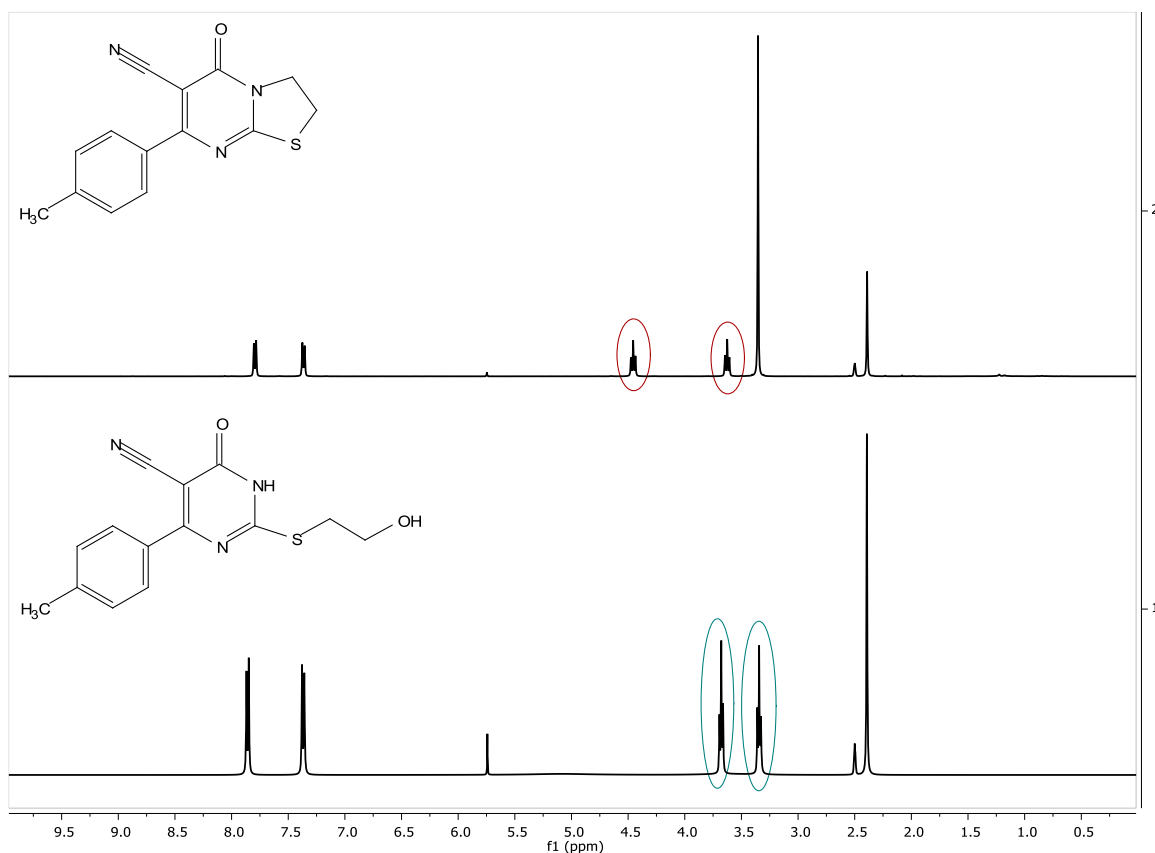
**Figura 13.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) de **13b**.



Fonte: A autora (2020)

Um questionamento poderia ser levantado: a ciclização foi realmente efetivada, uma vez que os sinais de RMN obtidos para o composto aberto (**12b**) quanto para ele fechado (**13b**) seriam teoricamente os mesmos? Para responder a esta pergunta, foi feita uma comparação entre os espectros dos compostos **12b** e **13b** e observa-se uma mudança de deslocamento químico dos hidrogênios dos carbonos metilênicos de 3,34 e 3,68 ppm no composto aberto para 3,63 e 4,46 ppm no composto fechado em tiazolidina (Figura 14). Uma confirmação mais eficaz seria o espectro de infravermelho, em que seria possível visualizar a ausência da banda referente ao grupo OH do composto de partida (**12b**), como também pode-se avaliar a banda da amida presente na pirimidinona, entretanto, por motivos de força maior, não foi possível realizar esta análise até o presente momento.

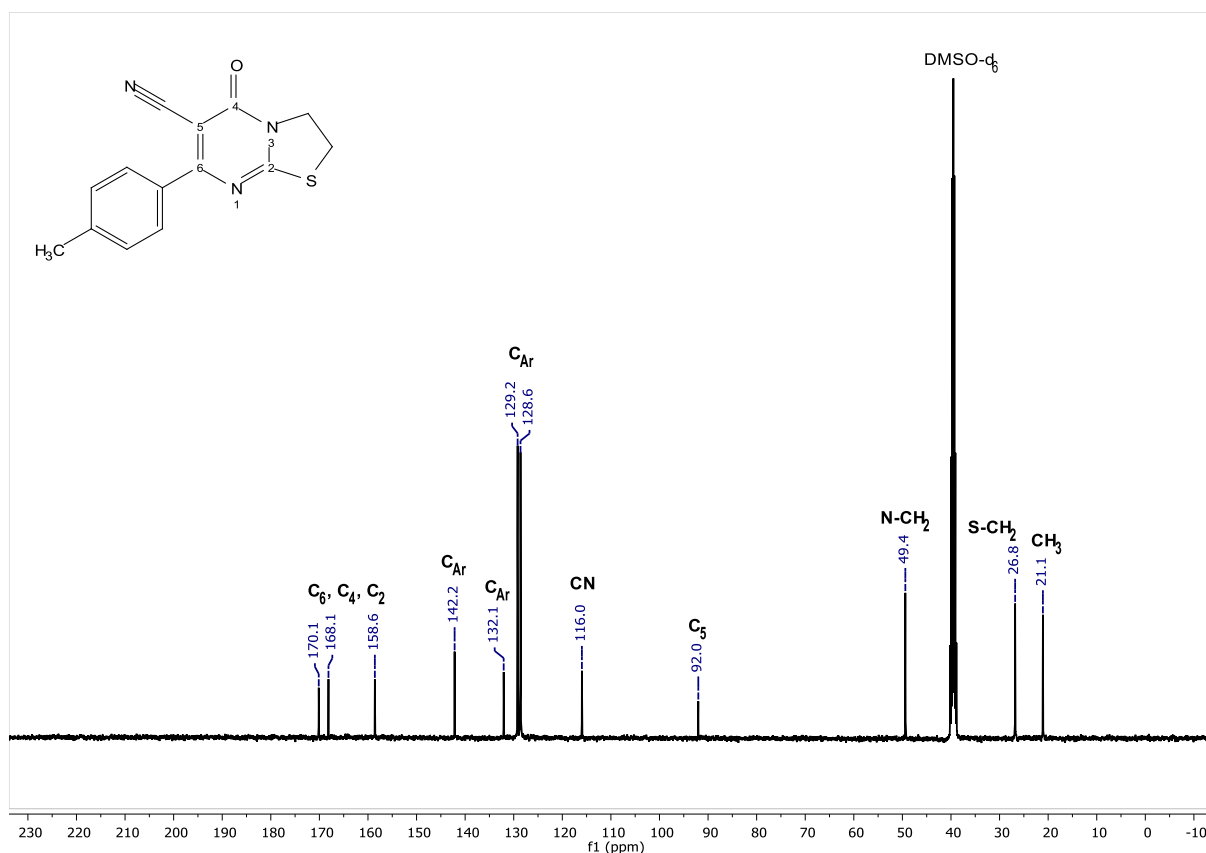
**Figura 14.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) para os compostos **13b** e **12b** para fins de comparação.



Fonte: A autora (2020)

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para o composto **13b** (Figura 15), observa-se um pico em 21,1 ppm referente ao carbono do substituinte metila do anel aromático. Em seguida, em 26,8 e 49,4 ppm encontram-se os picos referentes aos carbonos metilênicos da tiazolidina. De forma semelhante, no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , as alterações de deslocamento químico mencionadas para os compostos **12b** e **13b** também são observadas, uma vez que os picos referentes aos carbonos metilênicos da cadeia alquílica encontram-se em 33,3 e 59,3 ppm no espectro do composto **12b**, sendo mais desblindados do que no produto **13b**. Em 92,0 e 116,0 ppm encontram-se os picos referentes ao carbono C<sub>5</sub> do anel pirimidínico e a ao carbono da nitrila, respectivamente. Na região entre 128,6 e 142,2 ppm observam-se quatro picos relacionados aos seis carbonos do anel aromático, em que dois dos picos apresentam maior intensidade, pois, estão atribuídos a dois carbonos cada. Os picos em 158,6; 168,1; 170,1 ppm pertencem aos carbonos do anel pimidínico C<sub>2</sub>, C<sub>4</sub> e C<sub>6</sub>, respectivamente.

**Figura 15.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 101 MHz) de **13b**.



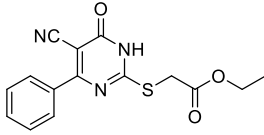
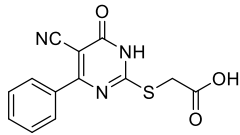
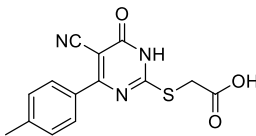
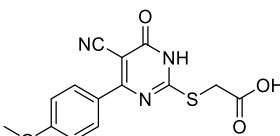
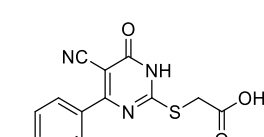
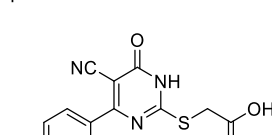
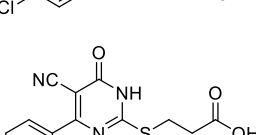
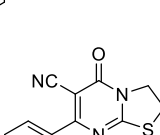
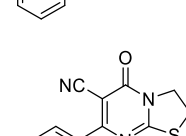
Fonte: A autora (2020)

### 3.2 Ensaios *in vitro* para avaliação da inibição enzimática da aldose redutase (AR)

Com base em estudos de inibidores testados para a enzima AR (EISENMANN et al., 2009; ELLINGBOE et al., 1990), foram escolhidos alguns dos compostos sintetizados que apresentavam algumas semelhanças estruturais com os compostos já reportados para avaliar a atividade inibitória perante à AR.

Preliminarmente, foram escolhidos os compostos **6a**, **8a-e**, **10a** e **13a-b**, para uma triagem na concentração fixa de 50  $\mu\text{M}$ , com ensaios realizados em duplicata. A partir desses experimentos, foram obtidos os dados percentuais de inibição dos compostos em relação à enzima AR sem inibidor (Tabela 7).

**Tabela 7.** Percentuais de inibição relativa para cada composto testado na enzima AR.

| Amostra    | Estrutura Química                                                                   | Percentual de inibição relativa (%) |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>6a</b>  |    | 74                                  |
| <b>8a</b>  |    | 100                                 |
| <b>8b</b>  |    | 97                                  |
| <b>8c</b>  |   | 84                                  |
| <b>8d</b>  |  | 100                                 |
| <b>8e</b>  |  | 88                                  |
| <b>10a</b> |  | 85                                  |
| <b>13a</b> |  | 13                                  |
| <b>13d</b> |  | 15                                  |

Fonte: A autora (2020)

Observa-se que a maioria dos compostos apresenta percentual de inibição relativa maior que 70%, com exceção dos compostos **13a** e **13d**, as pirimidinonas-tiazolidinas, que

apresentaram porcentagens de inibição em torno de 14%. Um motivo para esse comportamento pode se justificar pela ausência de carbonila de ácido ou éster, que viabilize interação com os resíduos do sítio ativo da AR, o que será discutido em maiores detalhes posteriormente (EISENMANN et al., 2009). Comparando os produtos **6a** e **8a**, em que a diferença é a terminação éster e ácido respectivamente, nota-se que o composto ácido (**8a**) apresenta maior porcentagem de inibição, mostrando a importância do grupo ácido na manutenção da atividade inibitória do composto (EISENMANN et al., 2009).

Analisando os resultados obtidos para a série **8a-e**, pode-se observar que a presença de substituintes no anel aromático parece não ter influência na eficiência de inibição, uma vez que para o composto **8a**, que não apresenta substituições, obteve-se 100% de inibição relativa. No entanto, para o composto *p*-flúor-substituído (**8d**), também foi observada uma inibição de 100%. Isto pareceu mostrar, num primeiro momento, que a substituição por um átomo pequeno, porém fortemente eletronegativo, tem o mesmo potencial de inibição que o composto canônico. Esta tese mostraria que efeitos estéricos são mais importantes que efeitos eletrônicos. Para entender melhor como se comportam esses dois compostos em relação à inibição da AR, foram repetidos os testes de inibição, utilizando uma nova concentração fixa, 25 µM, apenas para os compostos **8a** e **8d**.

Os novos resultados a 25 µM apresentaram porcentagens de inibição de 64% e 32% para os compostos **8a** e **8d** respectivamente, mostrando que o composto **8a** manteve a inibição acima dos 60% mesmo em concentração reduzida, enquanto que o percentual de inibição do composto **8d** foi comparativamente menor. Isto mostra que a primeira tese, a de que efeitos eletrônicos não são tão importantes para a manutenção da atividade, não é verdadeira, uma vez que o composto canônico foi o melhor protótipo da série.

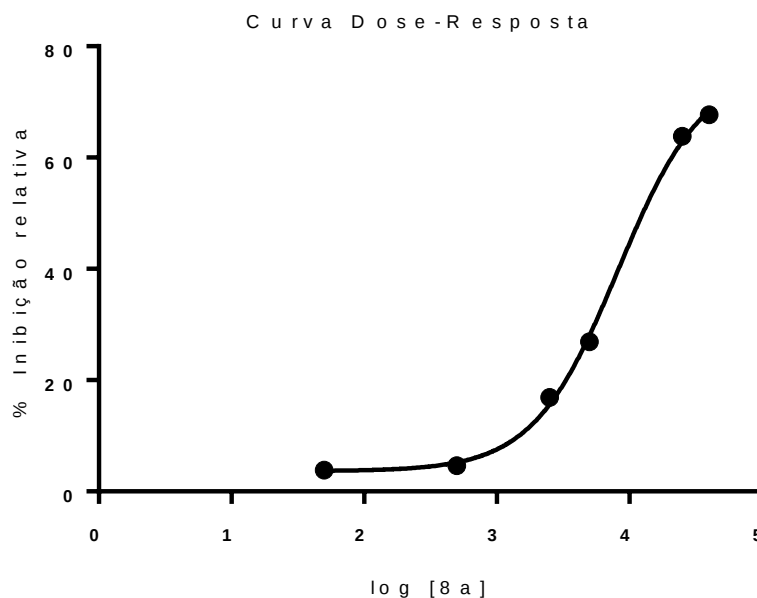
Escolheu-se então o composto **8a** para se fazer a estimativa da  $CI_{50}$ . Para isso foram acrescentadas as seguintes concentrações: 0,05 µM; 0,5 µM; 2,5 µM; 5 µM e 40 µM, e foram obtidas as porcentagens de inibição para estas concentrações de **8a** (Tabela 8).

**Tabela 8.** Porcentagens de inibição relativa para diferentes concentrações do composto 8a.

| Concentrações do composto 8a ( $\mu\text{M}$ ) | Percentual de inibição relativa (%) |
|------------------------------------------------|-------------------------------------|
| 50                                             | 100                                 |
| 40                                             | 68                                  |
| 25                                             | 64                                  |
| 5                                              | 27                                  |
| 2,5                                            | 17                                  |
| 0,5                                            | 5                                   |
| 0,05                                           | 4                                   |

Fonte: A autora (2020)

Com os dados de inibição relativa em diferentes concentrações foi plotada a curva dose-resposta (Figura 16) para a inibição da AR. Para o ajuste da curva foram utilizadas as concentrações de 40 a 0,05  $\mu\text{M}$ , omitindo o valor de 100% de inibição, e assim obteve-se a concentração inibitória média ( $\text{CI}_{50}$ ) que foi de  $8 \pm 1 \mu\text{M}$  para o composto **8a**.

**Figura 16.** Curva de dose-resposta de inibição da AR pelo composto **8a**.

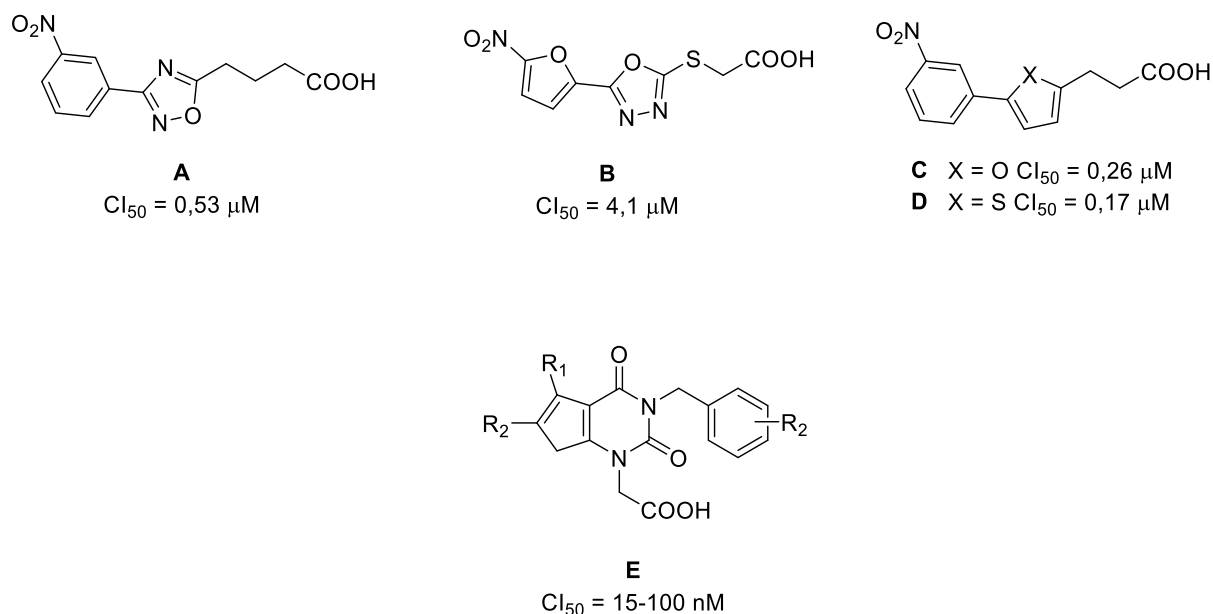
Fonte: A autora (2020)

Eisenmann e colaboradores realizaram um estudo de triagem virtual baseados em dois candidatos principais a inibidores da AR na estrutura cristalográfica da AR (Figura 17). Os

compostos **A** e **B** apresentaram valores de  $CI_{50}$  iguais a 0,53 e 4,1  $\mu M$  respectivamente. Os autores modificaram a estrutura desses compostos e demonstraram, por meio da inserção de diferentes grupos substituintes, quais moléculas apresentavam forte interação com o sítio ativo da AR e consequentemente menores valores de  $CI_{50}$ . Deste estudo, se destacaram os compostos **C** e **D**, que contém a porção nitro em sua cadeia lateral, grupo este que melhora a interação com resíduos importantes no sítio ativo da AR, resultando em derivados mais potentes (EISENMANN et al., 2009). Um outro trabalho feito por Ogawva e colaboradores, mostra uma série de compostos contendo anéis pirimídnicos (**E**) que se apresentaram como candidatos efetivos a inibidores da AR, com valores de  $CI_{50}$  que variaram entre 15 e 100 nM (OGAWVA et al., 1993b).

Os candidatos a inibidores sintetizados neste trabalho apresentam promissores resultados, contudo, os trabalhos acima citados podem nortear mudanças estruturais e adição de diferentes grupos substituintes, o que pode auxiliar na descoberta de protótipos com menores valores de  $CI_{50}$  para a enzima AR.

**Figura 17.** Exemplos de inibidores da enzima AR que apresentam semelhança estrutural com os compostos sintetizados nesse trabalho.



Fonte: extraído de (EISENMANN et al., 2009; OGAWVA et al., 1993)

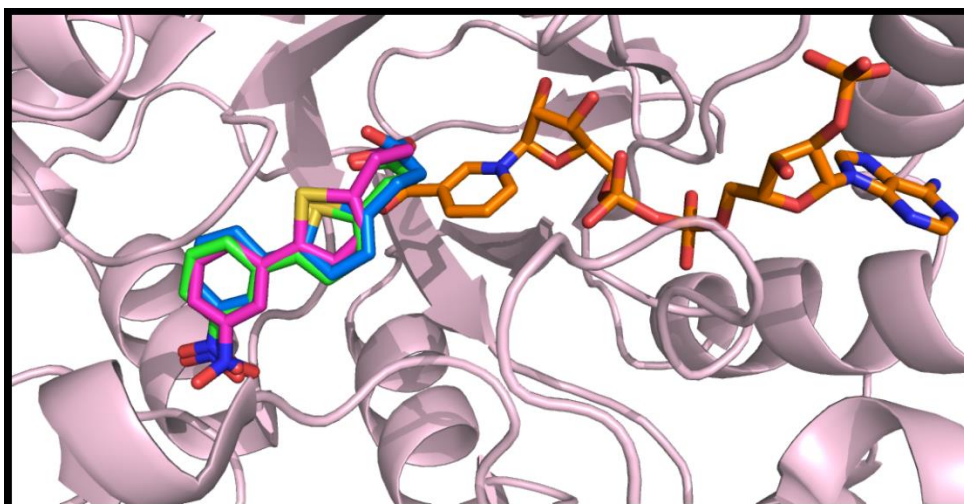
### 3.3 Docking Molecular dos compostos na estrutura cristalográfica da AR

Como estratégia complementar aos testes de inibição, foram realizadas simulações de *Docking Molecular* (DM) com o objetivo de avaliar os modos de ligação dos inibidores propostos no sítio ativo da AR, buscando obter informações que pudessem nortear o

desenvolvimento de novos candidatos e estudar quais grupos funcionais desses compostos são importantes para a manutenção da atividade inibitória. Como início destes estudos teóricos, escolheu-se a estrutura cristalográfica no PDB de código 3DN5, que contém a enzima ALR2 humana em complexo com o inibidor cocrystalizado ácido 3-[5-(3-nitrofenil)tiofen-2-il]propanóico (53N). Na sequência, foi realizada a simulação de *redocking* do inibidor cocrystalizado 53N na estrutura da AR, com a finalidade de validar o método escolhido para a triagem dos novos candidatos a inibidores.

A simulação de *redocking* tem como objetivo remontar a posição original de um ligante já conhecido e que esteja presente na estrutura cristalográfica da enzima alvo na forma de ligante cocrystalizado. Na simulação, as coordenadas do 53N foram fixadas inicialmente de duas maneiras: dentro do sítio ativo (molécula com carbonos em rosa) e fora do sítio ativo (molécula com carbonos em verde). Ambas as configurações iniciais resultaram de forma majoritária na posição de menor energia, que coincidem com a posição do ligante cocrystalizado (molécula com carbonos em azul) (Figura 18). Dessa forma, o método escolhido foi validado e procedeu-se com o DM dos candidatos a inibidores.

**Figura 18.** *Redocking* do ligante cristalográfico 53N na estrutura da AR para validação do método. (Código PDB: 3DN5) Cofator NADPH em laranja, 53N cristalográfico em azul, 53N após o DM posicionado dentro do sítio ativo e 53N em verde após o DM posicionado fora do sítio ativo.



Fonte: A autora (2020)

Eisenmann e colaboradores (EISENMANN et al., 2009) descreveram os possíveis resíduos que interagem com ligantes no sítio ativo da AR com base nas estruturas cristalográficas já disponibilizadas (HOWARD et al., 2004). É observado, através das estruturas disponíveis para a AR, que a enzima possui em seu sítio de ligação um bolso catalítico que se

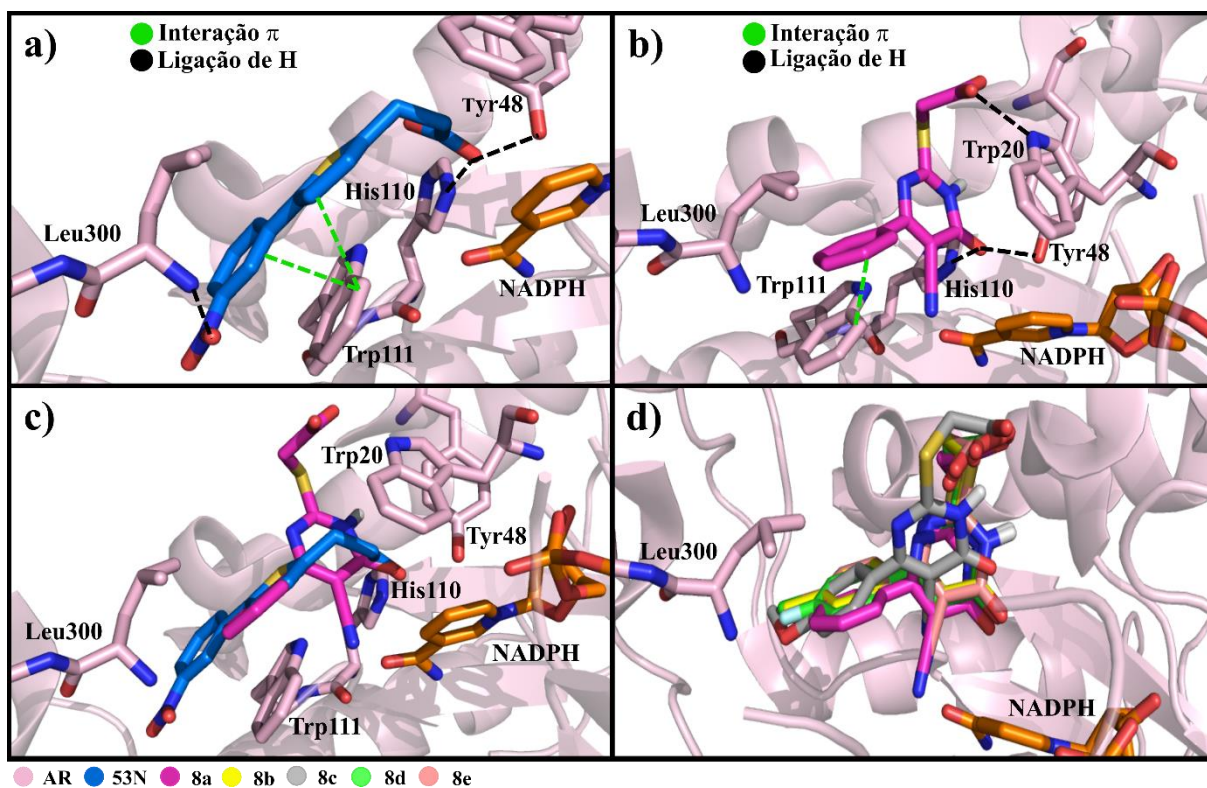
encontra na região mais interna da enzima. Este bolso é formado pelos resíduos Tyr48, Lys77, His110 e Trp111, além destes, encontra-se também o cofator NADPH. Normalmente, grupos hidrofílicos carregados negativamente interagem com essa porção da enzima, enquanto que grupos hidrofóbicos auxiliam na abertura do bolso catalítico para passagem do ligante. Outros contatos com o ligante podem ser formados pelos resíduos: Val47, Trp79, Trp20, Trp219, Ala299, Leu300 e Phe122.

Conforme demonstrado no trabalho de Eisenmann (EISENMANN et al., 2009), o ligante 53N interage com o sítio de ligação da AR através dos resíduos Tyr48, His110, Trp111 e Leu300 (Figura 19a). Segundo o autor, o carboxilato do ligante interage no bolso catalítico com os resíduos Tyr48 e His110, a parte aromática da molécula faz interações de empilhamento  $\pi$  com o Trp111, e a porção contendo o grupo nitro interage fortemente por ligação de hidrogênio com a Leu300.

O composto **8a** testado experimentalmente e que apresentou promissores resultados no tocante à atividade inibitória, exibiu um desvio de conformação quando comparado ao ligante 53N (Figuras 19b e 19c). Antes dos resultados de DM, era esperado que a porção contendo o carboxilato interagisse com o bolso catalítico através do carboxilato, como visto para o 53N. No entanto, observou-se que o anel multifuncional da pirimidinona se encaixou ao bolso catalítico, interagindo com os resíduos Tyr48 e His110, enquanto a porção do carboxilato se voltou para as cadeias laterais da enzima interagindo com o Trp20. De forma similar ao 53N, a região aromática do **8a** interagiu com o Trp111, contudo, a interação que se estabelece entre a Leu300 e o grupo nitro não é observada, devido à ausência deste grupo no composto **8a**.

O restante da série dos ácidos acéticos **8a-e** se comporta como o seu canônico **8a** (Figura 19d), com exceção do composto **8c**, que possui um pequeno desvio em relação aos demais, possivelmente devido à interação do grupo metóxi com a Leu300 ocasionado uma leve rotação do anel pirimidínico, levando-o a se distanciar levemente dos resíduos importantes do bolso catalítico (Tyr48 e His110), o que pode ter resultado na diminuição do seu percentual de inibição em comparação ao **8a** e aos demais compostos da série (Tabela 7).

**Figura 19.** DM da série **8a-e** em comparação ao 53N: Interações intermoleculares com os resíduos para o 53N **a)** e **8a b)**, 53N e **8a** de forma comparativa **c)**. Todos os compostos da série **8a-e** após DM no sítio ativo da AR **d)**.



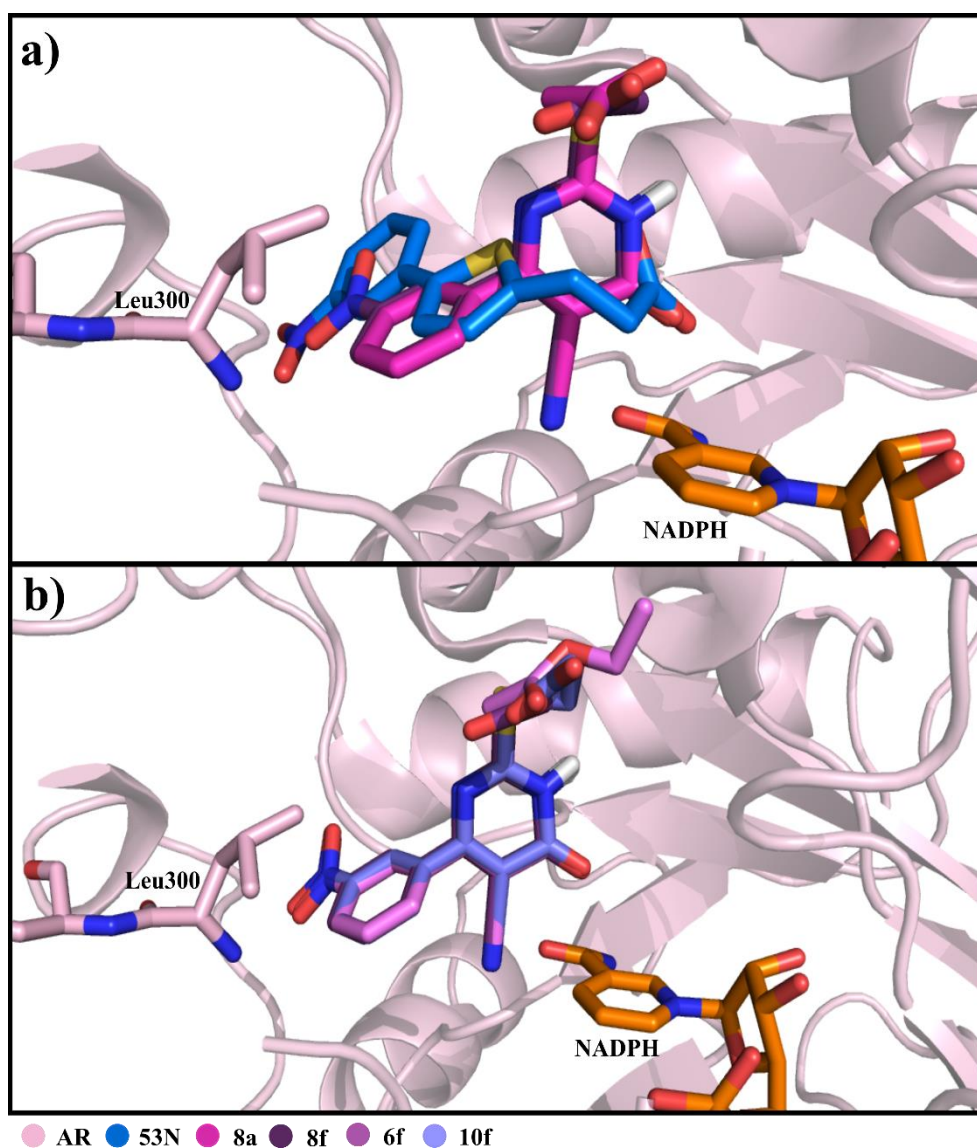
Fonte: A autora (2020)

Como já visto na literatura, ligantes contendo o grupo nitro substituído ao anel aromático apresentaram resultados promissores de inibição da AR. Dessa forma, foram realizadas diversas tentativas de síntese desses compostos contendo o grupo nitro nas posições *meta* e *para*, contudo, dificuldades foram encontradas na parte experimental, e com isso apenas resultados teóricos foram obtidos para os compostos denominados pelas siglas **6f**, **6g**, **8f**, **8g**, **10f** e **10g** (Ver tabela 9).

O derivado **8f** contendo o grupo nitro na posição *meta* apresenta conformação semelhante ao composto canônico **8a** (Figura 20a) com a diferença de que o grupo nitro pode realizar ligação de hidrogênio com a cadeia principal da Leu300, como visto para o 53N. Este fato contribui de forma positiva na inibição da AR, como pode ser observado nos valores das constantes de inibição ( $K_i$ ) teóricos calculados pelo DM (Tabela 9). Os valores teóricos de  $K_i$  para os compostos contendo o nitro, tanto na posição *meta*, quanto na posição *para*, são os menores para cada série, evidenciando que a interação destes ligantes com a enzima pode ser mais forte do que com os demais compostos da série.

Os derivados *m*-nitro **6f**, **8f** e **10f** (Figura 20b) apresentam conformações bastante semelhantes, mostrando que as mudanças entre éster, ácido acético e ácido propiônico na cadeia alifática têm baixa influência nas interações com os resíduos do sítio ativo. Este fato também é observado para os demais compostos de cada série, que apresentam as mesmas interações já discutidas.

**Figura 20.** Comparação direta entre os compostos **8a** e **8f** com o ligante 53N a) e entre os compostos **6f**, **8f** e **10f**.

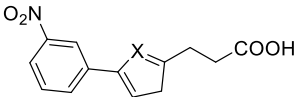
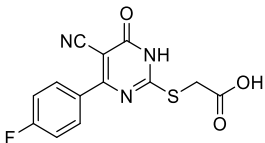
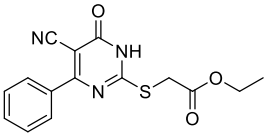
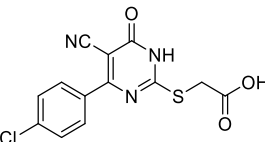
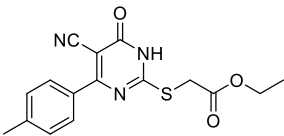
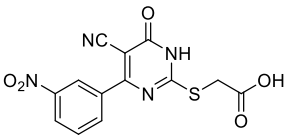
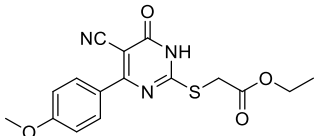
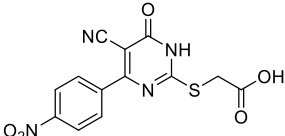


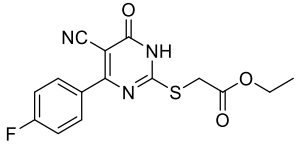
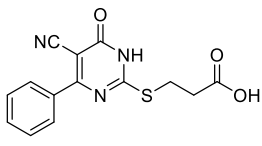
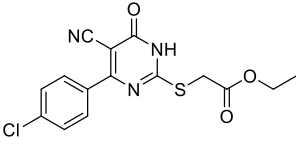
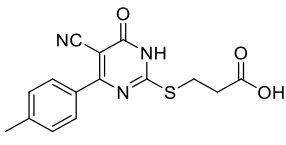
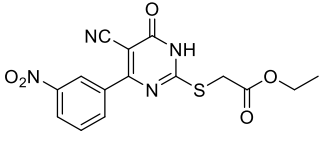
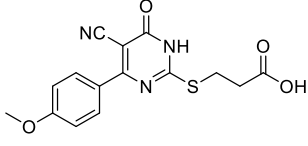
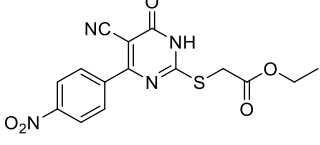
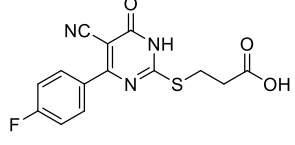
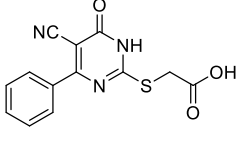
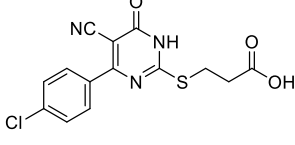
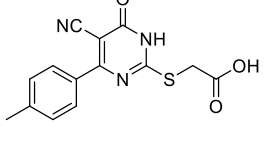
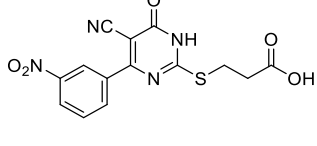
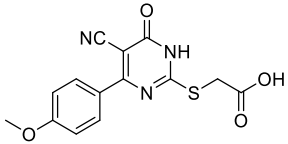
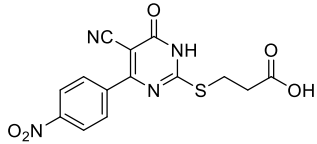
Fonte: A autora (2020)

Por outro lado, os valores de  $K_i$  de modo geral, indicam que a série dos ésteres apresentaria uma melhor inibição (menores valores de  $K_i$ ) em comparação com os derivados ácidos. Entretanto, isto não é observado nos resultados experimentais (ver Tabela 7), em que o

percentual de inibição para o derivado éster **6a** é menor do que para os compostos ácidos **8a** e **10a** (74, 100 e 85%, respectivamente). Estas discordâncias entre os resultados teóricos e experimentais em relação à inibidores da AR podem ser explicados pelos trabalhos de Sotriffer e Wang (SOTRIFTER et al., 2004; WANG et al., 2013). Os autores relatam que, ao estudar as estruturas cristalográficas da AR (PDB ID 2PDK (STEUBER, et al., 2008), 1US0 (HOWARD et al., 2004) e 2FZD (STEUBER, et al., 2006)), foram observadas três diferentes conformações dos resíduos em seu sítio ativo. Além disso, foi visto por estudos computacionais de dinâmica molecular que para a AR uma única estrutura não é suficiente para prever todas as interações que a enzima pode ter com os ligantes. Dessa forma, os valores obtidos de  $K_I$  para a estrutura estudada são aproximados e novos estudos teóricos com outras conformações da AR são necessários.

**Tabela 9.** Valores estimados de constante de inibição ( $K_I$ ) gerados pelo DM dos compostos na estrutura da AR.

| Estrutura Química<br>(Código)                                                                     | $K_I$ (nM) | Estrutura Química<br>(Código)                                                                     | $K_I$ (nM) |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <br><b>53N</b> | 52,5       | <br><b>8d</b> | 1590,0     |
| <br><b>6a</b>  | 290,2      | <br><b>8e</b> | 503,9      |
| <br><b>6b</b>  | 164,6      | <br><b>8f</b> | 250,3      |
| <br><b>6c</b>  | 80,0       | <br><b>8g</b> | 262,8      |

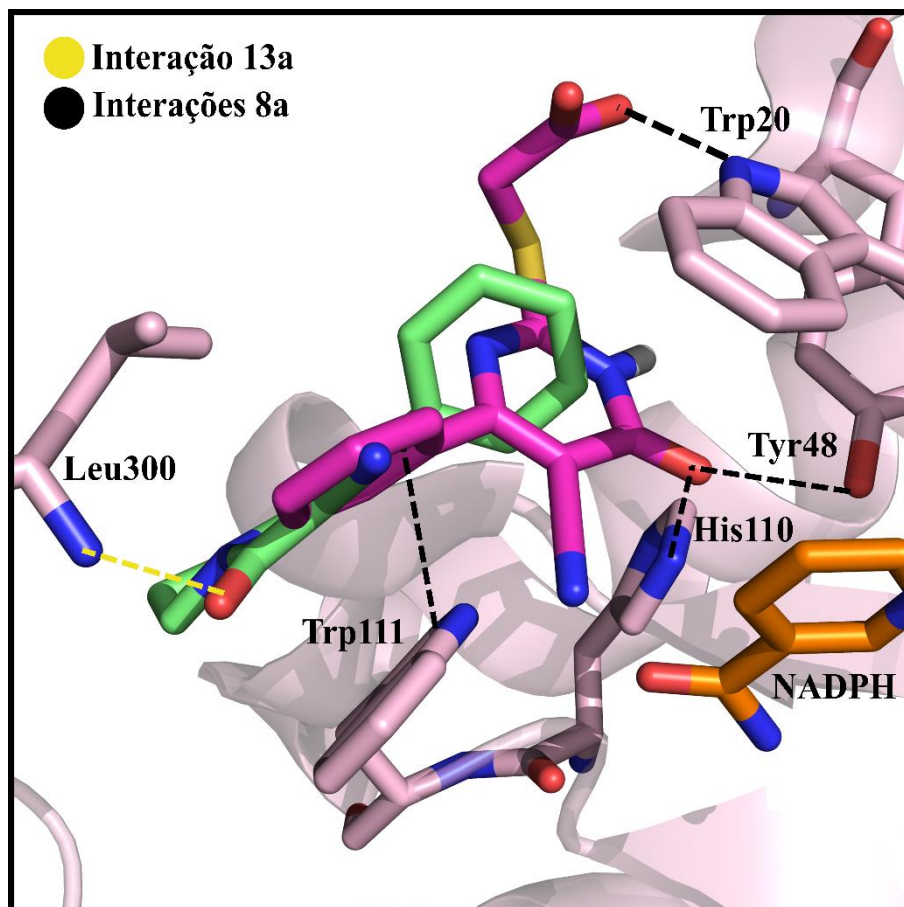
|                                                                                     |        |                                                                                      |        |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------|
|    | 443,2  |    | 1140,0 |
| <b>6d</b>                                                                           |        | <b>10a</b>                                                                           |        |
|    | 110,0  |    | 656,6  |
| <b>6e</b>                                                                           |        | <b>10b</b>                                                                           |        |
|    | 61,7   |    | 307,2  |
| <b>6f</b>                                                                           |        | <b>10c</b>                                                                           |        |
|   | 59,9   |   | 1920,0 |
| <b>6g</b>                                                                           |        | <b>10d</b>                                                                           |        |
|  | 1440,0 |  | 509,9  |
| <b>8a</b>                                                                           |        | <b>10e</b>                                                                           |        |
|  | 720,5  |  | 159,4  |
| <b>8b</b>                                                                           |        | <b>10f</b>                                                                           |        |
|  | 358,1  |  | 236,6  |
| <b>8c</b>                                                                           |        | <b>10g</b>                                                                           |        |

Fonte: A autora (2020)

As pirimidinonas-tiazolidinas (**13a-e**) apresentaram baixos percentuais de inibição e isso é também evidenciado pelo DM (Figura 21). Observa-se, na comparação entre o composto **8a** (carbonos em rosa) e **13a** (carbonos em verde), que o composto **13a** não apresenta uma conformação favorável à interação com os resíduos do sítio ativo, como foi observado para o

**8a** e demais compostos; portanto, é compreensível o valor tão baixo do percentual de inibição. Para os demais compostos da série das pirimidinonas-tiazolidinas observou-se a mesma conformação explicitada para o composto **13a**.

**Figura 21.** Comparação das conformações dos compostos **8a** e **13a** no sítio ativo da AR. NADPH com carbonos em laranja.



Fonte: A autora (2020)

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Síntese dos candidatos a inibidores da enzima Aldose Redutase

#### 4.1.1 Procedimentos gerais

Os reagentes e solventes empregados neste trabalho foram adquiridos dos fornecedores: Sigma-Aldrich, Merck, Vetec, Dinâmica e Neon. Os reagentes e solventes foram utilizados sem a necessidade de purificação extra, com exceção do benzaldeído, trietilamina e a dimetilformamida que foram secos e destilados. Para isso, utilizou-se os procedimentos descritos por Armarego e colaboradores (ARMAREGO; CHAI, 2003). A técnica de cromatografia de camada delgada (CCD) foi realizada utilizando placas de sílica da marca Fluka, contendo o indicador fluorescente F<sub>254</sub> que é sensível a luz ultravioleta no comprimento de onda de 366 nm. Para as purificações via cromatografia de coluna foi utilizada a sílica gel 60 (0.063-0.200 mm – 70-230 mesh)

#### 4.1.2 Equipamentos e técnicas utilizadas

As análises de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram realizadas na Central Analítica (UFPE) utilizando um espectrômetro *Varian URMNS* de 400 MHz. Para cada análise foram utilizados 30 mg de cada um dos compostos, e o solvente empregado em todas as análises foi o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d<sub>6</sub>). Para o processamento dos espectros foi utilizado o programa MestReNova, versão 12, pertencente à companhia Mestrelab Research S.L.

Os pontos de fusão determinados para cada composto foram realizados utilizando o equipamento Eletro-thermal modelo Mel-Temp do tipo analógico e não foram corrigidos.

#### 4.1.3 Síntese das 6-aril-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carbonitrilas (4a-e)

As 6-aril-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carbonitrilas foram preparadas utilizando o procedimento descrito por Kambe, Saito e Kishi (KAMBE et al., 1979a). Para isso, uma mistura contendo 10 mmol do aldeído aromático correspondente, 15 mmol de cianoacetato de etila, 15 mmol de tiouréia e 15 mmol de carbonato de potássio foram pesados e transferidos a um balão de fundo redondo com capacidade de 100 mL, que foi previamente envolto em papel alumínio para manter a reação protegida da luz. Por fim, adicionou-se 50 mL de etanol à mistura, que foi deixada sob agitação e refluxo por um período de 8 a 12 horas. O progresso da reação foi acompanhado por CCD (hexano:acetato de etila, 8:2 v/v), visando o consumo total do aldeído. Observando-se o final da reação pela CCD, a mistura foi transferida para um béquer contendo gelo, e adicionou-se água e ácido clorídrico concentrado até pH ácido e consequente

precipitação do produto. O precipitado foi filtrado a vácuo e posteriormente recristalizado em uma mistura de DMF, metanol e gelo. Como as 2-tiopirimidin-4-onas já são conhecidas na literatura, e serviram apenas de intermediário para as demais sínteses, os resultados de caracterização por RMN não foram descritos.

#### 4.1.4 Síntese dos Acetatos de 2-[(4-aril-5-ciano-6-oxo-1,6-diidropirimidin-2-il)tio]etila (6a-e)

Em um balão de fundo redondo com capacidade para 50 mL, adicionou-se a 6-aril-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carbonitrila correspondente (4,5 mmol) que foi dissolvida em 30 mL de acetona, em seguida adicionou-se o bromoacetato de etila (6,5 mmol) e a trietilamina (4,5 mmol). A mistura foi deixada sob agitação em temperatura ambiente por um período de até 2 horas. O progresso da reação foi acompanhado por CCD (hexano:acetato de etila, 1:1 v/v) visando o consumo total da tiopirimidinona. Ao final da reação, a mistura foi vertida em gelo e acidificada com HCl concentrado e observou-se a formação de um precipitado, que foi filtrado a vácuo e posteriormente recristalizado em uma mistura de acetona/hexano.

**Acetato de 2-[(5-ciano-6-oxo-4-fenil-1,6-diidropirimidin-2-il)tio]etila (6a):** sólido branco; rendimento 80%; P.F.: 232-234 °C; Rf: 0,30 (1:1 hexano:acetato de etila, v/v). RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1,09 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 4,06 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H, O- $\text{CH}_2$ ); 4,12 (s, 2H, S- $\text{CH}_2$ ); 7,54 – 7,63 (m, 3H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ); 7,89 – 7,91 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 13,8; 32,9; 61,3; 93,1; 115,7; 128,5; 128,6; 131,9; 135,0; 161,0; 165,2; 167,0; 168,0.

**Acetato de 2-[(5-ciano-6-oxo-4-(p-toluil)-1,6-diidropirimidin-2-il)tio]etila (6b):** sólido amarelo; rendimento 90%; P.F.: 230 °C (dec); Rf: 0,17 (1:1 hexano:acetato de etila, v/v). RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1,11 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 2,39 (s, 3H, Ph- $\text{CH}_3$ ); 4,07 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H, O- $\text{CH}_2$ ); 4,12 (s, 2H, S- $\text{CH}_2$ ); 7,37 (d,  $J = 8,1$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ); 7,83 (d,  $J = 8,1$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 13,9; 21,0; 32,9; 61,3; 92,5; 115,8; 128,7; 129,0; 132,1; 142,3; 161,1; 164,9; 166,7; 168,0.

**Acetato de 2-[(5-ciano-6-oxo-4-(4-metóxilfenil)-1,6-diidropirimidin-2-il)tio]etila (6c):** sólido branco; rendimento 83%; P.F.: 194-196 °C; Rf: 0,23 (1:1 hexano:acetato de etila, v/v). RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1,12 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 3,85 (s, 3H, O- $\text{CH}_3$ ); 4,08 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H, O- $\text{CH}_2$ ); 4,13 (s, 2H, S- $\text{CH}_2$ ); 7,10 (d,  $J = 8,9$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ); 7,97 (d,  $J = 8,9$

Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>). RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 13,9; 32,9; 55,5; 61,3; 91,4; 113,9; 116,1; 126,9; 130,8; 161,1; 162,4; 164,4; 166,0; 168,0.

**Acetato de 2-[(5-ciano-6-oxo-4-(4-fluorofenil)-1,6-diidropirimidin-2-il)tio]etila (6d):** sólido branco; rendimento 70%; P.F.: 228-230 °C; Rf: 0,23 (1:1 hexano:acetato de etila, v/v). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,08 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 4,06 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>); 4,13 (s, 2H, S-CH<sub>2</sub>); 7,39 – 7,44 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>); 7,97 – 8,01 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>). RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 13,9; 33,0; 61,3; 93,0; 115,5; 115,8; 131,3; 131,4; 161,0; 162,9; 165,2; 165,8; 168,0.

**Acetato de 2-[(5-ciano-6-oxo-4-(4-clorofenil)-1,6-diidropirimidin-2-il)tio]etila (6e):** sólido amarelo; rendimento 64%; P.F.: 215 °C (dec); Rf: 0,23 (1:1 hexano:acetato de etila, v/v). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,08 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 4,06 (q, *J* = 6,9 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>); 4,12 (s, 2H, S-CH<sub>2</sub>); 7,64 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>); 7,92 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>). RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 13,9; 33,0; 61,3; 93,3; 115,5; 128,6; 130,5; 133,7; 136,8; 160,9; 165,4; 165,7; 167,9.

#### 4.1.5 Síntese dos Ácidos 2-[(4-aril-5-ciano-6-oxo-1,6-diidropirimidin-2-il)tio]acéticos (8a-e)

Em um balão de fundo redondo com capacidade para 50 mL, adicionou-se a 6-aril-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carbonitrila correspondente (1,3 mmol) que foi dissolvida em 10 mL de acetona. Em seguida, adicionou-se o ácido bromoacético (2,0 mmol) e a trietilamina (3,25 mmol). A mistura foi deixada sob agitação em temperatura ambiente por um período de até cinco horas. O progresso da reação foi acompanhado por CCD (hexano:acetato de etila, 1:1 v/v), a partir do consumo total da tiopirimidinona de partida. Ao final da reação, a mistura foi vertida em gelo e acidificada com HCl concentrado e houve a formação de um precipitado, que foi filtrado a vácuo e posteriormente recristalizado em metanol.

**Ácido 2-[(5-ciano-6-oxo-4-fenil-1,6-diidropirimidin-2-il)tio]acético (8a):** sólido amarelo; rendimento 52%; P.F.: 218-220 °C. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 4,05 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 7,63 – 7,52 (m, 3H, H<sub>Ar</sub>); 7,97 – 7,91 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>). RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 33,3; 93,1; 115,9; 128,7; 128,9; 132,0; 135,1; 161,2; 165,5; 167,2; 169,3.

**Ácido 2-[(5-ciano-6-oxo-4-(*p*-toluil)-1,6-diidropirimidin-2-il)tio]acético (8b):** sólido branco; rendimento 60%; P.F.: 228-230 °C. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 2,39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 4,05 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 7,36 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>); 7,87 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm): 21,1; 33,1; 92,4; 115,9; 128,8; 129,1; 132,2; 142,3; 161,1; 165,2; 166,9; 169,2.

**Ácido 2-[(5-ciano-6-oxo-4-(4-metóxfenil)-1,6-diidropirimidin-2-il)tio]acético (8c):** sólido branco; rendimento 48%; P.F.: 197-200 °C. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm): 3,85 (s, 3H, O- $\text{CH}_3$ ); 4,05 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 7,08 – 7,14 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ); 7,99 – 8,06 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ).

**Ácido 2-[(5-ciano-6-oxo-4-(4-fluorofenil)-1,6-diidropirimidin-2-il)tio]acético (8d):** sólido branco; rendimento 60%; P.F.: 202-205 °C. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm): 4,06 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 7,40 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ); 8,03 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm): 29,1; 88,9; 111,6; 111,8; 127,5; 127,6; 157,0; 158,9; 161,4; 161,8; 165,2.

**Ácido 2-[(5-ciano-6-oxo-4-(4-clorofenil)-1,6-diidropirimidin-2-il)tio]acético (8e):** sólido branco; rendimento 65%; P.F.: 230 °C (dec). RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm): 4,05 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 7,60 – 7,67 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ); 7,92 – 8,00 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm): 33,2; 93,2; 115,6; 128,7; 130,6; 133,9; 136,8; 160,9; 165,7; 165,8; 169,2.

#### 4.1.6 Síntese dos Ácidos 3-[(4-aril-5-ciano-6-oxo-1,6-diidropirimidin-2-il)tio] propanóicos (10a-e)

Em um balão de fundo redondo com capacidade para 25 mL, adicionou-se a 6-aril-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carbonitrila correspondente (0,6 mmol) que foi dissolvida em 10 mL de acetona. Em seguida adicionou-se o ácido bromopropiônico (0,75 mmol) e a trietilamina (1,5 mmol). A mistura foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por um período 8 a 12h. O progresso da reação foi acompanhado por CCD (hexano:acetato de etila, 1:1 v/v) visando o consumo total da tiopirimidinona de partida. Ao final da reação, a mistura foi vertida em gelo e acidificada com ácido clorídrico concentrado e observou-se a formação de um precipitado, que foi filtrado a vácuo e posteriormente recristalizado em metanol.

**Ácido 3-[(5-ciano-6-oxo-4-fenil-1,6-diidropirimidin-2-il)tio] propanóico (10a):** sólido amarelo; rendimento 45%; P.F.: 240 °C (dec). RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm): 2,75 (t,  $J = 6,7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{-COOH}$ ); 3,39 (t,  $J = 6,7$  Hz, 2H, S- $\text{CH}_2$ ); 7,54 – 7,63 (m, 3H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ); 7,98 – 7,86 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm): 25,8; 33,5; 93,1; 115,9; 128,6; 128,7; 131,8; 135,3; 161,1; 165,9; 167,2; 172,7.

**Ácido 3-[(5-ciano-6-oxo-4-(*p*-toluil)-1,6-diidropirimidin-2-il)tio] propanóico (10b):** sólido branco; rendimento 58%; P.F.: 220-223 °C. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm): 2,39

(s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,74 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-COOH); 3,39 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H, S-CH<sub>2</sub>); 7,36 (d,  $J = 7,9$  Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>); 7,86 (d,  $J = 7,9$  Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>). RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 21,1; 25,8; 33,5; 92,5; 116,0; 128,7; 129,2; 132,4; 142,2; 161,1; 165,5; 167,0; 172,7.

**Ácido 3-[(5-ciano-6-oxo-4-(4-metóxfenil)-1,6-diidropirimidin-2-il)tio] propanóico (10c):** sólido amarelo; rendimento 75%; P.F.: 205-208 °C. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 2,74 (t,  $J = 6,7$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-COOH); 3,40 (t,  $J = 6,7$  Hz, 2H, S-CH<sub>2</sub>); 3,85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7,10 (d,  $J = 8,9$  Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>); 8,00 (d,  $J = 8,9$  Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>). RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 25,8; 33,5; 55,5; 91,4; 114,0; 116,3; 127,2; 130,8; 161,2; 162,3; 165,1; 166,2; 172,8.

**Ácido 3-[(5-ciano-6-oxo-4-(4-fluorofenil)-1,6-diidropirimidin-2-il)tio] propanóico (10d):** sólido branco; rendimento 64%; P.F.: 218-220 °C. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 2,74 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-COOH); 3,39 (t,  $J = 6,7$  Hz, 2H, S-CH<sub>2</sub>); 7,36 – 7,45 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>); 8,07 – 7,99 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>). RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 25,8; 33,5; 93,0; 115,6; 115,8; 131,4; 131,4; 161,0; 162,8; 165,3; 165,9; 172,7.

**Ácido 3-[(5-ciano-6-oxo-4-(4-clorofenil)-1,6-diidropirimidin-2-il)tio] propanóico (10e):** sólido amarelo; rendimento 45%; P.F.: 210-212 °C. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 2,73 (t,  $J = 6,7$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-COOH); 3,39 (t,  $J = 6,7$  Hz, 2H, S-CH<sub>2</sub>); 7,64 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>); 7,96 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>). RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 25,8; 33,5; 93,2; 115,7; 128,7; 130,5; 134,0; 136,6; 161,0; 166,0; 166,1; 172,7.

#### 4.1.7 Síntese das 2-[(2-hidróxietil)tio]-4-aril-6-oxo-1,6-diidropirimidina-5-carbonitrilas (12a-e)

As 2-[(2-hidróxietil)tio]-4-aril-6-oxo-1,6-diidropirimidina-5-carbonitrilas foram sintetizadas seguindo o procedimento preconizado por Feitosa, S. G. D. (FEITOSA, 2020) em que a 6-aril-4-oxo-2-tio-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carbonitrila correspondente (1,5 mmol) e o carbonato de potássio (3,0 mmol) foram pesados e transferidos para um balão reacional, em seguida adicionou-se 10 mL de DMF e o bromoetanol (2,2 mmol). A mistura foi deixada sob agitação em temperatura ambiente por um período de 8 a 12 horas. O progresso da reação foi acompanhado por CCD (hexano:acetato de etila, 1:1 v/v), visando o consumo total da tiopirimidinona de partida. Ao final da reação, a mistura foi vertida em gelo e acidificada com HCl concentrado e observou-se a formação de um precipitado, que foi filtrado a vácuo e posteriormente recristalizado em metanol/gelo, dando origem aos produtos **12a-e**, que foram usados na próxima etapa sem purificação adicional.

#### 4.1.8 Síntese das 7-Aril-5-oxo-2,3-diidro-5*H*-tiazolo[3,2-*a*]pirimidina-6-carbonitrilas (13a-e)

Em um frasco do tipo Schlenk com capacidade para 60 mL adicionou-se a 2-[(2-hidróxietil)tio]-4-aril-6-oxo-1,6-diidropirimidina-5-carbonitrila (**12a-e**) correspondente (1,3 mmol) e trifenilfosfina (2,0 mmol). O frasco foi fechado com septo de silicone e levado para secar sob vácuo. Em seguida foram adicionados 5 mL de DMF seca e destilada e (2,0 mmol) de diisopropil-azodicarboxilato (DIAD) ou dietil-azodicarboxilato (DEAD) (o DEAD foi utilizado como substituto do DIAD, isso não prejudica a formação do produto). A reação foi conduzida sob atmosfera inerte, agitação e temperatura de 100 °C por um período de até 18 horas. O final da reação foi observado por CCD (hexano:acetato de etila, 1:1 v/v), a partir do consumo total da tiopirimidinona álcool (compostos 12 a-e) de partida. Adicionou-se água à mistura reacional e esta foi transferida para um funil de separação. Realizou-se a extração com acetato de etila (3 x 10 mL). As fases orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O produto foi purificado através de coluna de sílica gel utilizando como fase móvel uma mistura de diclorometano:acetato de etila (9,5:0,5; v/v). Em alguns casos, em que houve a precipitação do produto após a adição de água, o mesmo foi filtrado a vácuo e recristalizado em diclorometano/hexano.

**5-Oxo-7-fenil-2,3-diidro-5*H*-tiazolo[3,2-*a*]pirimidina-6-carbonitrila (13a):** sólido branco; rendimento 85%; P.F.: 148-150 °C; Rf: 0,23 (1:1 hexano:acetato de etila, v/v). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ(ppm): 3,64 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H, S-CH<sub>2</sub>); 4,47 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H, N-CH<sub>2</sub>); 7,50 – 7,67 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>); 7,85 – 7,88 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>). RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ(ppm): 26,8; 49,4; 92,6; 115,7; 128,5; 128,6; 131,7; 134,9; 158,4; 168,3; 170,3.

**5-Oxo-7-(*p*-toluil)-2,3-diidro-5*H*-tiazolo[3,2-*a*]pirimidina-6-carbonitrila (13b):** sólido branco; rendimento 60%; P.F.: 233-235 °C; Rf: 0,23 (1:1 hexano:acetato de etila, v/v). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 2,39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,63 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H, S-CH<sub>2</sub>); 4,46 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H, N-CH<sub>2</sub>) 7,37 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>); 7,79 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>). RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 21,1; 26,8; 49,4; 92,0; 116,0; 128,6; 129,2; 132,1; 142,2; 158,6; 168,1; 170,1.

**7-(4-Metóxfenil)-5-oxo-2,3-diidro-5*H*-tiazolo[3,2-*a*]pirimidina-6-carbonitrila (13c):** sólido branco; rendimento 56%; P.F.: 233-235; Rf: 0,23 (1:1 hexano:acetato de etila, v/v). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 3,62 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H, S-CH<sub>2</sub>); 3,85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 4,45 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H, N-CH<sub>2</sub>); 7,08 – 7,14 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>); 7,90 – 7,96 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>). RMN de <sup>13</sup>C

(101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 26,7; 49,3; 55,5; 90,9; 114,0; 116,2; 126,8; 130,6; 158,7; 162,2; 167,3; 169,7.

**7-(4-Fluorofenil)-5-oxo-2,3-diidro-5H-tiazolo[3,2-a]pirimidina-6-carbonitrila (13d):**

sólido branco; rendimento 78%; P.F.: 228-230 °C (dec); Rf: 0,23 (1:1 hexano:acetato de etila, v/v). RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 3,64 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H, S- $\text{CH}_2$ ); 4,47 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H, N- $\text{CH}_2$ ); 7,38 – 7,44 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ); 7,92 – 7,98 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 26,8; 49,4; 92,5; 115,7; 115,9; 131,3; 131,3; 158,4; 162,8; 167,1; 170,4.

**7-(4-Clorofenil)-5-oxo-2,3-diidro-5H-tiazolo[3,2-a]pirimidina-6-carbonitrila (13e):**

sólido amarelo; rendimento 57%; P.F.: 244-247 °C (dec); Rf: 0,23 (1:1 hexano:acetato de etila, v/v). RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 3,64 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H, S- $\text{CH}_2$ ); 4,47 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H, N- $\text{CH}_2$ ); 7,63 – 9,67 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ); 7,87 – 7,90 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 26,8; 49,4; 92,7; 115,6; 128,7; 130,4; 133,6; 136,6; 158,3; 167,0; 170,5.

## 4.2 Ensaios *in vitro* para avaliação da inibição enzimática

Para avaliar a capacidade dos compostos sintetizados em inibirem a atividade da enzima Aldose Redutase (AR), foi utilizado o kit colorimétrico da BioVision Incorporated (Milpita, CA, N° K174-100). Como indicado pelo kit, os ensaios foram realizados utilizando placas de 96 poços de fundo redondo e para leitura dos dados foi utilizado o leitor de placas em absorvância BioTek ELx808. Todos os ensaios de inibição foram realizados no laboratório de entomologia do Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz PE. Os dados obtidos foram analisados e processados utilizando o programa GraphPad Prism7.

No kit da Aldose Redutase estão presentes os seguintes componentes:

- Tampão para AR (pH = 7,0)
- Ditiotreitól (DTT) (1 M)
- Substrato para AR
- Enzima AR
- NADPH
- Inibidor (controle positivo) Epalrestat (10 mM em DMSO)

Seguindo o protocolo do kit, inicialmente foram preparadas as seguintes soluções:

### **Soluções de DTT**

- Solução estoque: foi feita uma diluição de 100x a partir do DTT 1 M presente no kit para 10 mM. Para isso, 2  $\mu$ L de DTT foram adicionados em 198  $\mu$ L de água ultrapura.
- Solução de uso diluída em tampão: foi feita uma solução 10  $\mu$ M de DTT em tampão (pH = 7,0) presente no kit. Para isso, 2  $\mu$ L da solução estoque de DTT (10 mM) foram adicionados a 1998  $\mu$ L de tampão.

### **Soluções da AR**

- Solução estoque: a Aldose Redutase liofilizada presente no kit foi reconstituída adicionando-se 100  $\mu$ L da solução uso de DTT no tubo-mãe da enzima. Foram feitas alíquotas de 6  $\mu$ L e posteriormente estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- Solução de uso: a alíquota de 6  $\mu$ L da solução estoque da AR foi diluída em 534  $\mu$ L da solução uso de DTT. Cada teste necessita de 90  $\mu$ L da solução uso, com isso o volume de 540  $\mu$ L permite a realização de 6 testes. Durante manuseio, a enzima foi mantida a  $4^{\circ}\text{C}$

### **Soluções de NADPH**

- Solução estoque: o NADPH foi reconstituído adicionando-se 440  $\mu$ L de água ultrapura em seu tubo-mãe, resultando numa concentração de 20 mM. Foram feitas alíquotas de 20  $\mu$ L e posteriormente estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Solução de uso: a alíquota de 20  $\mu$ L da solução estoque foi diluída em 340  $\mu$ L de tampão. O volume final de 360  $\mu$ L permitiu a realização de 6 testes. Durante manuseio, a enzima foi mantida a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **Soluções das amostras**

- Solução padrão das amostras: uma solução de 50 mM de cada composto foi feita a partir da diluição de 5 mg do composto em DMSO (volume foi ajustado em cada composto para chegar na concentração desejada).
- Solução estoque: para a solução estoque a concentração deve ser 100x superior a concentração desejada no poço. Neste caso, foram realizadas as diluições a partir da solução padrão, utilizando DMSO como solvente e respeitando a concentração final desejada no poço. (Ex: para 50  $\mu$ M no poço, a solução estoque deve ter concentração igual a 5 mM. Deste modo, para obter 50  $\mu$ L da solução estoque (5 mM), foram diluídos 5  $\mu$ L da solução padrão (50 mM) em 45  $\mu$ L de DMSO).

- Solução uso: para a solução uso a concentração deve ser 20x superior a concentração desejada no poço. As diluições foram feitas a partir da solução estoque, utilizando desta vez o tampão (original do kit) como solvente. (Ex: para 50  $\mu\text{M}$  no poço, a solução uso deve ter concentração igual a 1 mM. Deste modo, para obter 50  $\mu\text{L}$  da solução uso (1 mM), foram diluídos 10  $\mu\text{L}$  da solução estoque (5 mM) em 40  $\mu\text{L}$  de tampão).

Após preparação de todas as soluções de uso, preparou-se a placa para realização do ensaio enzimático (Figura 22). Para isso, as seguintes amostras foram pipetadas nos poços:

1. **Amostra teste [A]:** 10  $\mu\text{L}$  da solução da solução uso (20x) da amostra a ser testada.
2. **Controle enzimático [CE] (controle negativo):** 10  $\mu\text{L}$  da solução tampão do kit.
3. **Controle de inibição [CI] (controle positivo):** 10  $\mu\text{L}$  da solução de Epalrestat, que foi preparada pela diluição de 2  $\mu\text{L}$  da solução padrão presente no kit em 198  $\mu\text{L}$  da solução tampão.
4. **Controle do solvente [CS]:** 10  $\mu\text{L}$  da mistura DMSO/tampão na proporção 1:5 mimetizando a razão presente no poço da amostra teste [S]. Este teste faz-se necessário para verificar se o solvente orgânico reduz a atividade da enzima AR.
5. **Solução do branco [CB]:** a solução do branco não deve conter a enzima AR, devido a isso adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  do tampão em cada poço do [BC] para manter o volume final de 200  $\mu\text{L}$ , como indicado pelo kit.

Em seguida, adicionou-se aos poços 60  $\mu\text{L}$  da solução de uso do NADPH e 90  $\mu\text{L}$  da solução de uso da AR (exceto nos poços referentes ao branco [BC]). Ao final desta etapa, todos os poços continham um volume de 160  $\mu\text{L}$ .

A placa foi então incubada na temperatura de 37 °C por 20 minutos, protegida da luz. Posteriormente, adicionou-se 40  $\mu\text{L}$  da solução uso do substrato, preparada pela diluição de 4  $\mu\text{L}$  da solução padrão do substrato em 36  $\mu\text{L}$  da solução tampão. Feito isso, o volume final em cada poço foi de 200  $\mu\text{L}$ .

Imediatamente após a adição de todos os componentes, a placa foi inserida no leitor de placas, onde foi realizada a aquisição dos dados no modo cinético por um período de 60-90 minutos, em intervalos de 1 minuto. O tratamento dos dados foi feito de acordo com as instruções expressas no kit. Primeiramente foram plotados todos os dados de absorbância em função do tempo, e foram escolhidos dois pontos da região linear da curva para estimar a porcentagem de inibição. Os pontos escolhidos foram aqueles com  $t_1 = 40 \text{ min}$  e  $t_2 = 50 \text{ min}$ . A seguinte equação foi utilizada para encontrar a porcentagem de inibição:

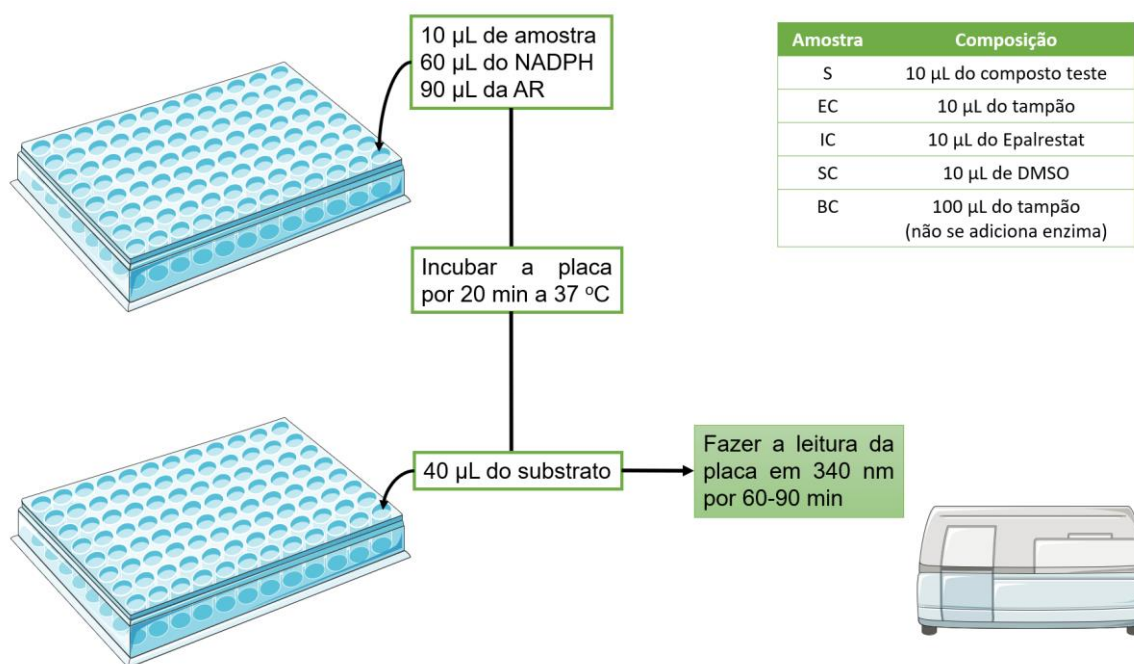
$$\% \text{ inibição relativa} = \frac{(\text{inclinação de } [EC] - \text{inclinação de } [S])}{\text{inclinação de } [EC]} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

As respectivas inclinações foram calculadas a partir da variação dos valores de absorbância nos pontos escolhidos, dividida pela variação de tempo (Equação 2).

$$\text{Inclinação} = \frac{(A_1 - A_2)}{(T_2 - T_1)} \quad (\text{Equação 2})$$

Para a amostra onde obteve-se o  $CI_{50}$  foi utilizado o mesmo protocolo para diferentes concentrações do composto **8a** (Ácido 2-[(5-ciano-6-oxo-4-fenil-1,6-diidropirimidin-2-il)tio]acético), em que as concentrações testadas foram 0,05  $\mu\text{M}$ ; 0,5  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$ ; 25  $\mu\text{M}$ ; 40  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ .

**Figura 22.** Representação da metodologia para realização do ensaio enzimático.



Fonte: A autora (2020)

### 4.3 Docking Molecular dos compostos na estrutura cristalográfica da AR

Para os estudos *in silico*, uma busca no Banco de Dados de Proteínas (do inglês, *Protein Data Bank*) foi inicialmente realizada, onde foi selecionada a estrutura da Aldose Redutase com código PDB 3DN5 (EISENMANN et al., 2009). Esta estrutura foi escolhida em detrimento a outras devido à semelhança do seu ligante cocrystalizado (53N) em comparação com os compostos sintetizados neste trabalho.

Após a escolha da estrutura cristalográfica, foram realizadas as etapas de preparo da enzima, do cofator e dos ligantes para proceder com o *docking molecular*. As etapas de *docking molecular* entre os candidatos a inibidores e o alvo (AR) foram realizados utilizando o programa *AutoDockTools* versão 4.2 (MORRIS et al., 2009).

**Preparo da enzima:** o arquivo de coordenadas original (extensão .pdb) foi editado para separar em diferentes arquivos a proteína, o cofator NADPH e o ligante cocrystalizado. O novo arquivo .pdb contendo as coordenadas apenas da proteína foi editado utilizando o programa *AutoDockTools* para adicionar átomos de hidrogênios ligados à átomos polares de acordo com o pKa de cada resíduo e computar cargas do tipo Kollman (BAYLY et al., 1993). Por fim, com a proteína apresentando valor de carga inteiro, o arquivo foi salvo na extensão .pdbqt.

**Preparo do cofator:** o arquivo de coordenadas do cofator NADPH também foi editado pelo *AutoDockTools* para adicionar os átomos de hidrogênios ligados à átomos polares e computar cargas, mas aqui utiliza-se cargas do tipo Gasteiger, pois as cargas Kollmann foram construídas para cadeias de aminoácidos (GASTEIGER; MARSILI, 1980). O cofator foi então salvo na extensão .pdbqt, assim como a proteína. Em seguida, as coordenadas do cofator foram adicionadas ao arquivo .pdbqt da proteína para gerar um único arquivo do receptor utilizando um editor de texto. O arquivo final contendo as coordenadas e cargas da AR e seu cofator foram novamente analisados no *AutoDockTools*, com intuito de avaliar se as cargas assinaladas apresentavam alguma divergência, e em seguida o arquivo do receptor estava pronto para o *docking molecular*.

**Preparo dos ligantes (inibidores):** as estruturas de todas as moléculas sintetizadas neste trabalho foram primeiramente construídas utilizando o programa *Chem3D* e salvas na extensão .mol2. Esses arquivos foram posteriormente editados no programa *PyMOL* para mover as coordenadas dos ligantes para próximo do sítio ativo da AR e as novas coordenadas foram salvas em extensão .pdb. Em seguida, cada ligante foi então editado no *AutoDockTools* para adição de hidrogênios ligados à átomos polares e cargas Gasteiger.

Com os arquivos dos ligantes e da AR preparados, foram gerados os mapas de energia eletrostática e afinidade atômica do ligante, calculados pelo programa *AutoGrid 4*. Para isso, foi gerada uma caixa reticulada com dimensões de 126 x 126 x 126 pontos, com espaçamentos entre os pontos de 0,22 Å. A caixa foi centralizada no ligante cocrystalizado (53N), com os valores de coordenadas (x, y, z) iguais a 16,054; 10,109; -13,0. Estes parâmetros de caixa foram replicados para todos os ligantes testados. Por fim, foi feito o *docking molecular* com o

programa *AutoDock 4*, com um máximo de 200 passos, em que para cada molécula o tempo de simulação variou entre 40-60 minutos, como parâmetro de busca foi utilizado o algoritmo genético lamarckiano (MORRIS et al., 1998).

No arquivo de saída do *AutoDock4* (extensão .dlg), é possível extrair informações como a distribuição, as coordenadas e os valores de energia livre de Gibbs e a constante de inibição das conformações de menor energia em *clusters*. A partir dele, foi construído um arquivo .pdb contendo as coordenadas da conformação de menor energia de cada cluster para avaliação das interações ligante-receptor. As interações, bem como as figuras apresentadas neste trabalho foram observadas e geradas no programa PyMOL.

## 5 CONCLUSÃO

Através da funcionalização das 2-tiopirimidin-4-onas com porções éster, ácido acético, ácido propiônico, e via ciclização mediada pela reação de Mitsunobu, foram obtidos vinte compostos dos quais doze apresentam-se como compostos inéditos. Estes compostos apresentaram faixa de rendimento entre 45-90% e forma caracterizados por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

Alguns dos compostos sintetizados foram testados como potenciais inibidores da enzima aldose redutase (AR). A maioria dos compostos apresentou percentual de inibição perante a AR acima de 74% em uma concentração de 50  $\mu\text{M}$ , com exceção dos compostos obtidos pela via de Mitsunobu, que resultaram num percentual de inibição em torno de 15%, e, portanto, são candidatos pouco promissores no tocante a inibição da enzima.

Dentre os compostos que obtiveram melhores resultados, o composto **8a** apresentou uma inibição de 100% a 50  $\mu\text{M}$ . Com isso, foram realizados testes de inibição em diferentes concentrações deste composto, e a concentração inibitória de 50% da atividade enzimática ( $\text{CI}_{50}$ ) foi obtida a partir da curva dose-resposta que foi de  $8 \pm 1 \mu\text{M}$ .

Com a finalidade de obter um melhor entendimento a nível molecular da relação entre os compostos testados com a enzima AR, foram realizados estudos por meio de simulações computacionais de *Docking Molecular*, utilizando a estrutura cristalográfica disponível no banco de dados de proteínas com código PDB 3DN5. A partir desses estudos, foi visto que os ligantes interagem com os resíduos Tyr48, His110, Trp20 e Trp11, e alguns deles também interagem com Leu300, resíduos que fazem parte do bolso catalítico da AR e são importantes na catálise. Além disso, verificou-se que os compostos obtidos pela via de Mitsunobu apresentaram pouca interação com os resíduos do sítio ativo da AR, corroborando com os baixos percentuais de inibição observados experimentalmente.

Algumas moléculas apresentaram inconsistências na comparação entre os resultados experimentais de inibição e os resultados teóricos, contudo, essa divergência foi associada com as diferentes conformações observadas no sítio catalítico da AR, sendo necessário realizar simulações com diferentes estruturas cristalográficas da AR para um melhor entendimento das interações enzima-inibidor.

## 6 PERSPECTIVAS

Os estudos de *docking molecular* realizados neste trabalho mostraram que as substâncias contendo o grupo nitro como substituinte (compostos **6f**, **6g**, **8f**, **8g**, **10f** e **10g**) apresentam interações importantes para a inibição da AR, o que resultaria em protótipos de maior interesse farmacológico. Desta forma, pretende-se prosseguir com as etapas de síntese desses compostos e posteriormente realizar os testes de inibição para estes candidatos, como também para os demais compostos das séries **6a-e** e **10a-e**.

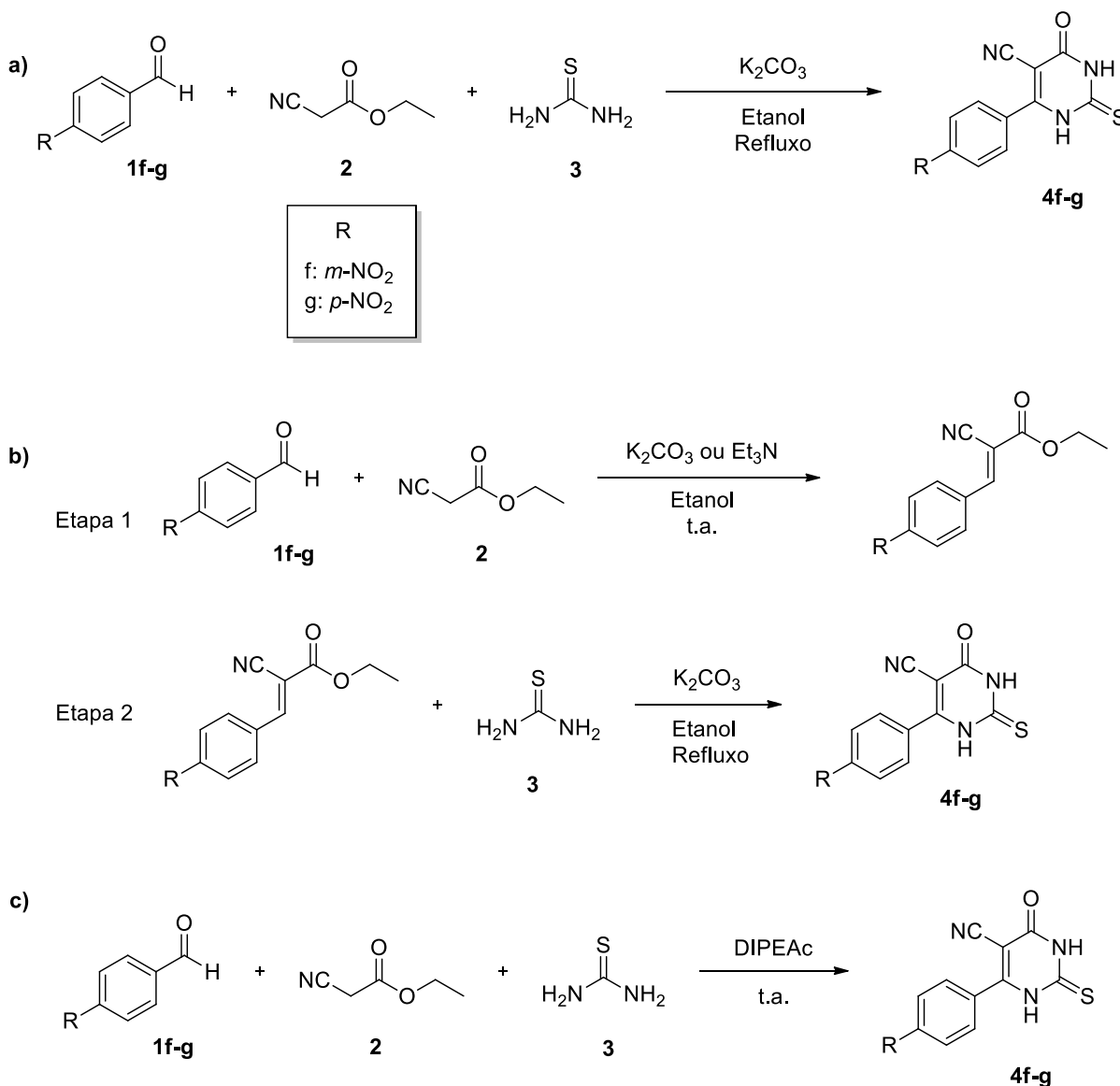
Os compostos **6f**, **6g**, **8f**, **8g**, **10f** e **10g** necessitam das 2-tiopirimidin-4-onas (**4f-g**) como precursores iniciais para sintetizá-los. Normalmente, a síntese dos compostos **4f-g** poderia ser feita a partir da mesma rota sintética utilizada para a série **4a-e** (Esquema 10a). No entanto, não se obteve sucesso com esta rota para a síntese dos nitrocompostos; a reação resultava em uma mistura complexa de subprodutos, o que causava problemas nas etapas de purificação, dificultando a obtenção do produto.

Outras rotas sintéticas serão abordadas na tentativa de sanar este problema. Uma das rotas que será investigada se dá em duas etapas (e não em reação multicomponente, como preconizado até o momento para a síntese das tiopirimidinonas): a primeira etapa consiste na reação entre o respectivo aldeído aromático (**1f-g**) e o cianoacetato de etila (**2**) em meio alcalino para formação do intermediário de Michael, que depois de isolado, será utilizado na segunda etapa da síntese, com a reação entre este e a tiouréia (**3**) para formação do anel pirimidínico (Esquema 10b).

Uma outra rota sintética que será testada para formação de **4f-g** foi relatada recentemente por Jadhav e colaboradores, em que a reação multicomponente ocorre por intermédio do líquido iônico, acetato de diisopropiletil amônio (DIPEAc) (Esquema 10c) (JADHAV et al., 2019).

Ainda com relação aos candidatos a inibidores, será necessário a realização de caracterizações complementares, como a espectroscopia na região do infravermelho e a espectrometria de massas ou análise elementar. Principalmente, para os compostos da série **13a-e**, sintetizados pela estratégia de Mitsunobu, em que se observou que os espectros de RMN dão indícios, mas não confirmam a ciclização do produto. A realização de experimentos de infravermelho para os compostos de partida (álcoois) e seus respectivos produtos ciclizados forneceria maior validação para estes resultados.

**Esquema 10.** Possíveis rotas sintéticas que serão abordadas para a síntese dos compostos **4f-g**.



Fonte: a autora (2020) e extraído de (JADHAV et al., 2019)

Na parte dos estudos computacionais por meio do *docking molecular*, pretende-se realizar as simulações em estruturas cristalográficas com diferentes conformações da AR, com base no estudo realizado por Wang e colaboradores, no qual o autor realiza as simulações de DM para três diferentes conformações do sítio ativo da AR (WANG et al., 2013). Dessa forma, poderão ser obtidos resultados mais confiáveis sobre as interações dos candidatos a inibidores, com os resíduos do sítio ativo da enzima. Estes novos resultados de DM poderão fornecer subsídios para a predição de melhores candidatos a fármacos anti-AR *in silico*, e que poderão ser sintetizados futuramente

## REFERÊNCIAS

- ABD EL-FATAH, N. A. et al. Experimental and theoretical study on the regioselective bis- and polyalkylation of 2-mercaptocotinonitrile and 2-mercaptopyrimidine-5-carbonitrile derivatives. **Tetrahedron**, v. 73, n. 11, p. 1436–1450, 2017.
- ABDEL-MEGID, MOHAMED; AWAS, MOHAMED; SEADA, MAGDY; ELMAHDY, KAMELIA; EL-SAYED, M. A convenient synthesis of some new bioactive diheterocyclic thioether and thiazolopyrimidine derivatives. **Acta Chimica Slovenica**, v. 56, n. 4, p. 852–859, 2009.
- AGRAFIOTIS, D. K. et al. Conformational Sampling of Bioactive Molecules: A Comparative Study. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 47, n. 3, p. 1067–1086, 6 maio 2007.
- AHMED, N. M. et al. Design, synthesis, molecular modelling, and biological evaluation of novel substituted pyrimidine derivatives as potential anticancer agents for hepatocellular carcinoma. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 1110–1120, 1 jan. 2019.
- ALLEGRETTI, P. et al. Enol and Enethiol Occurrence for Some Ketones and Thioketones. Mass Spectrometry and Theoretical Calculations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 5, n. 11, p. 294–300, 30 nov. 2004.
- ARMAREGO, W. L. F.; CHAI, C. L. L. **Purification of laboratory chemicals**. [s.l.] Elsevier Inc., 2003.
- BAYLY, C. I. et al. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: The RESP model. **Journal of Physical Chemistry**, v. 97, n. 40, p. 10269–10280, 1993.
- BORIK, R. M. et al. Design, synthesis, anticancer evaluation and docking studies of novel heterocyclic derivatives obtained via reactions involving curcumin. **Molecules**, v. 23, n. 6, 2018.
- BOSCO, A. et al. **Diabetic retinopathy** Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia ABE&M, , 2005.
- BROWN, D. J. Pyrimidines and their benzoderivatives. **Comprehensive Heterocyclic Chemistry: Katritzky, A. R.; Rees, C. W.; Eds. Pergamon Press: Oxford**, v. 3, p. 57–155, 1984.
- BROWNLEE, M. et al. **Complications of Diabetes Mellitus**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016.
- CHELONI, R. et al. Global prevalence of diabetic retinopathy: protocol for a systematic review and meta-analysis. **BMJ Open**, v. 9, n. 3, p. e022188, 3 mar. 2019.
- CHITRE, TRUPTI S.; BOTHARA, K. G. Synthesis of some uracil derivatives using ionic liquid. **Chemica Sinica**, v. 2, n. 2, p. 187–193, 2011.
- DE ANDRADE, A. N. et al. Vasoactive Thiomethyl-Pyrimidines: Promising Drug Candidates with Vascular Activity. **Article J. Braz. Chem. Soc**, v. 28, n. 7, p. 1266–1273, 2017.
- EISENMANN, M. et al. Structure-Based Optimization of Aldose Reductase Inhibitors Originating from Virtual Screening. **ChemMedChem**, v. 4, n. 5, p. 809–819, 11 maio 2009.
- ELLINGBOE, J. et al. (Pyrimidinyloxy)acetic Acids and Pyrimidineacetic Acids as a Novel Class of Aldose Reductase Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 10, p. 2892–

2899, 1990.

FEITOSA, S. G. D. **2-TIOPIRIMIDINONAS: Síntese, funcionalização e avaliação do potencial de inibição para a enzima aldose redutase.** [s.l.] UFPE, 2020.

FERREIRA, L. G. et al. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384–13421, 1 jul. 2015.

GABBAY, K. H. et al. Aldose reductase inhibition: Studies with alrestatin. **Metabolism**, v. 28, n. 4, p. 471–476, 1 abr. 1979.

GALAL, S. A. et al. Part III: Novel checkpoint kinase 2 (Chk2) inhibitors; design, synthesis and biological evaluation of pyrimidine-benzimidazole conjugates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 146, p. 687–708, 2018.

GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity-a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v. 36, n. 22, p. 3219–3228, 1 jan. 1980.

GORELIK, B.; GOLDBLUM, A. High quality binding modes in docking ligands to proteins. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 71, n. 3, p. 1373–1386, 3 dez. 2007.

GOTTLIEB, H. E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, n. 21, p. 7512–7515, 1997.

HAMMES, H. P. et al. Antioxidant treatment of experimental diabetic retinopathy in rats with nicanartine. **Diabetologia**, v. 40, n. 6, p. 629–634, 30 maio 1997.

HERS, H. G. The mechanism of the transformation of glucose in fructose in the seminal vesicles. **Biochimica et biophysica acta**, v. 22, n. 1, p. 202–203, 1 out. 1956.

HOWARD, E. I. et al. Ultrahigh resolution drug design I: Details of interactions in human aldose reductase-inhibitor complex at 0.66 Å. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 55, n. 4, p. 792–804, 1 abr. 2004.

HUANG, S. Y.; GRINTER, S. Z.; ZOU, X. Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: Recent advances and future directions. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 40, p. 12899–12908, 28 out. 2010.

HUGHES, D. L. Progress in the Mitsunobu reaction. A review. **Organic Preparations and Procedures International**, v. 28, n. 2, p. 127–164, 1 abr. 1996.

HUSSAIN, S. M. et al. **Reactions with 2-mercaptopyrimidines. Synthesis of some new thiazolo[3,2-a]- and triazolo[4,3-a]pyrimidines** *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 1987.

JADHAV, C. K. et al. Efficient Rapid Access to Biginelli for the Multicomponent Synthesis of 1,2,3,4-Tetrahydropyrimidines in Room-Temperature Diisopropyl Ethyl Ammonium Acetate. **ACS Omega**, v. 4, n. 27, p. 22313–22324, 2019.

JIN, K. J. et al. Discovery of biphenyl-substituted diarylpyrimidines as non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors with high potency against wild-type and mutant HIV-1. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 145, p. 726–734, 10 fev. 2018.

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, 4 abr. 1997.

KAMBE, S. et al. A one-step synthesis of 4-oxo-2-thioxopyrimidine derivatives by the ternary condensation of ethyl cyanoacetate, aldehydes, and thiourea. **Georg Thieme Publishers**, v. 1979, n. 4, p. 287–289, 1 abr. 1979a.

- KAMBE, S. et al. ChemInform Abstract: A ONE-STEP SYNTHESIS OF 4-OXO-2-THIOXOPYRIMIDINE DERIVATIVES BY THE TERNARY CONDENSATION OF ETHYL CYANOACETATE, ALDEHYDES, AND THIOUREA. **Chemischer Informationsdienst**, v. 10, n. 31, 31 jul. 1979b.
- KAPPE, C. O. Biologically active dihydropyrimidones of the Biginelli-type - A literature survey. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 12, p. 1043–1052, dez. 2000.
- KATO, N. et al. Long-term treatment with fidarestat suppresses the development of diabetic retinopathy in STZ-induced diabetic rats. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 17, n. 6, p. 374–379, 1 nov. 2003.
- KHALIL, Z. H.; HAFEZ, A. A. A.; AHMED, A. A. New pyrimidine derivatives: Synthesis and application of thiazolo[3, 2-a]-triazolo[4, 3-a]-pyrimidine as bactericides, fungicides and bioregulators. **Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements**, v. 45, n. 1–2, p. 81–93, 1989.
- KIRK, J. E. **Enzymes of the Arterial Wall**. [s.l.] Elsevier, 1969.
- KRAEMER, O. et al. Virtual screening for inhibitors of human aldose reductase. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 55, n. 4, p. 814–823, 1 abr. 2004.
- LA MOTTA, C. LA et al. Pyrido[1,2-a]pyrimidin-4-one derivatives as a novel class of selective aldose reductase inhibitors exhibiting antioxidant activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 20, p. 4917–4927, 20 out. 2007.
- MADHU SEKHAR, M. et al. Synthesis and antimicrobial activity of pyrimidinyl 1,3,4-oxadiazoles, 1,3,4-thiadiazoles and 1,2,4-triazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 145, p. 1–10, 10 fev. 2018.
- MARTOS-CALVENTE, R. et al. The Usefulness of Density Functional Theory to Describe the Tautomeric Equilibrium of 4,6-Dimethyl-2-mercaptopyrimidine in Solution. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 107, n. 38, p. 7490–7495, 25 set. 2003.
- MENG, X.-Y. et al. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. **Current Computer Aided-Drug Design**, v. 7, n. 2, p. 146–157, 11 nov. 2011.
- MOHAMED, M. S.; YOUNS, M. M.; AHMED, N. M. Synthesis, antimicrobial, antioxidant activities of novel 6-aryl-5-cyano thiouracil derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 69, p. 591–600, 2013.
- MORRIS, G. M. et al. Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: Parallel applications of AutoDock 2.4. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 10, n. 4, p. 293–304, 1996.
- MORRIS, G. M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of computational chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639–1662, 1998.
- MORRIS, G. M. et al. Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.
- MORRIS, G. M.; LIM-WILBY, M. Molecular docking. **Methods in Molecular Biology**, v. 443, p. 365–382, 2008.
- MORRISON, A. D. et al. Glucose utilization by the polyol pathway in human erythrocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 40, n. 1, p. 199–205, 13 jul. 1970.

MURUSSI, M. et al. Diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus: risk factors and prevention. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 3, p. 207–219, jun. 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4. ed. [s.l.] W. H. Freeman, 2004.

NICHOLSON, B. P.; SCHACHAT, A. P. **A review of clinical trials of anti-VEGF agents for diabetic retinopathy** Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology Springer, , 20 jul. 2010.

OGAWVA, K. et al. Syntheses of substituted 2,4-dioxo-thienopyrimidin-1-acetic acids and their evaluation as aldose reductase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 769–781, 1993a.

OGAWVA, K. et al. Syntheses of substituted 2,4-dioxo-thienopyrimidin-1-acetic acids and their evaluation as aldose reductase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 769–781, 1993b.

PEARSON, R. G. Hard and Soft Acids and Bases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 22, p. 3533–3539, 1 nov. 1963.

PRADHAN, R. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition for the treatment of moderate to severe diabetic retinopathy in normotensive Type 2 diabetic patients: A pilot study. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 16, n. 6, p. 377–381, nov. 2002.

RAM, V. J.; VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Chemotherapeutical Agents, V. Syntheses and Activities of Novel Pyrimidines Derived from 5-Cyano-6-aryl-2-thiouracil. **Liebigs Annalen der Chemie**, v. 1987, n. 9, p. 797–801, 1987.

RAMANA, K. V. **Aldose reductase: New insights for an old enzyme** Biomolecular Concepts Walter de Gruyter GmbH, , 1 abr. 2011. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/view/journals/bmc/2/1-2/article-p103.xml>>. Acesso em: 13 maio. 2020

RAMIREZ, M. A.; BORJA, N. L. **Epalrestat: An aldose reductase inhibitor for the treatment of diabetic neuropathy** Pharmacotherapy, maio 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1592/phco.28.5.646>>. Acesso em: 20 maio. 2020

RAMIZ, M. M. M. et al. Synthesis and antiviral activity of new substituted pyrimidine glycosides. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1028–1038, 1 set. 2011.

ROBISON, W. G.; KADOR, P. F.; KINOSHITA, J. H. Retinal capillaries: Basement membrane thickening by galactosemia prevented with aldose reductase inhibitor. **Science**, v. 221, n. 4616, p. 1177–1179, 1983.

ROWLING, J. K. **Very Good Lives: The Fringe Benefits of Failure and the Importance of Imagination**. 1. ed. [s.l.] Sphere, 2015.

SACCO, I. et al. Avaliação das perdas sensório-motoras do pé e tornozelo decorrentes da neuropatia diabética. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 11, n. 1, p. 27–33, fev. 2007.

SINGH GREWAL, A. et al. Updates on Aldose Reductase Inhibitors for Management of Diabetic Complications and Non-diabetic Diseases. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 120–162, 20 nov. 2015.

SOTRIFFER, C. A.; KRÄMER, O.; KLEBE, G. Probing flexibility and “induced-fit” phenomena in aldose reductase by comparative crystal structure analysis and molecular dynamics simulations. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 56, n. 1, p. 52–66, 1

jul. 2004.

SOUSA, S. F.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. **Protein-ligand docking: Current status and future challenges** *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 1 out. 2006.

STEUBER, H.; HEINE, A.; PODJARNY, A.; KLEBE, G. Merging the binding sites of aldose and aldehyde reductase for detection of inhibitor selectivity-determining features. **J. Mol. Biol.**, v. 5, p. 991–1016, 2008.

STEUBER H, ZENTGRAF M, GERLACH C, SOTRIFFER CA, HEINE A, K. G. Expect the unexpected or caveat for drug designers: multiple structure determinations using aldose reductase crystals treated under varying soaking... - PubMed - NCBI. **J. Mol. Biol.**, v. 1, p. 174–187, 2006.

TANG, W. H.; MARTIN, K. A.; HWA, J. Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3 MAY, 2012.

UGI, I.; DÖMLING, A.; HÖRL, W. Multicomponent reactions in organic chemistry. **Endeavour**, v. 18, n. 3, p. 115–122, 1 jan. 1994.

VARMA, S. D.; KINOSHITA, J. H. Inhibition of lens aldose reductase by flavonoids-Their possible role in the prevention of diabetic cataracts. **Biochemical Pharmacology**, v. 25, n. 22, p. 2505–2513, 15 nov. 1976.

VLIETINCK, D. A. V. B. AND A. J. 5-Cyano-6-arylracil and 2-Thiouracil Derivatives as Potential Chemotherapeutic Agents. IV. **J. Heterocyclic Chemistry**, v. 21, p. 1307–1312, 1984.

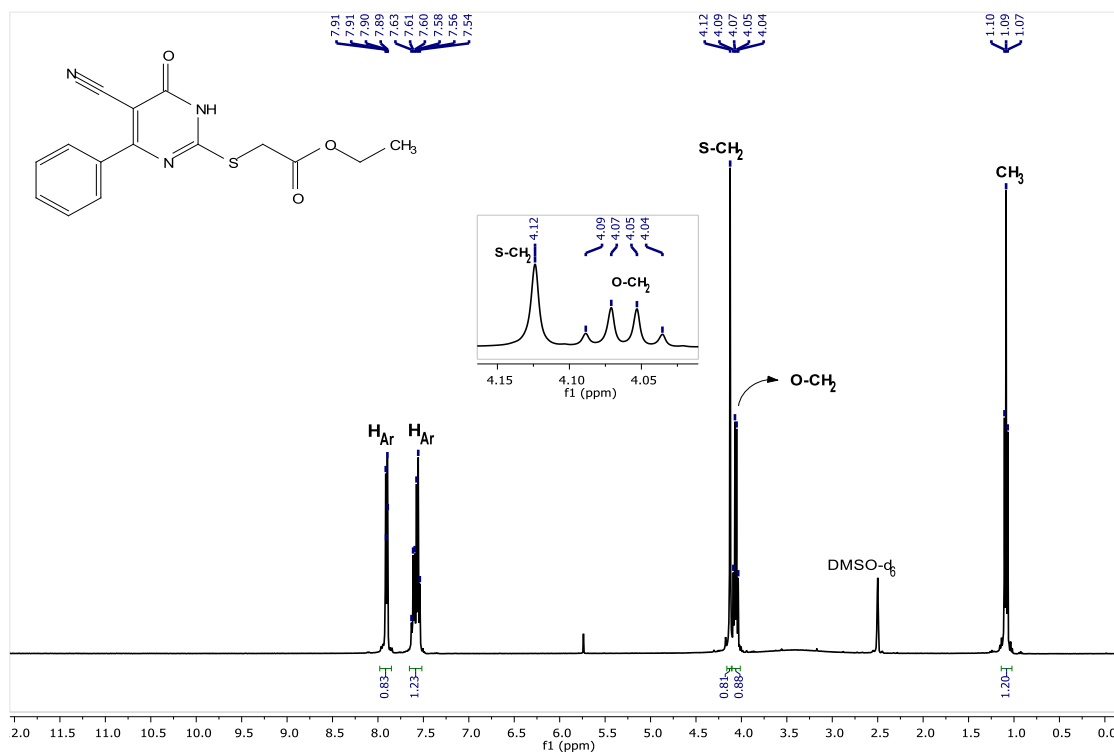
WANG, L. et al. Discovery of new selective human aldose reductase inhibitors through virtual screening multiple binding pocket conformations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 2409–2422, 23 set. 2013.

XAVIER, A. L. et al. Antinociceptive pyrimidine derivatives: Aqueous multicomponent microwave assisted synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 26, p. 3462–3465, 26 jun. 2013.

YURIEV, E.; AGOSTINO, M.; RAMSLAND, P. A. **Challenges and advances in computational docking: 2009 in review** *Journal of Molecular Recognition* *J Mol Recognit*, mar. 2011.

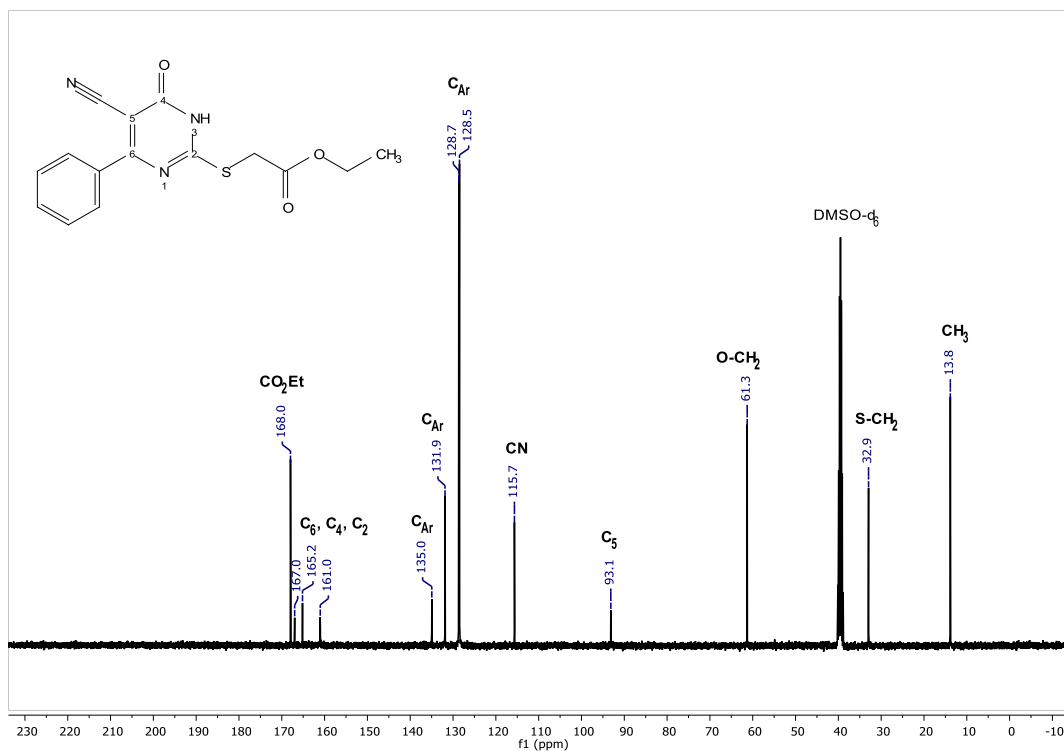
## APÊNDICE A – ESPECTROS DE RMN

**Figura 1.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) de **6a**.

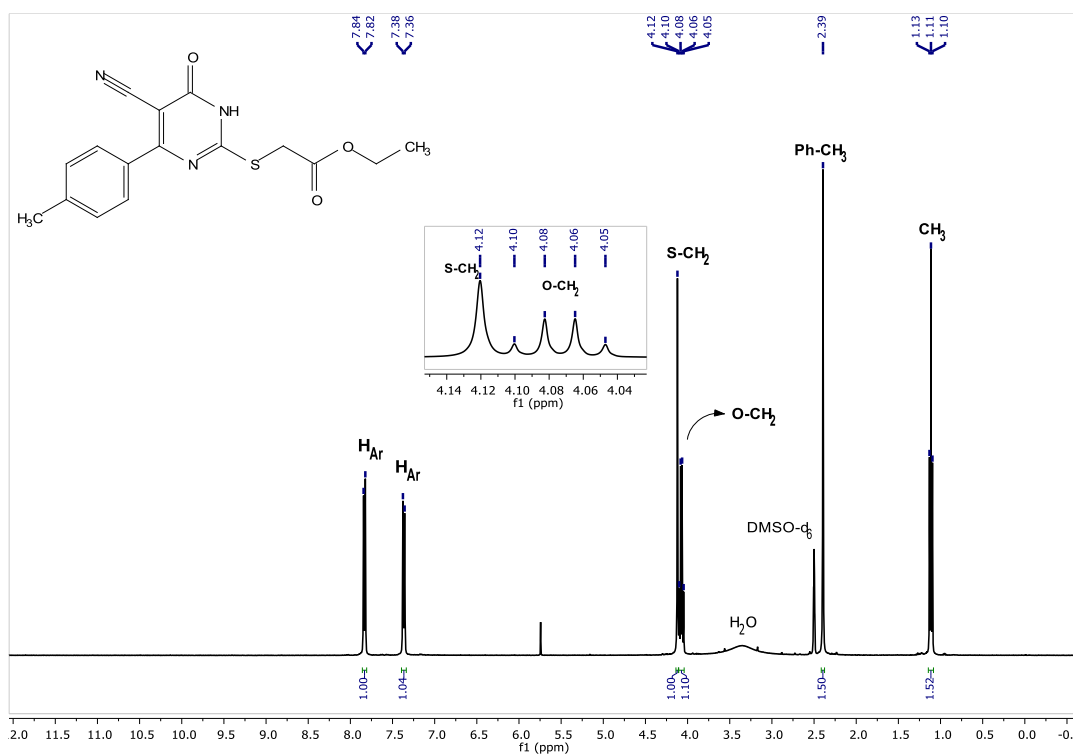


Fonte: a autora (2020)

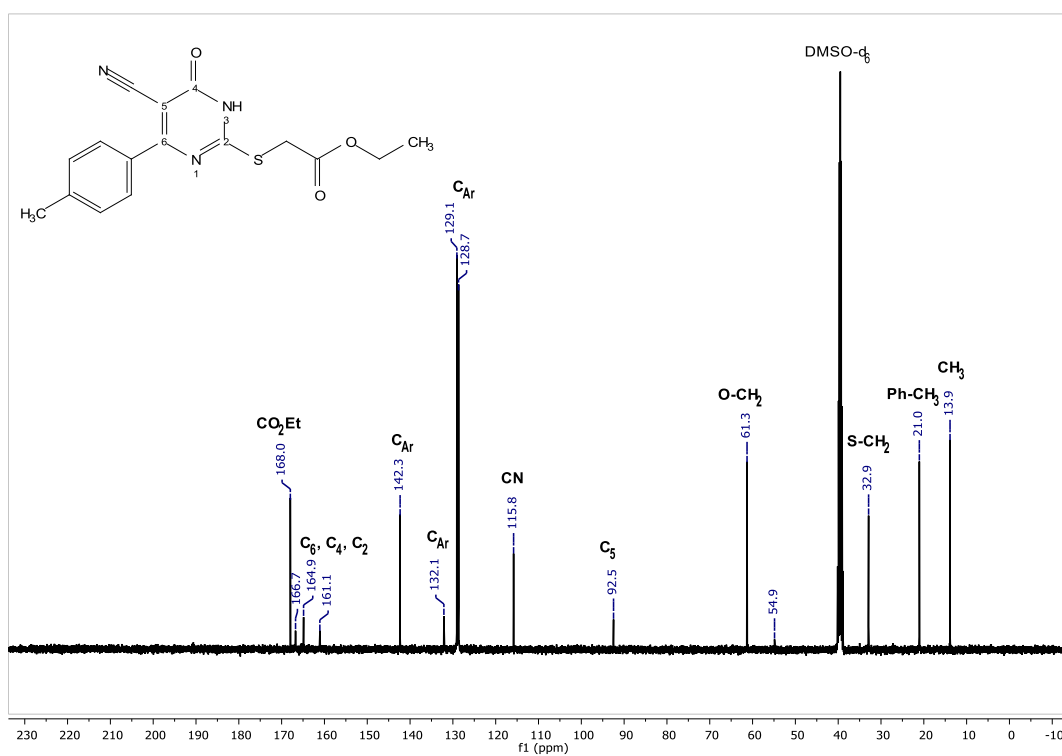
**Figura 2.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 101 MHz) de **6a**.



Fonte: a autora (2020)

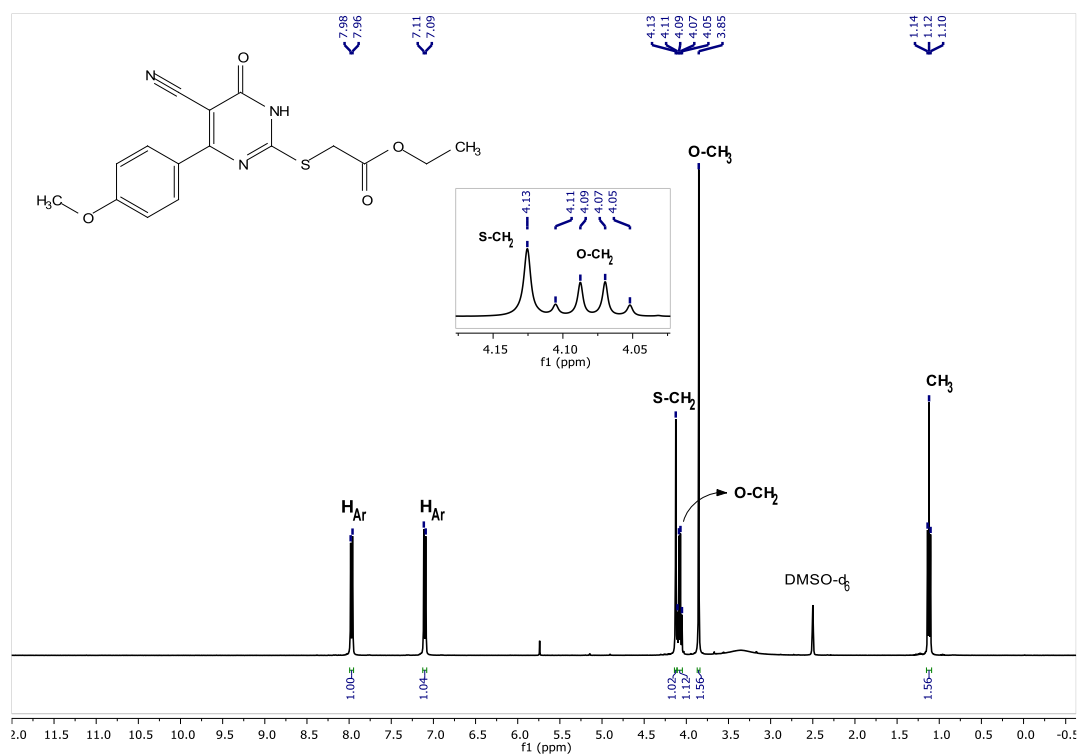
**Figura 3.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) de **6b**.

Fonte: a autora (2020)

**Figura 4.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 101 MHz) de **6b**.

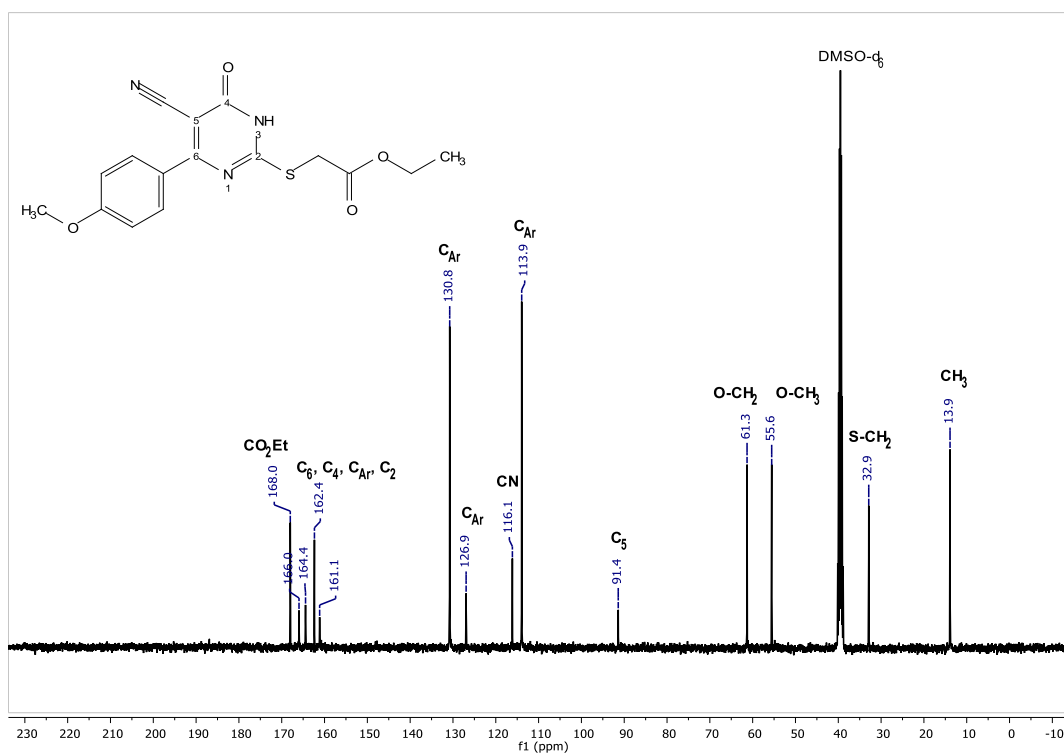
Fonte: a autora (2020)

**Figura 5.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) de **6c**.



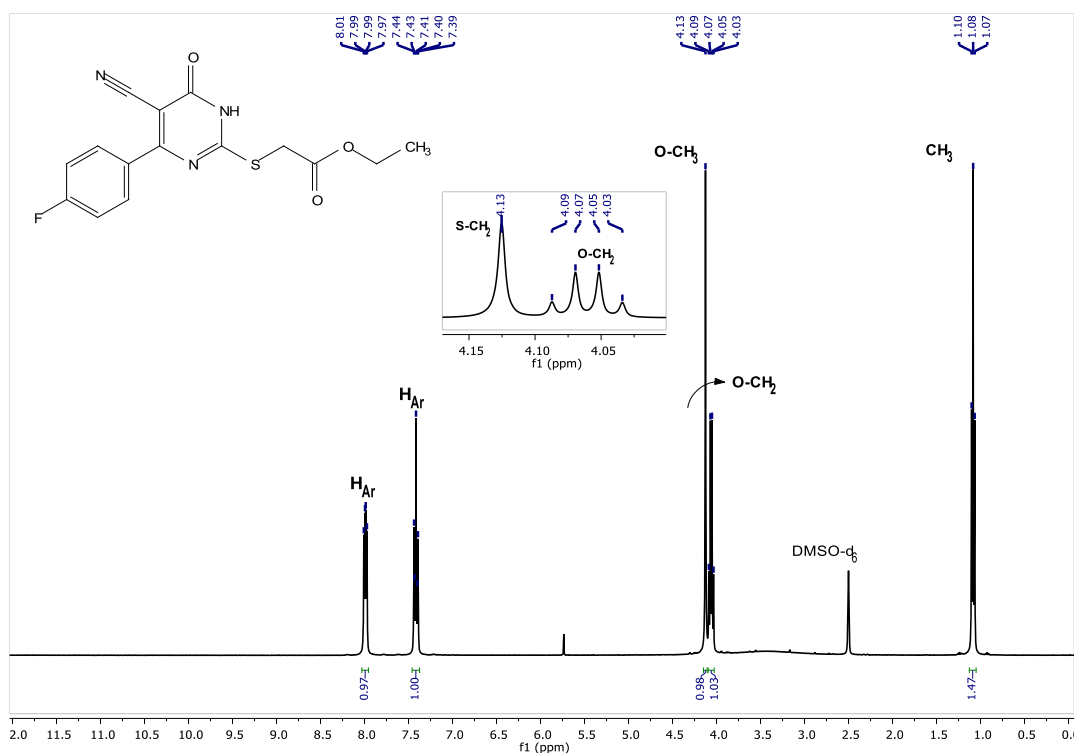
Fonte: a autora (2020)

**Figura 6.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 101 MHz) de **6c**.



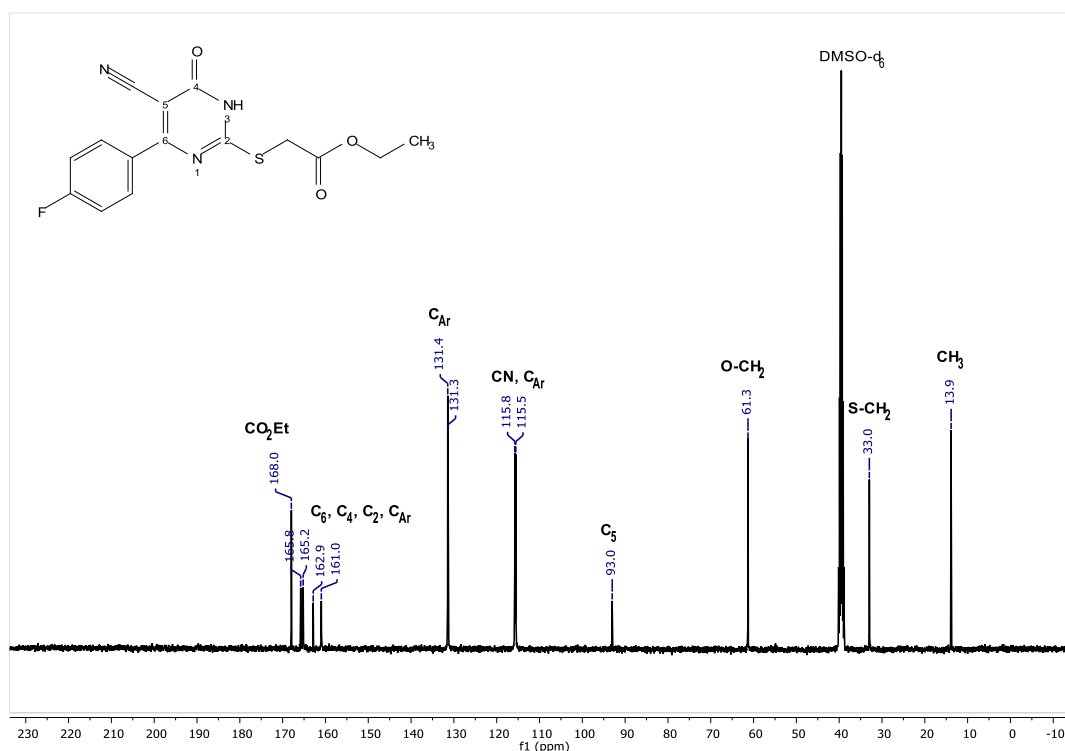
Fonte: a autora (2020)

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

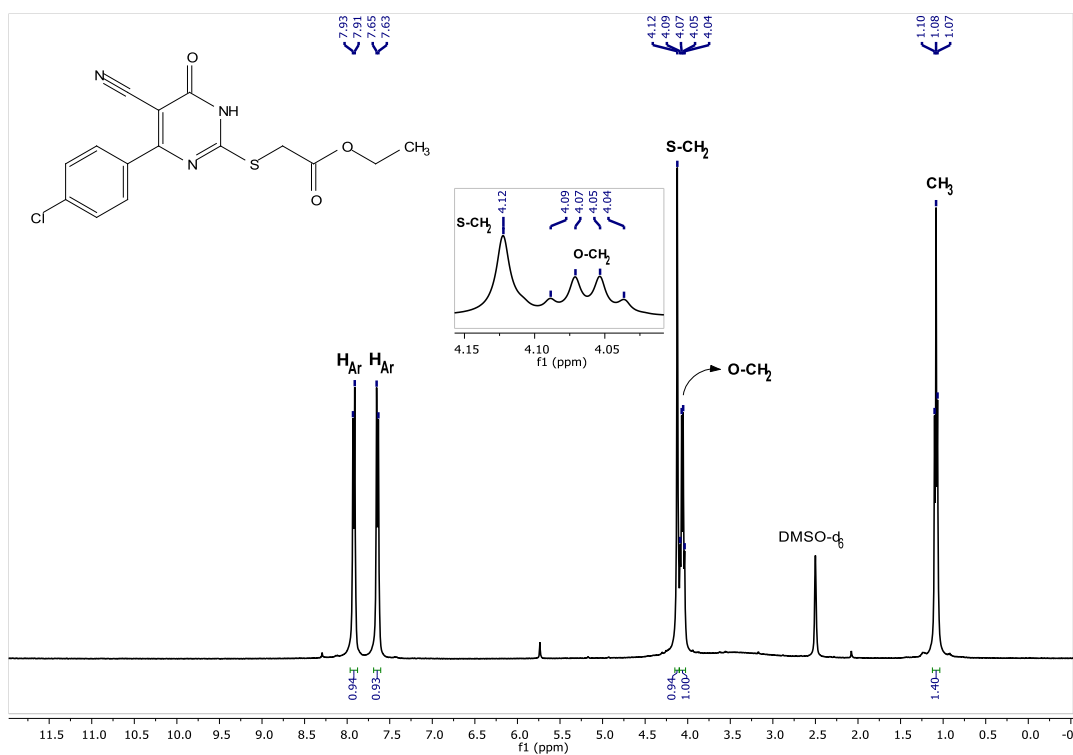


Fonte: a autora (2020)

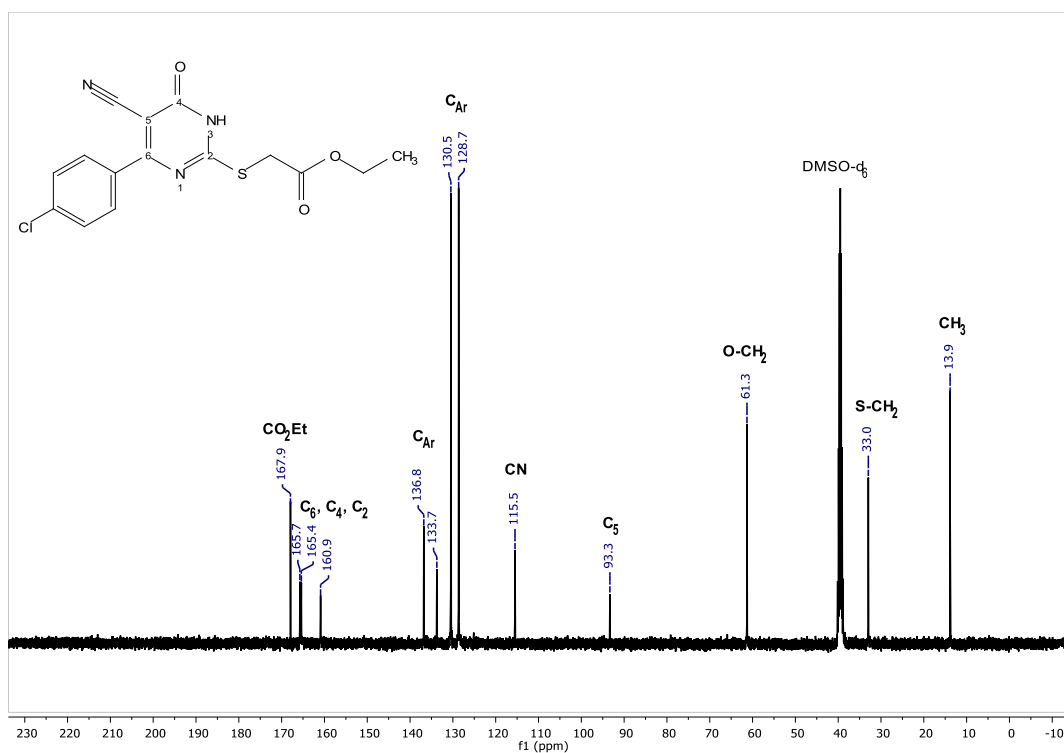
**Figura 8.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 101 MHz) de **6d**.



Fonte: a autora (2020)

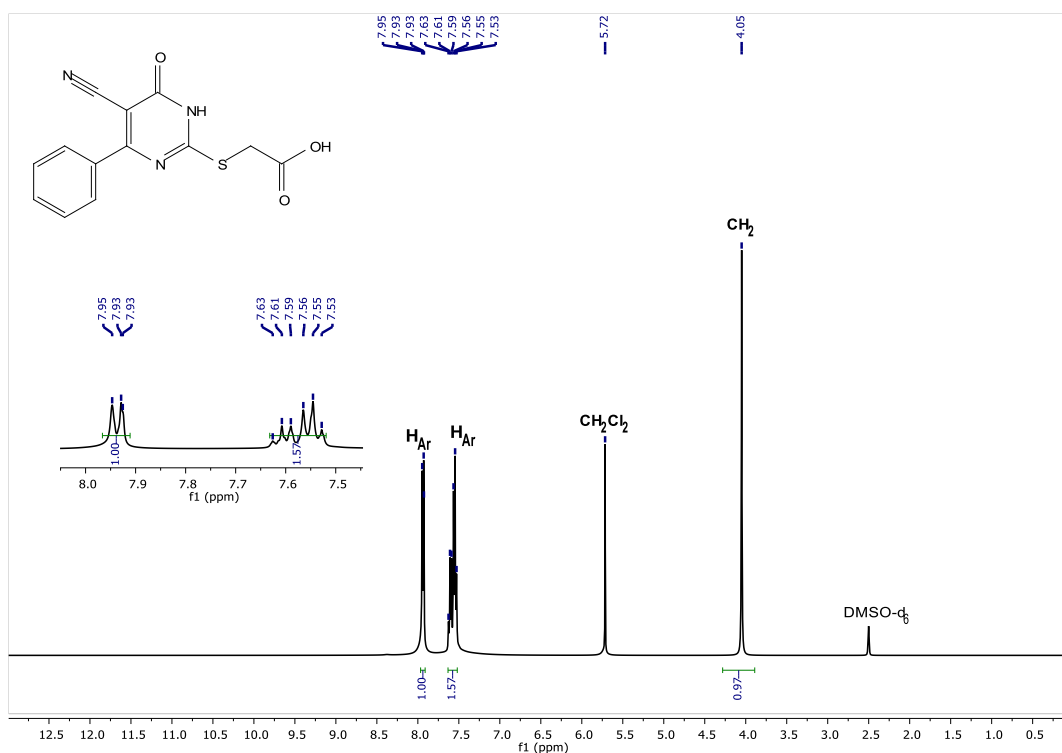
**Figura 9.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) de **6e**.

Fonte: a autora (2020)

**Figura 10.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 101 MHz) de **6e**.

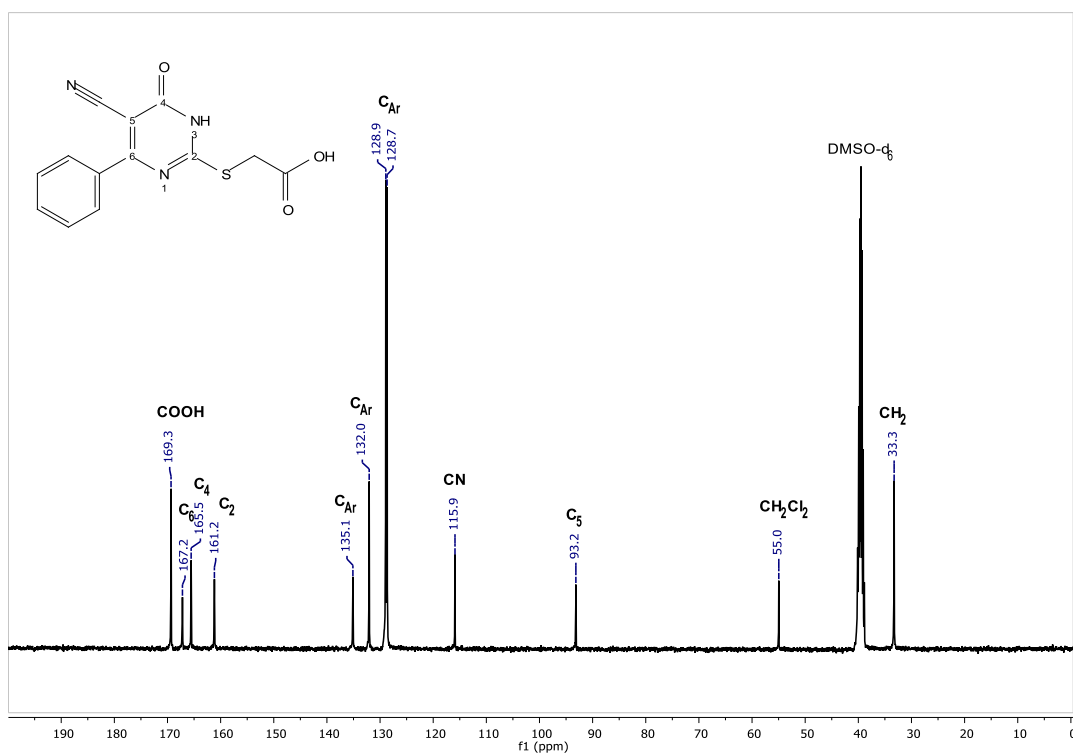
Fonte: a autora (2020)

**Figura 11.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $\text{d}_6$ , 400 MHz) de **8a**.



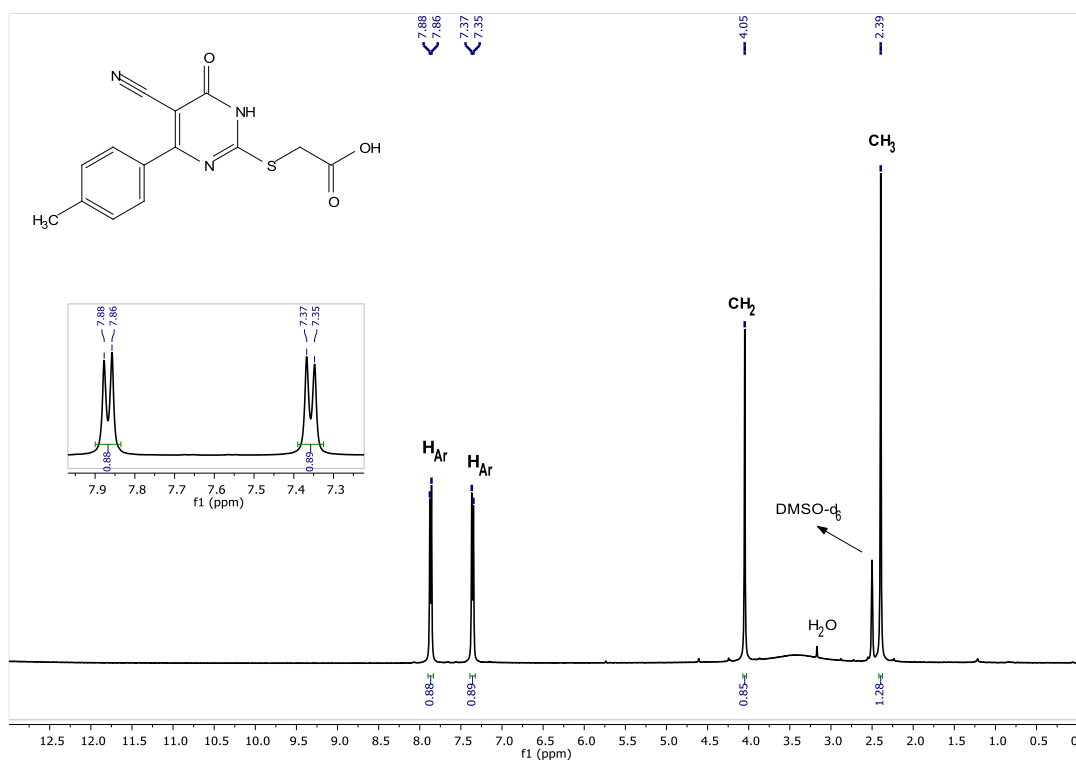
Fonte: a autora (2020)

**Figura 12.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $\text{d}_6$ , 101 MHz) de **8a**.



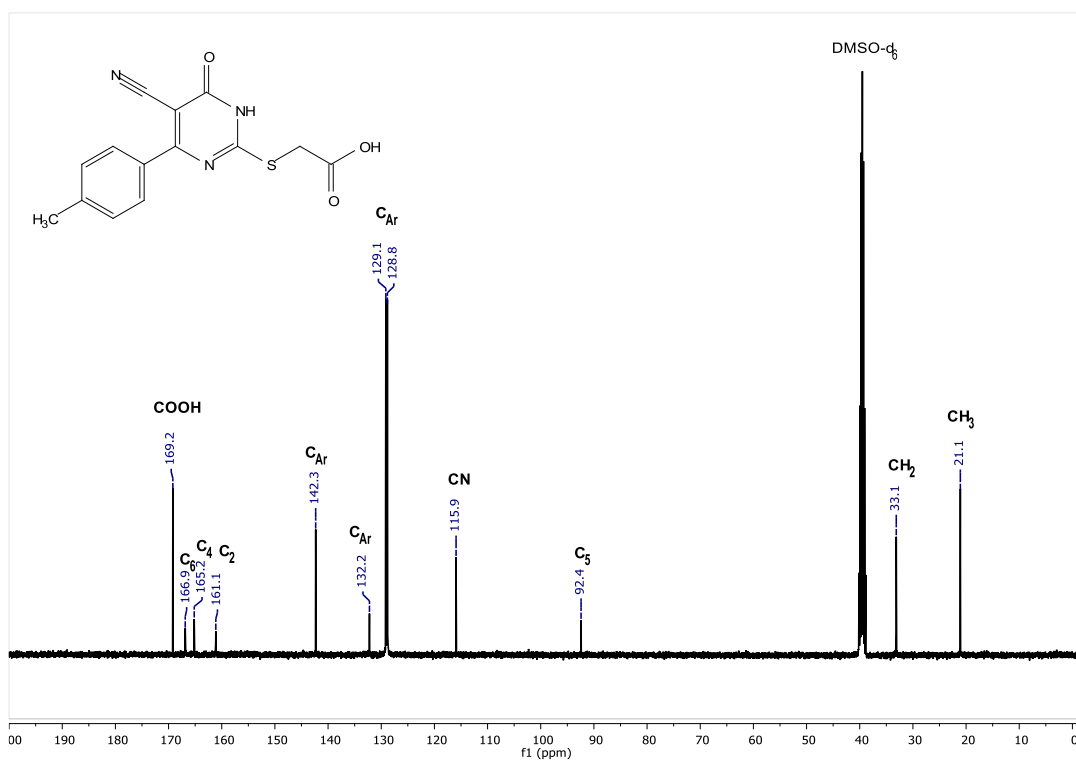
Fonte: a autora (2020)

**Figura 13.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $\text{d}_6$ , 400 MHz) de **8b**.



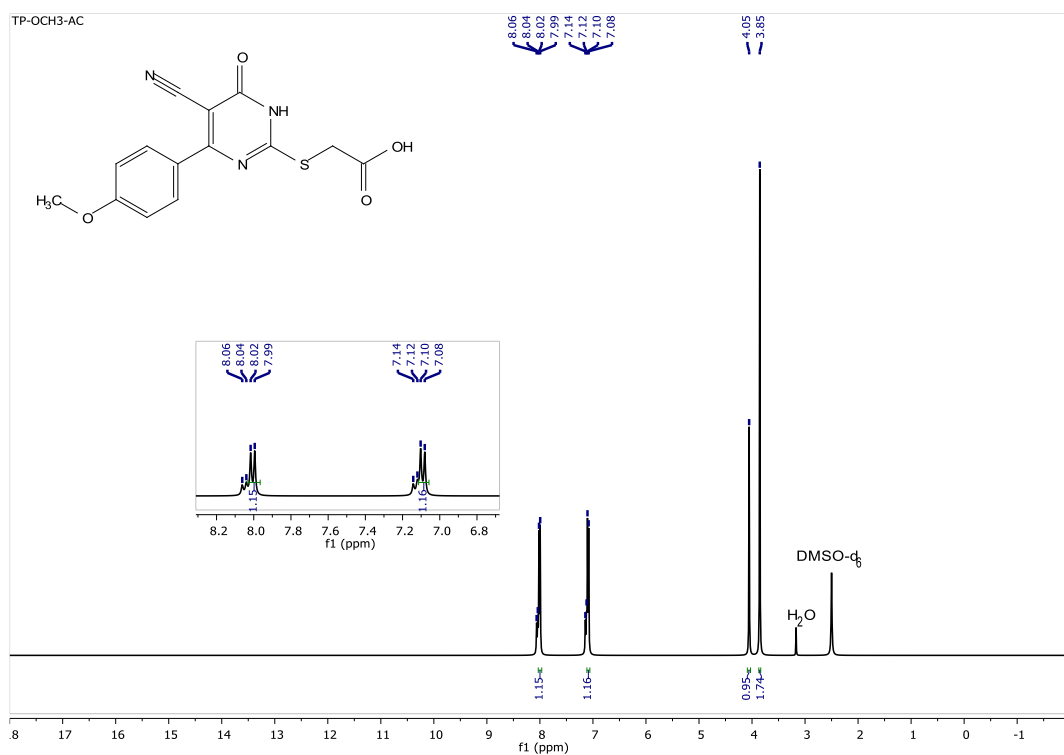
Fonte: a autora (2020)

**Figura 14.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $\text{d}_6$ , 101 MHz) de **8b**.



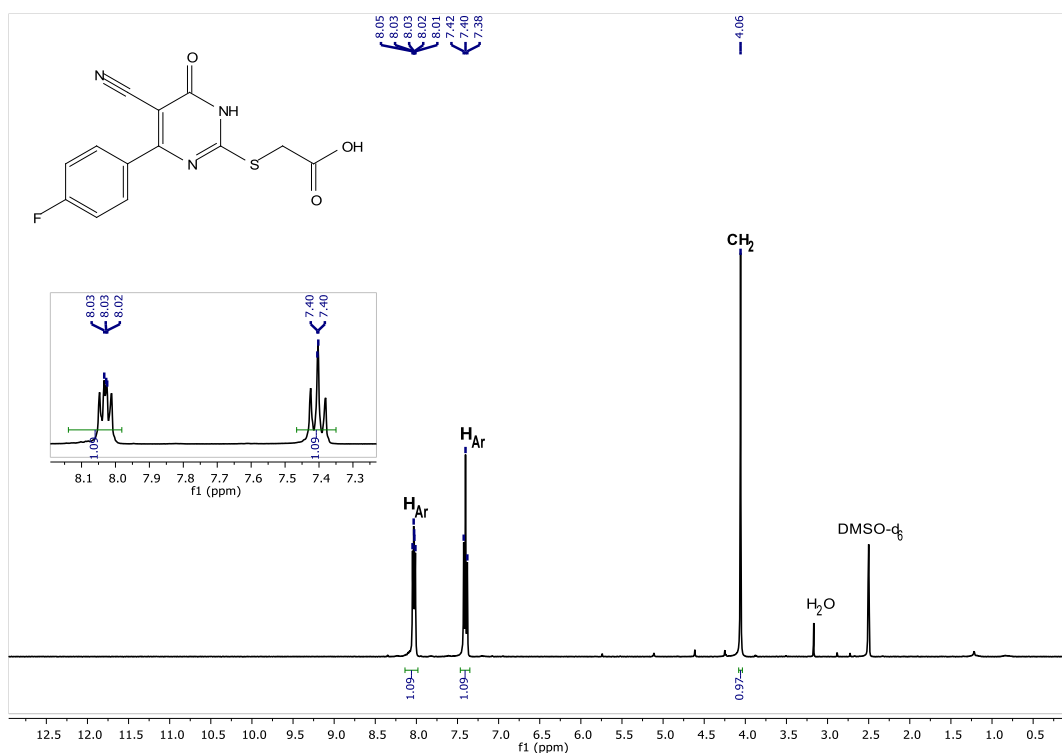
Fonte: a autora (2020)

**Figura 15.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 101 MHz) de **8c**.



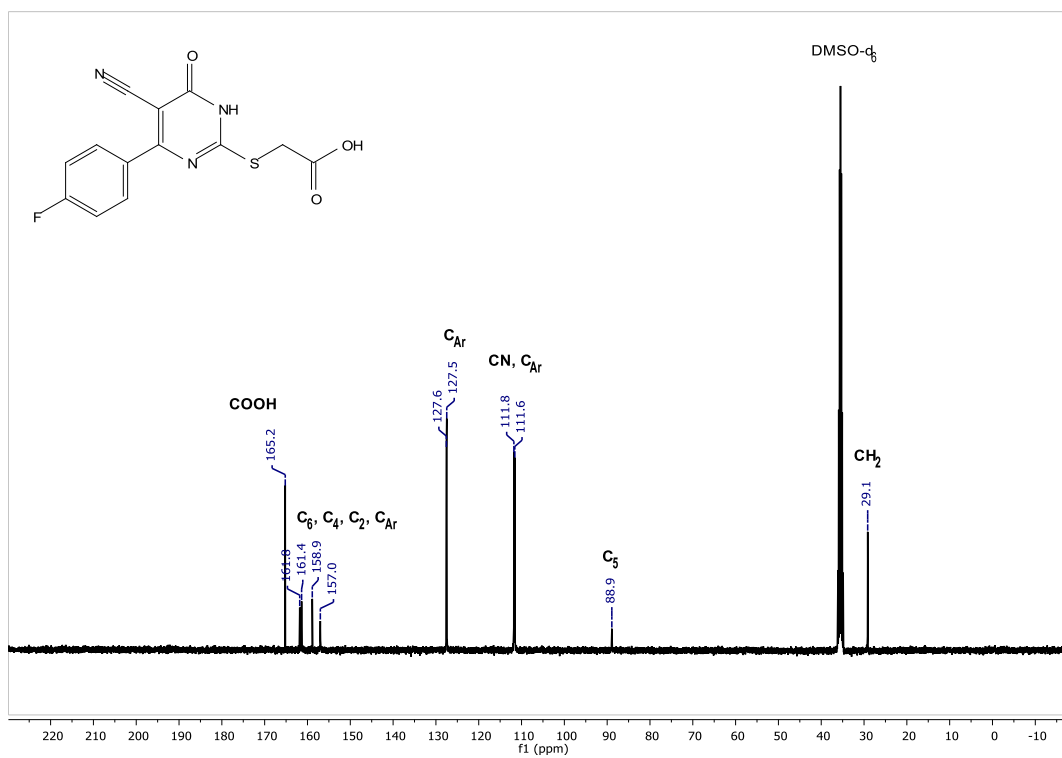
Fonte: a autora (2020)

**Figura 16.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) de **8d**.



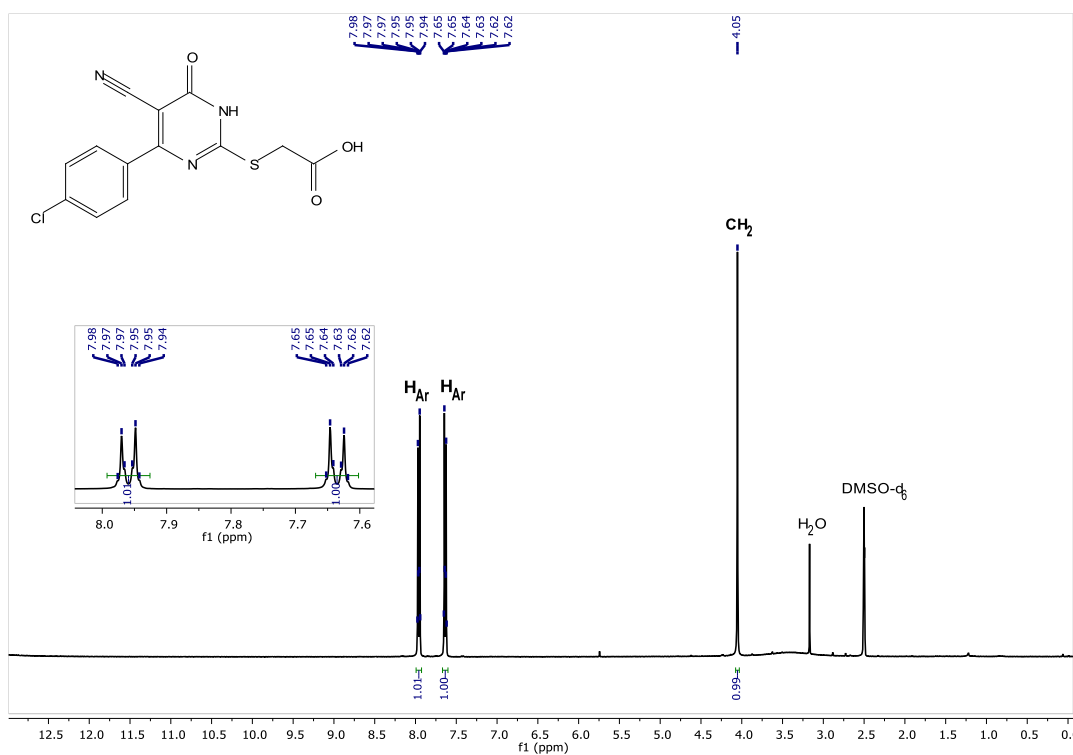
Fonte: a autora (2020)

**Figura 17.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 101 MHz) de **8d**.



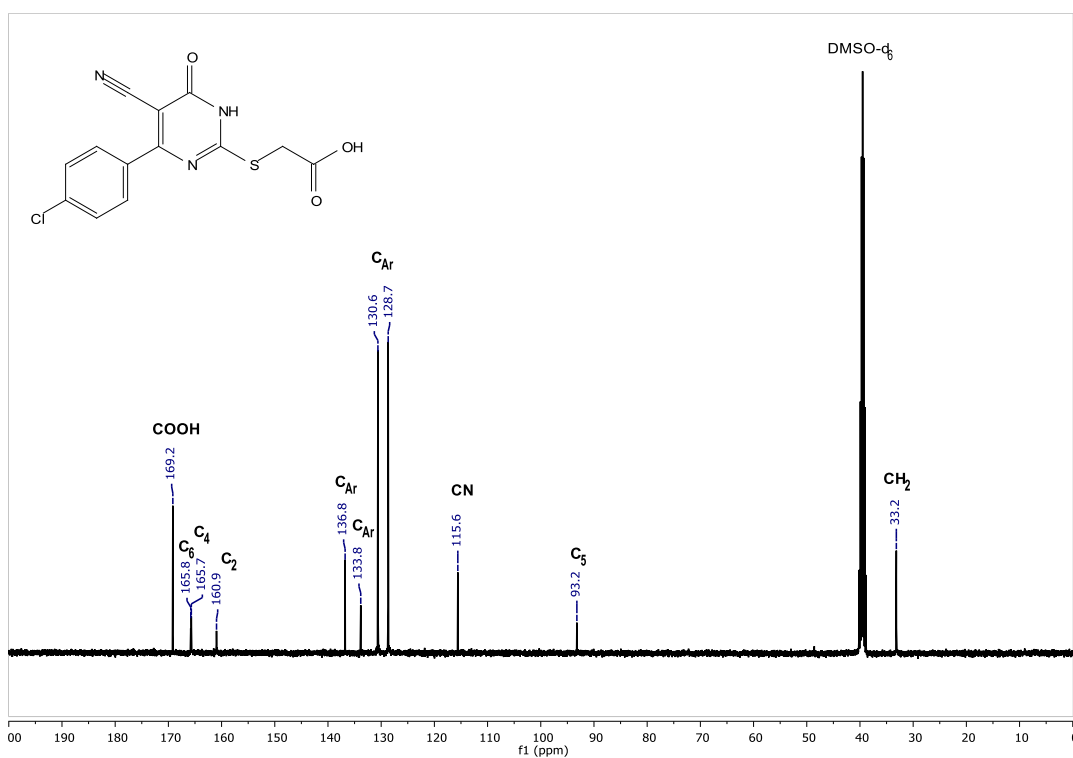
Fonte: a autora (2020)

**Figura 18.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) de **8e**.



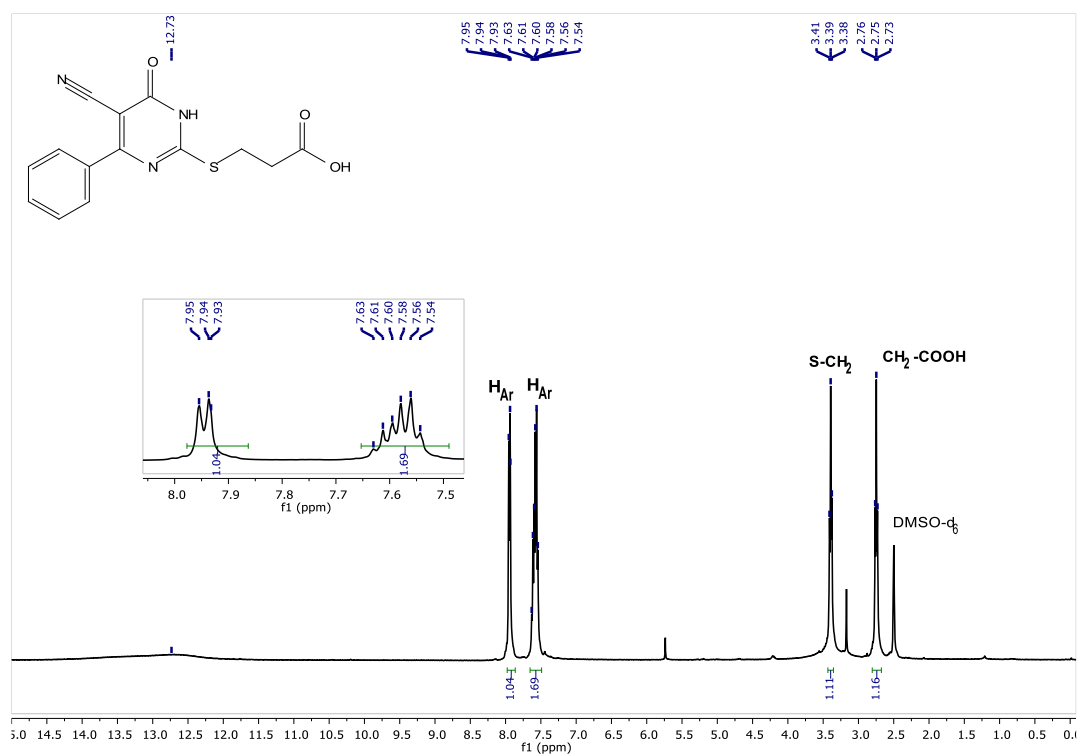
Fonte: a autora (2020)

**Figura 19.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 101 MHz) de **8e**.



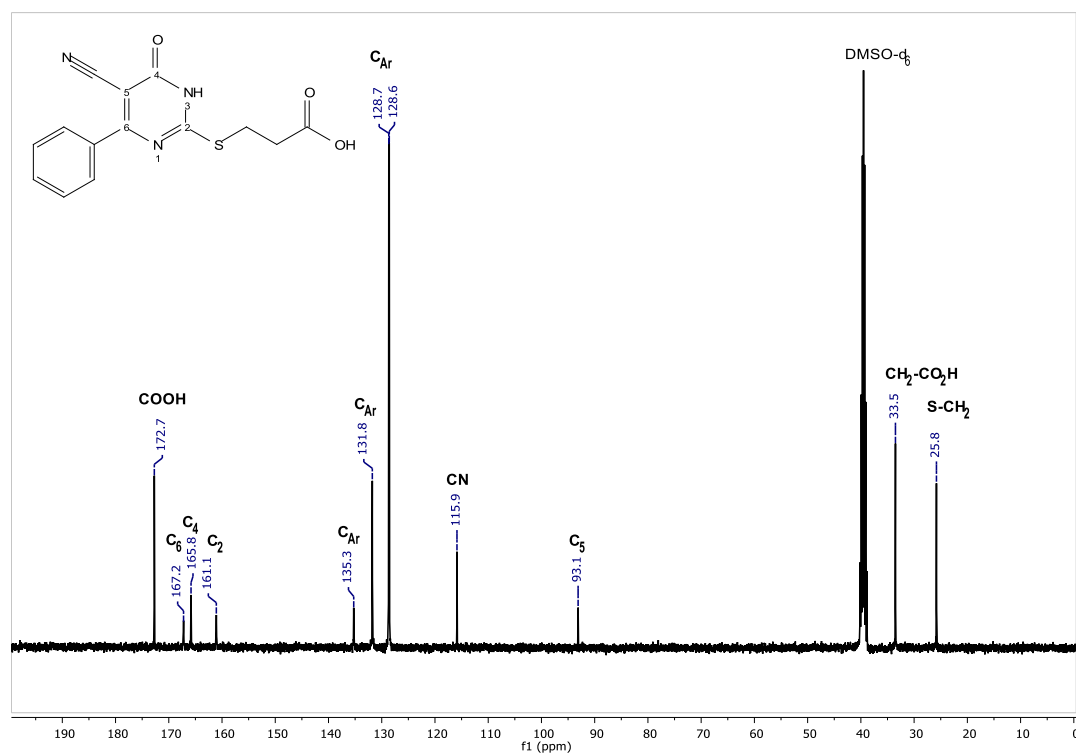
Fonte: a autora (2020)

**Figura 20.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) do **10a**.



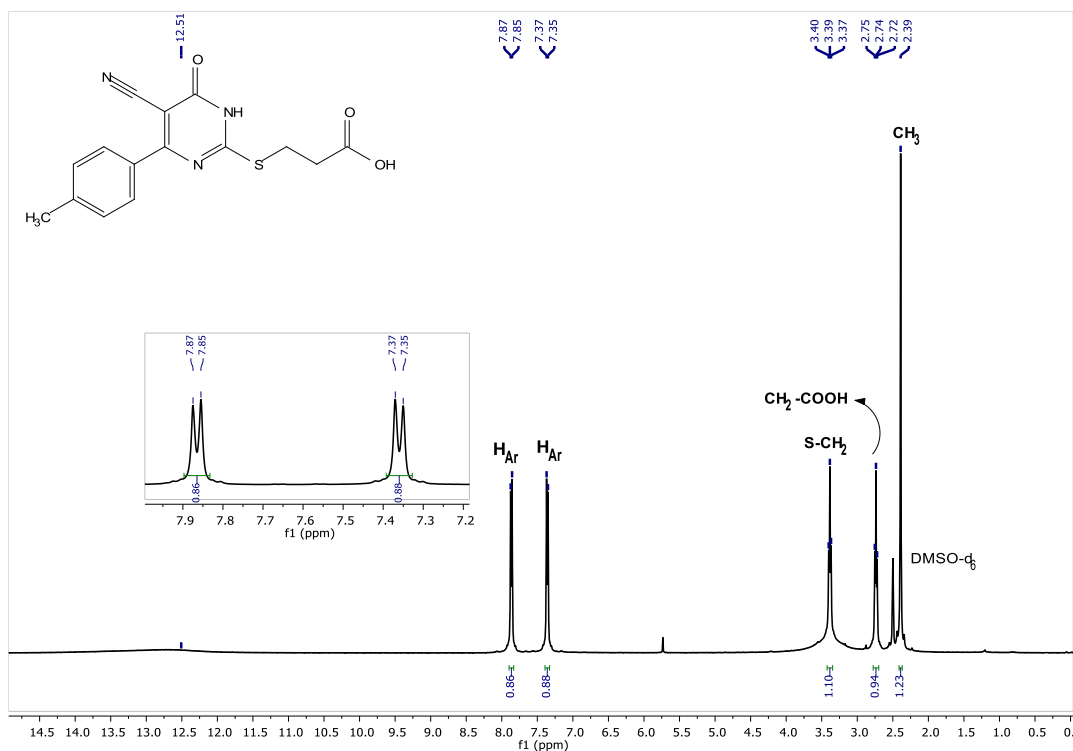
Fonte: a autora (2020)

**Figura 21.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 101 MHz) do **10a**.



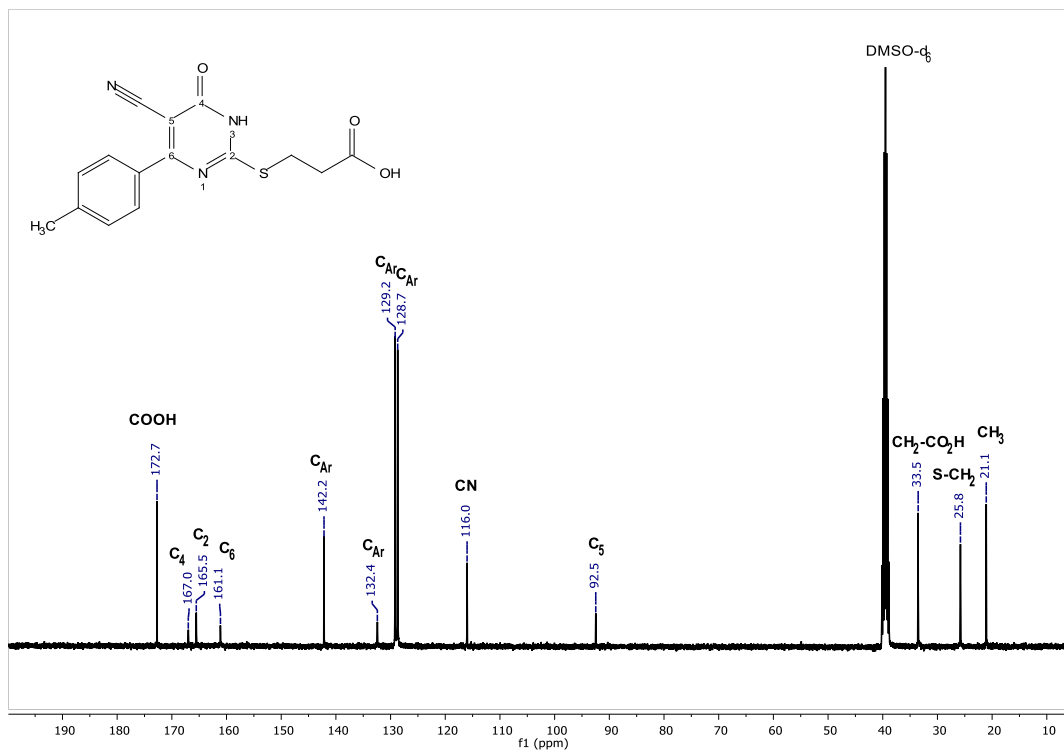
Fonte: a autora (2020)

**Figura 22.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) do **10b**.



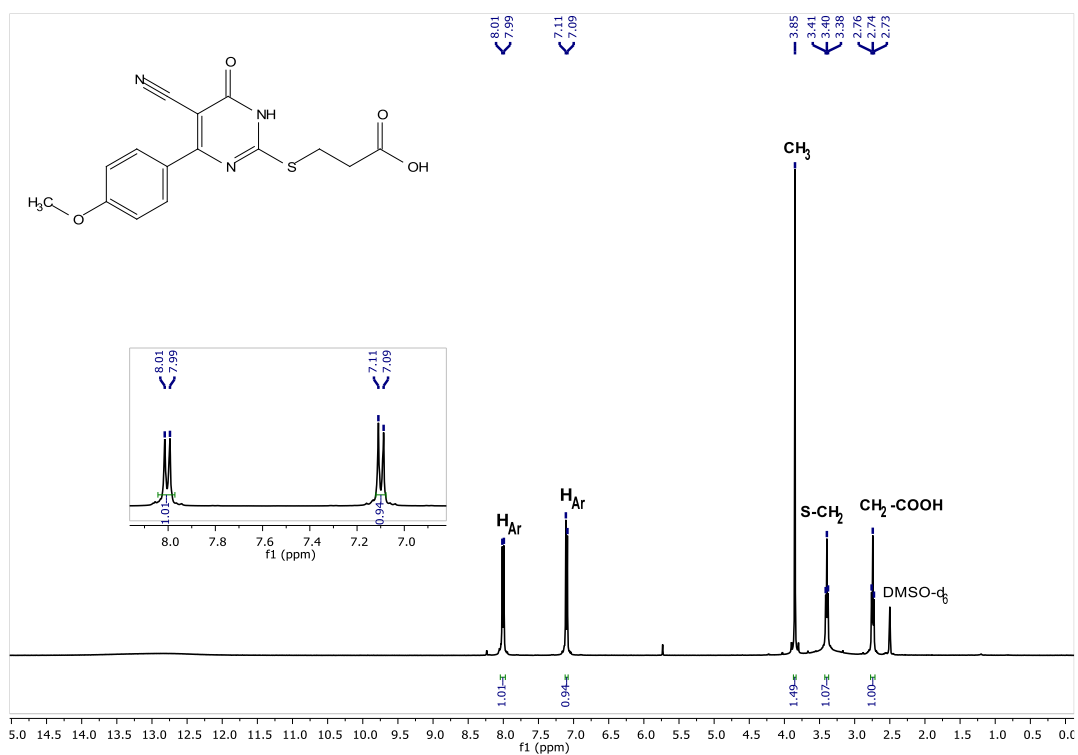
Fonte: a autora (2020)

**Figura 23.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 101 MHz) do **10b**.



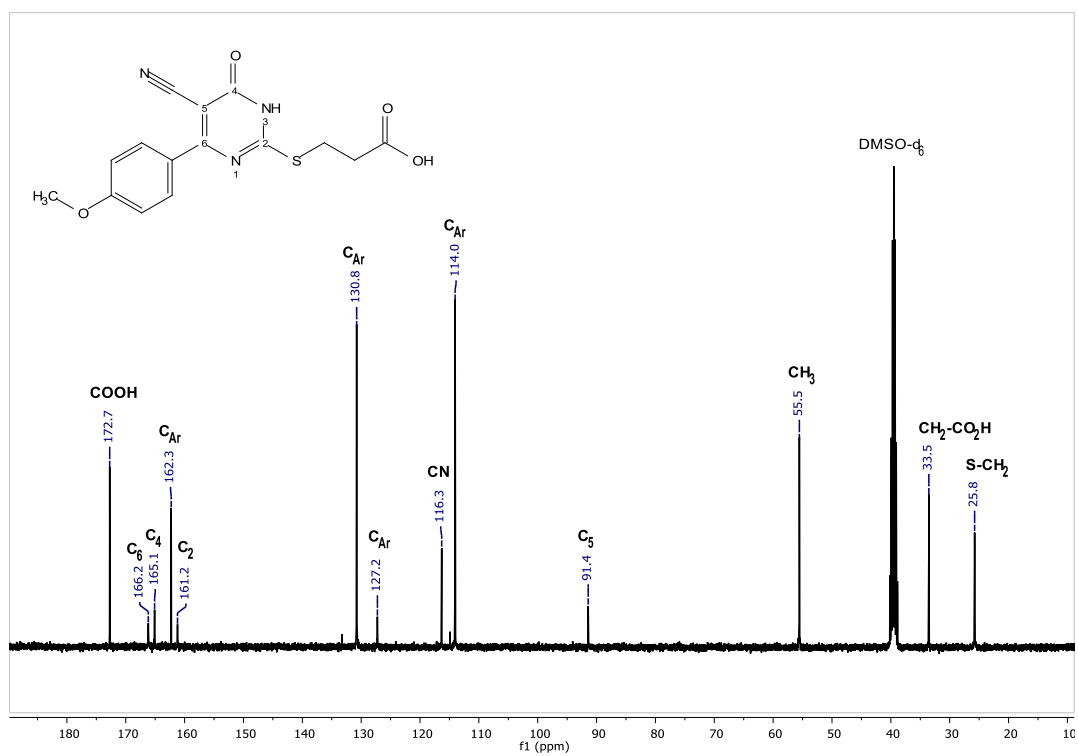
Fonte: a autora (2020)

**Figura 24.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) do **10c**.



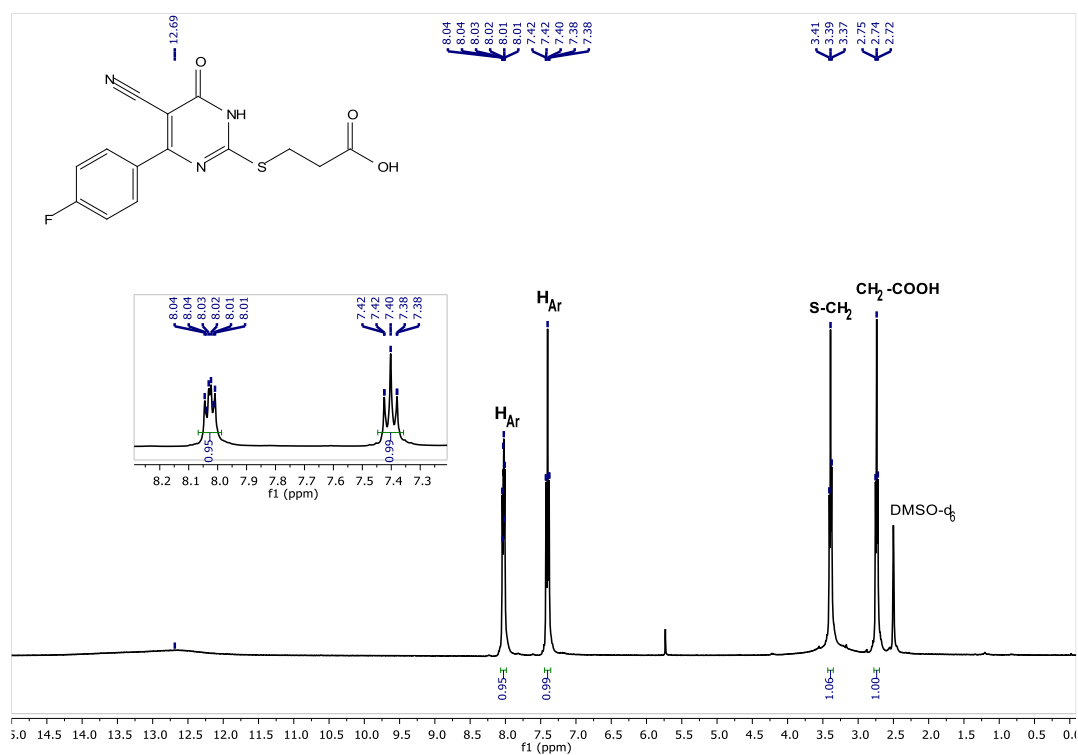
Fonte: a autora (2020)

**Figura 25.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 101 MHz) do **10c**.



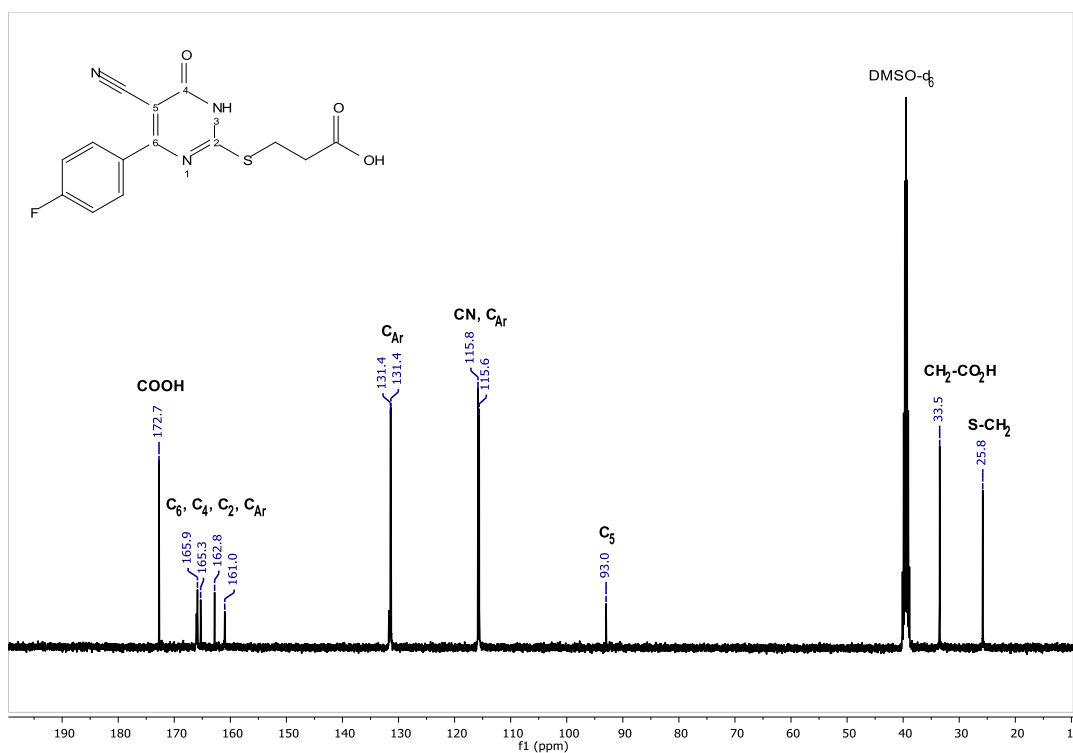
Fonte: a autora (2020)

**Figura 26.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) do **10d**.



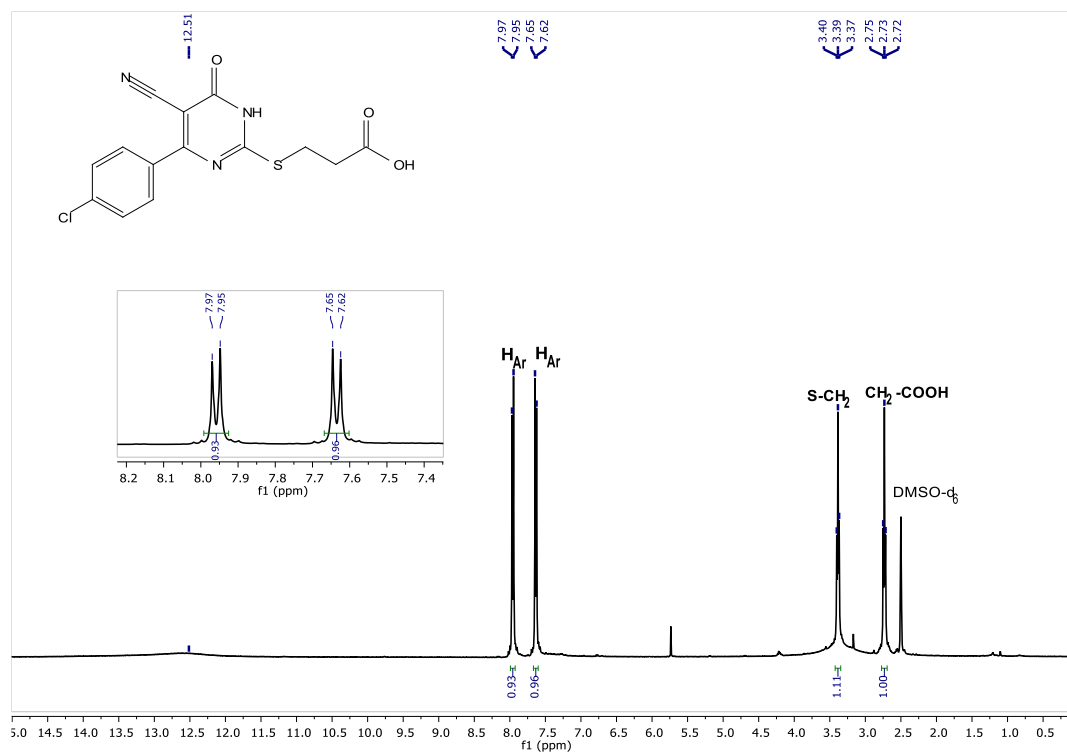
Fonte: a autora (2020)

**Figura 27.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 101 MHz) do **10d**.



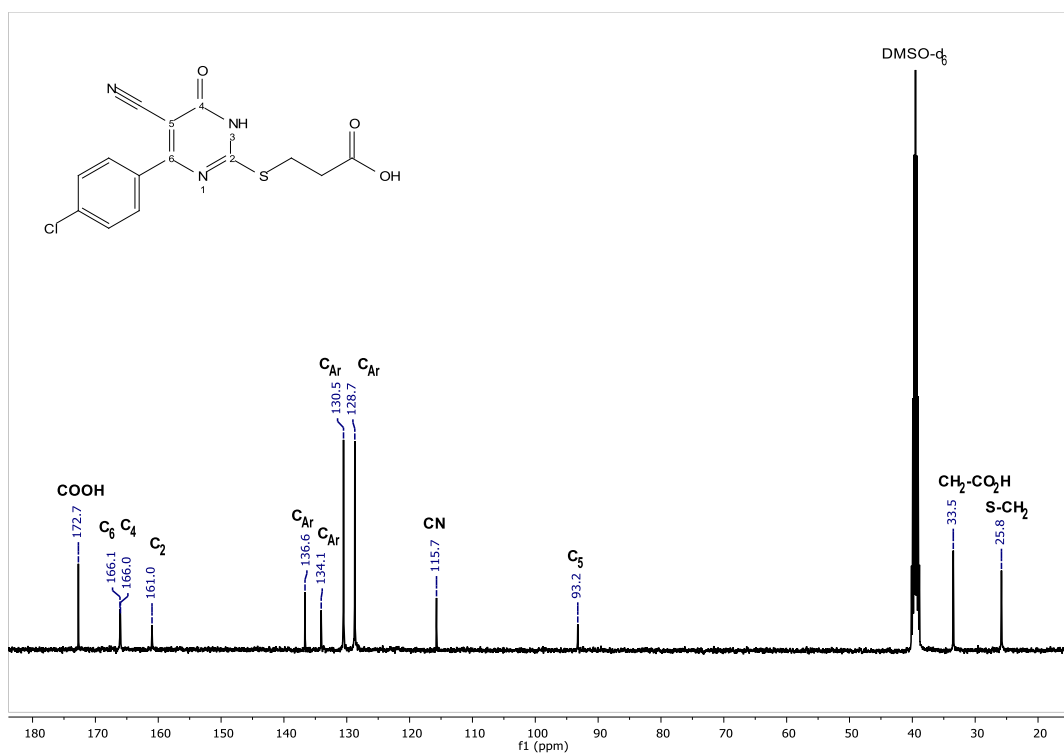
Fonte: a autora (2020)

**Figura 28.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) do **10e**.

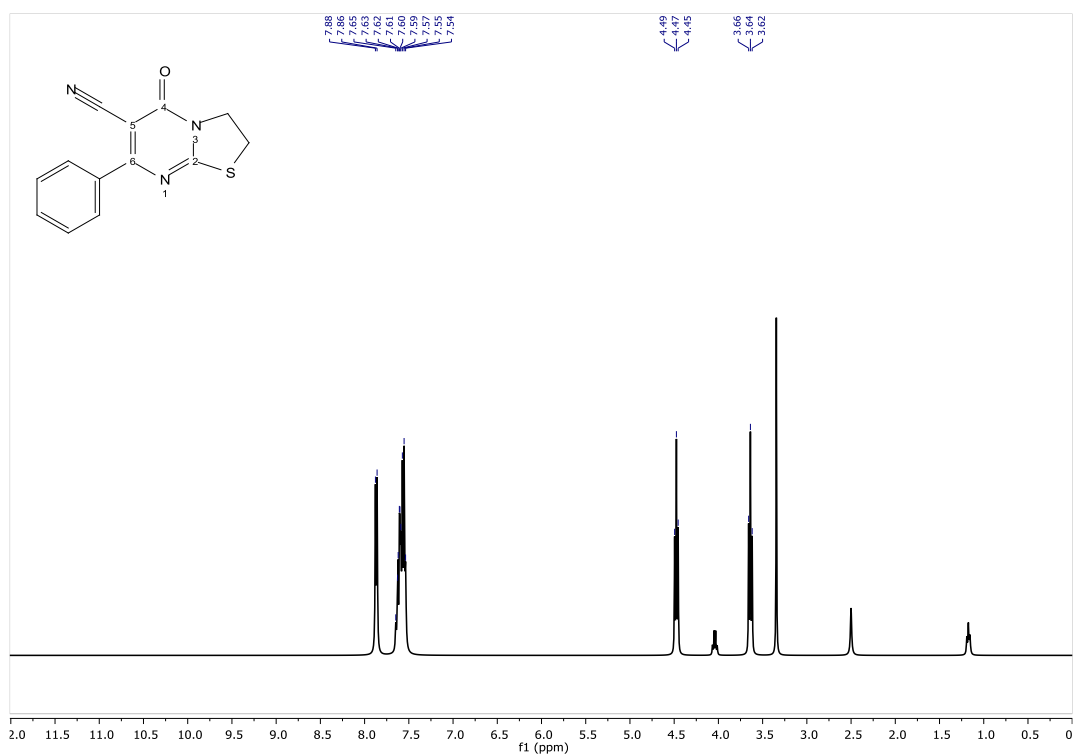


Fonte: a autora (2020)

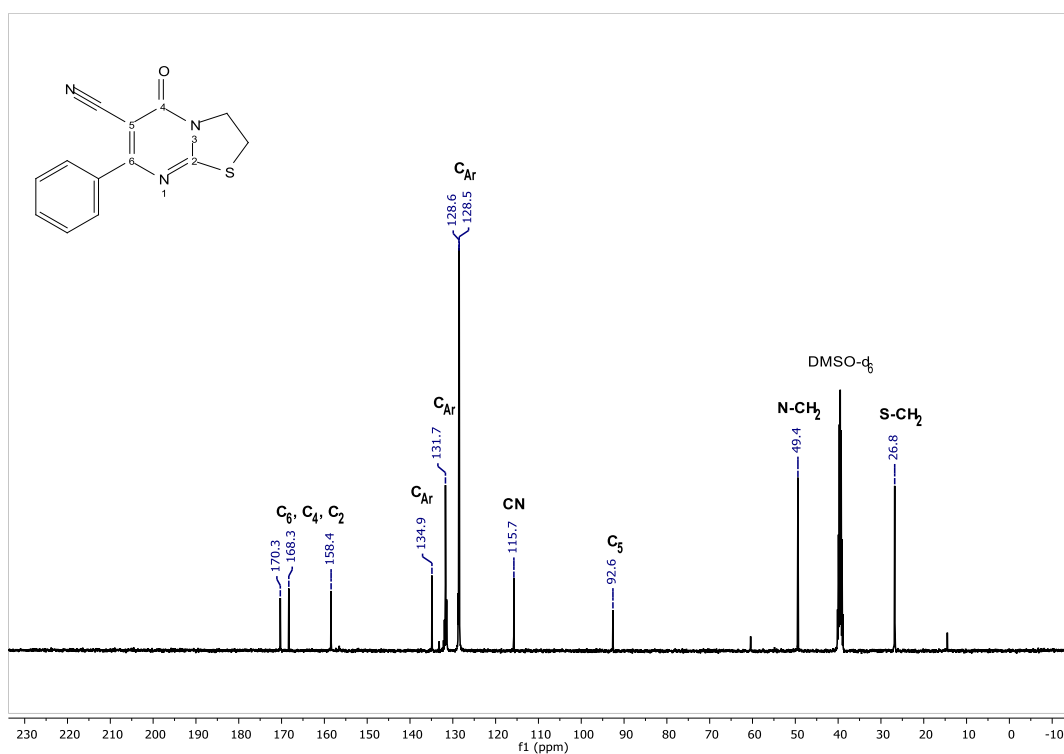
**Figura 29.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 101 MHz) do **10e**.



Fonte: a autora (2020)

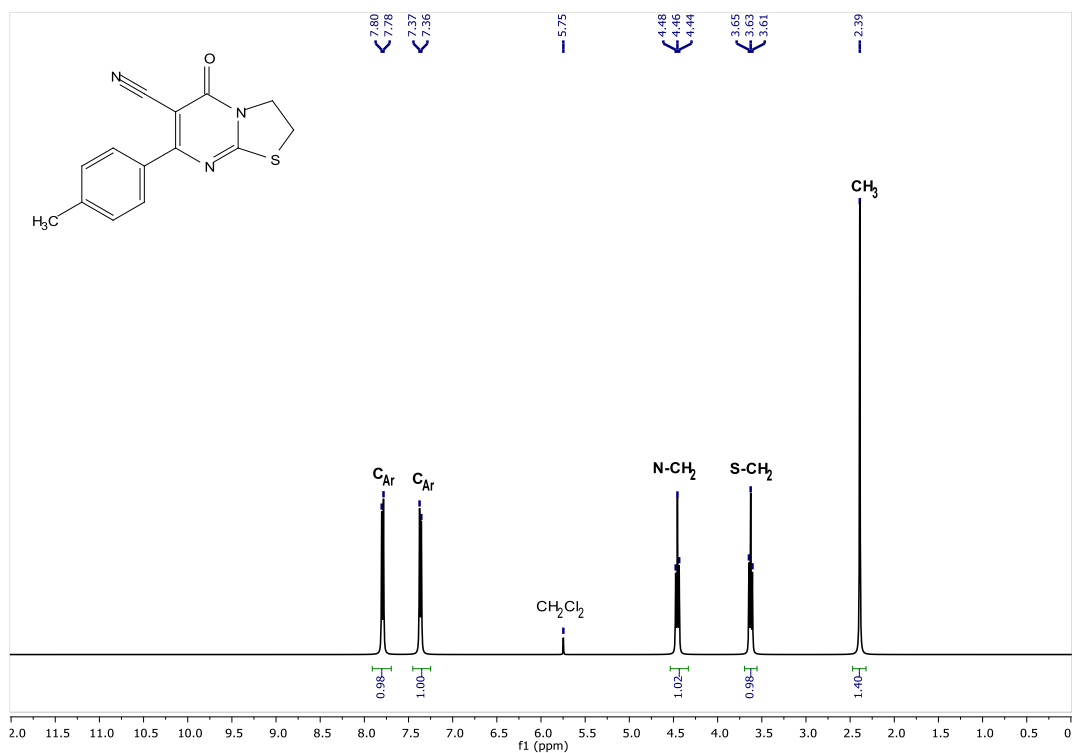
**Figura 30.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) do **13a**.

Fonte: a autora (2020)

**Figura 31.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 101 MHz) de **13a**.

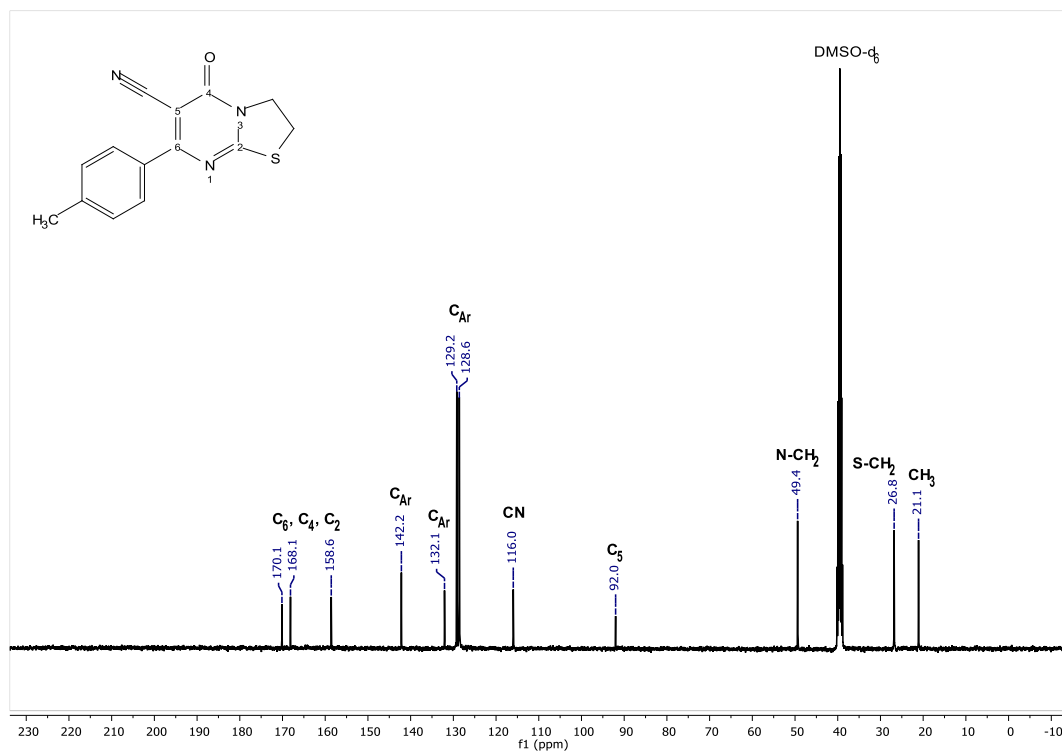
Fonte: a autora (2020)

**Figura 32.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) do **13b**.



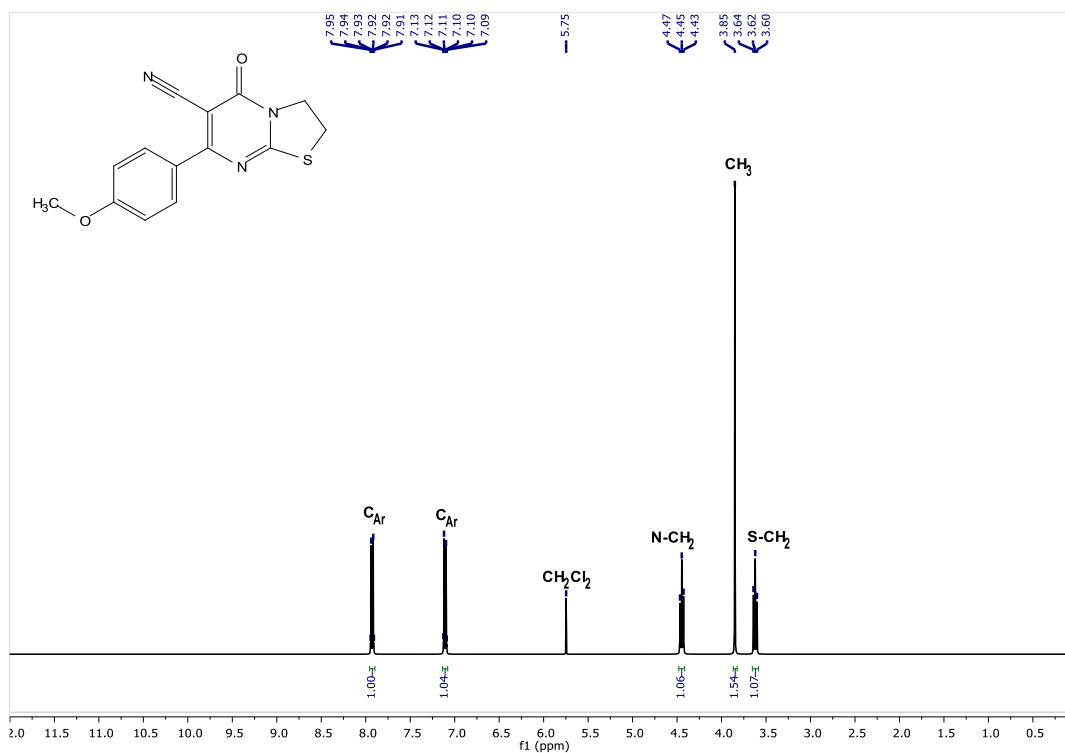
Fonte: a autora (2020)

**Figura 33.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $\text{d}_6$ , 101 MHz) do 13b.



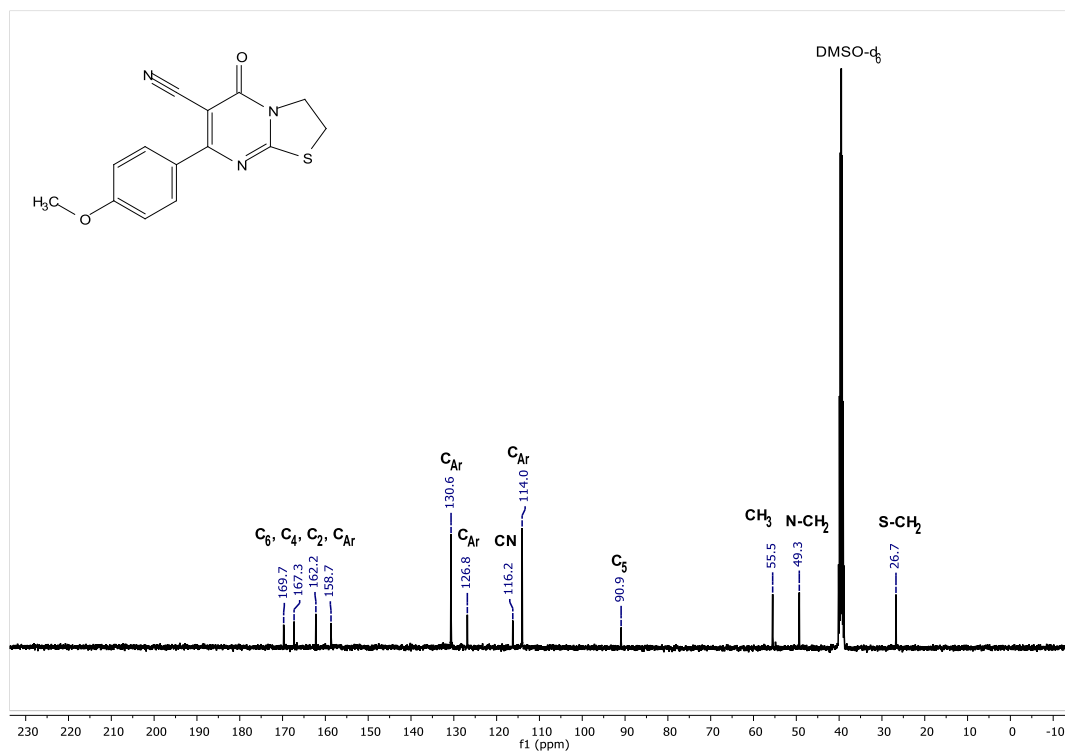
Fonte: a autora (2020)

**Figura 34.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $\text{d}_6$ , 400 MHz) de 13c.



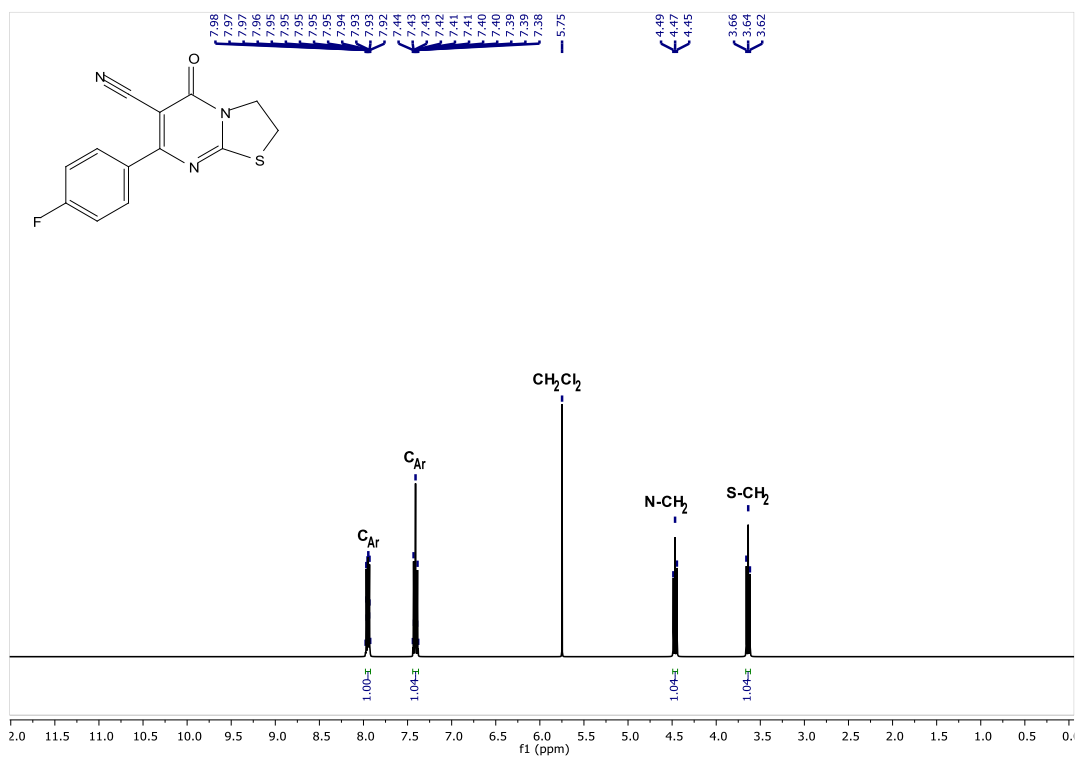
Fonte: a autora (2020)

**Figura 35.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>, 101 MHz) de 13c.



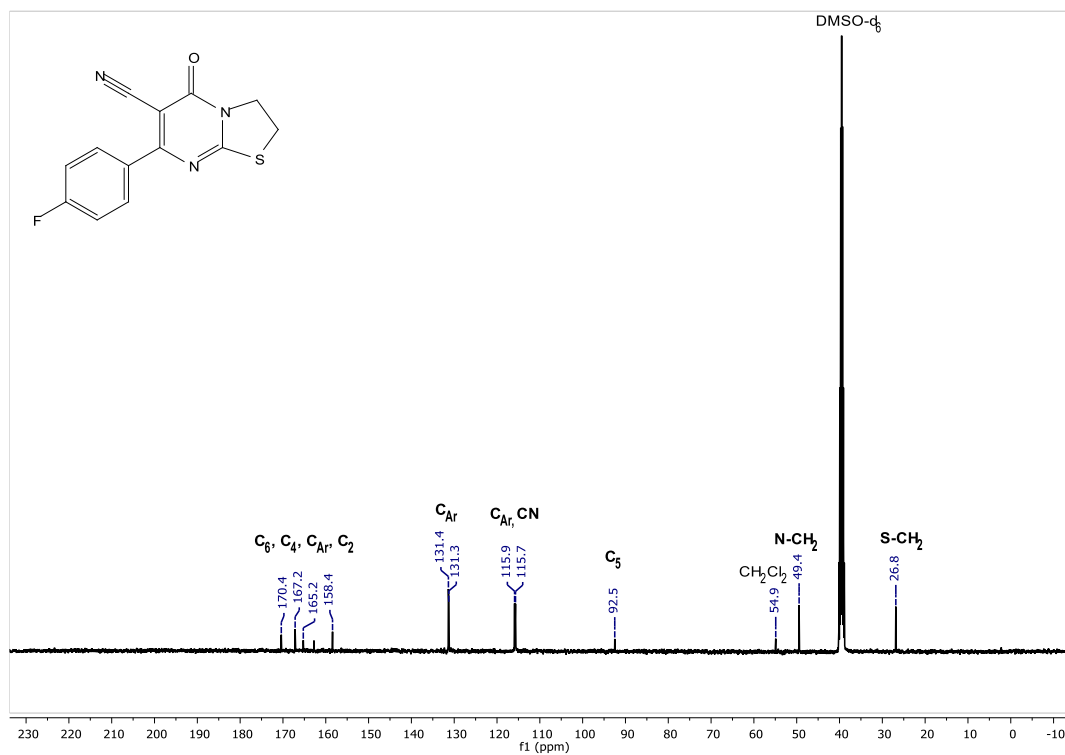
Fonte: a autora (2020)

**Figura 36.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) de 13d.



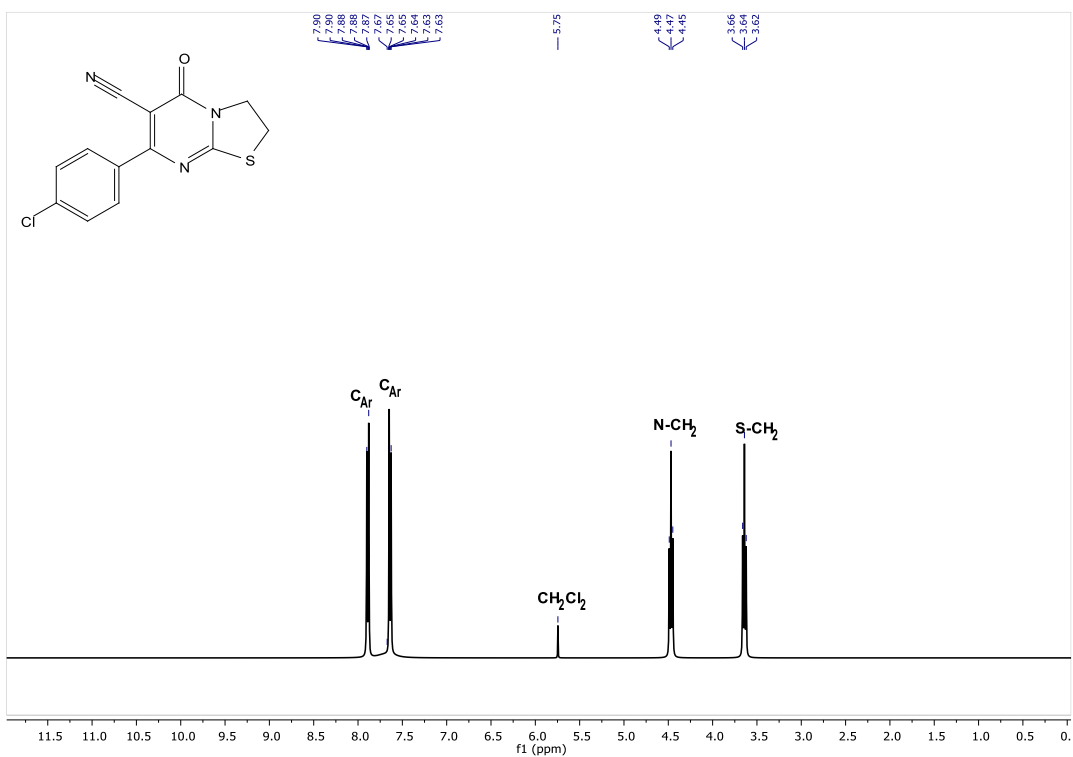
Fonte: a autora (2020)

**Figura 37.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>, 101 MHz) de **13d**.



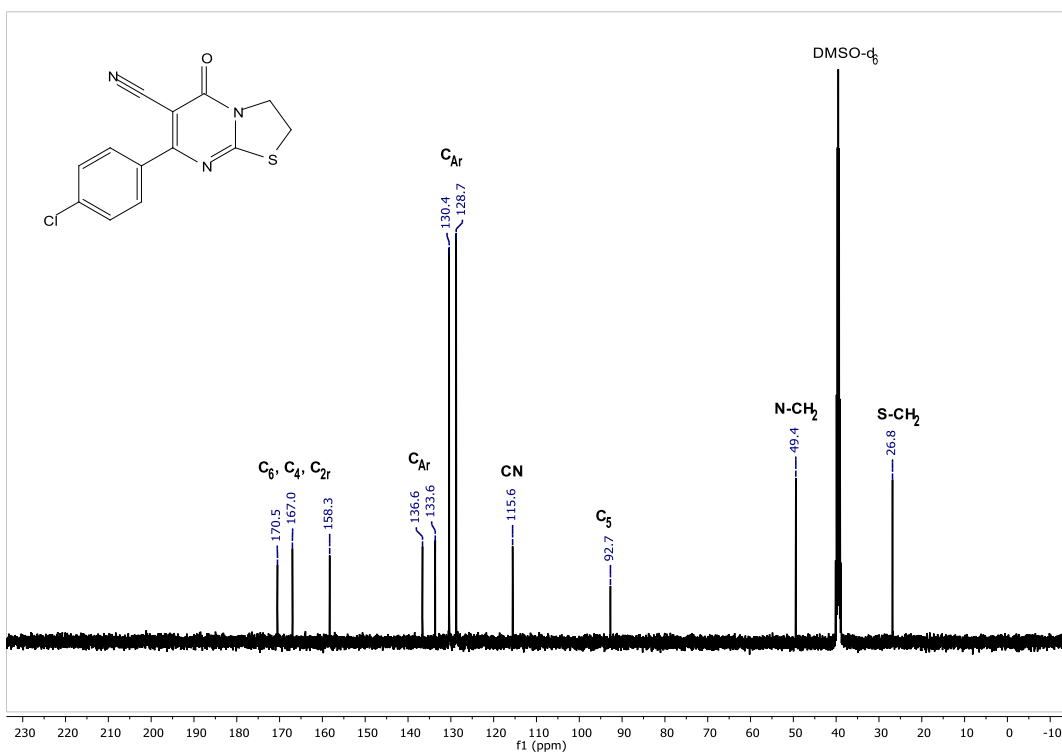
Fonte: a autora (2020)

**Figura 38.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) de **13e**.



Fonte: a autora (2020)

**Figura 39.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>, 101 MHz) de **13e**.



Fonte: a autora (2020)