



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

# MAPEAMENTO DE INTERAÇÕES ENTRE COMPOSTOS BIOLOGICAMENTE ATIVOS COM UREASE: AVALIAÇÃO DE INIBIDORES DE UREASE COM POTENCIAL APLICAÇÃO CLÍNICA E AGRÍCOLA THAMILLA MARIA SILVA MACIEL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões Tabuleiro dos Martins 57072-970 - Maceió - AL

### THAMILLA MARIA SILVA MACIEL

# MAPEAMENTO DE INTERAÇÕES ENTRE COMPOSTOS BIOLOGICAMENTE ATIVOS COM UREASE: DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES DE UREASE COM POTENCIAL APLICAÇÃO CLÍNICA E AGRÍCOLA

Tese de doutorado apresentado ao programa de pós-graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Josué C. Caldas Santos

Maceió – AL 2023

# Catalogação na fonte Universidade Federal de AlagoasBiblioteca Central Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos - CRB-4 - 2062

M152m Maciel, Thamilla Maria Silva.
Mapeamento de interações entre compostos biologicamente ativos comurease: avaliação de inibidores de urease com potencial aplicação clínica eagrícola / Thamilla Maria Silva Maciel. – 2023. 173 f. : il. color.
Orientador: Josué C. Caldas Santos.
Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas.Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação emQuímica e Biotecnologia. Maceió, 2023.
Bibliografia: f. 123-135.
Apêndices: f. 136-173.
Atividade inibitória da urease. 2. Julodinas – Derivados. 3. Aminoácidos – Derivados. I. Título.



Universidade Federal de Alagoas Instituto de Química e Biotecnologia Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia Av. Lourival de Melo Mota, Campus A.C. Simões, Maceió-AL, 57072-900, Brazil. www.qui.ufal.br // Tel: +55 82 3214-1384



BR 104 Km14, Campus A. C. SimõesCidade Universitária, Tabuleiro dos Martins57072-970, Maceió-AL, Brasil Fone: (82) 3214-1144 Email: ppgd.ufal@gmail.com

# FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda THAMILLA MARIA SILVA MACIEL VERÇOSA, intitulada: "MAPEAMENTO DE INTERAÇÕES ENTRE COMPOSTOS BIOLOGICAMENTE ATIVOS COM UREASE: DESENVOLVIMENTO DE INIBODORES DE UREASE COM POTENCIAL APLICAÇÃO CLÍNICA E

AGRÍCOLA", apresentada, em sessão aberta, ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 27 de fevereiro de 2023, às 14 h, por meio de videoconferência.

Maceió, 27 de fevereiro de 2023.

# COMISSÃO EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente JOSUE CARINI IANI IA CALDAS SANTOS Data: 07/03/2023 19:13:31-0300 Verifique em https://verifisador.iti.br

#### Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos Orientador – PPGQB/IQB/UFAL

Documento assinado digitalmente JADRIANE DE ALMEIDA XAVIER DOS SANTO Data: 02/03/2023 09:13:03-0300 Verifique em https://verificador.iti.br

Profa. Dra. Jadriane de Almeida Xavier PPGQB/IQB/UFAL



Documento assinado digitalmente CLEITON MOREIRA DA SILVA Dats: 01/03/2023 19:03:57-0300 Verifique em https://verificador.iti.thr

Prof. Dr. Cleiton Moreira da Silva PPGQ/ DQ / UFMG



Documento assinado digitalmente FRANCISCO ANTONIO DA SILVA CUNI IA Data: 01/03/2023 15:58:53-0300 Veritigue em https://verificador.itl.br

Prof. Dr. Francisco Antônio da Silva Cunha PPGQ/IQ/UFBA

Documento assinado digitalmente HUGO JUAREZ VIEIRA PEREIRA Data: 07/02/2023 13:58:14-0300 Veritigue em https://veriticador.iti.br

Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira PPGQB/IQB/UFAL

### AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu Senhor e Salvador Jesus Cristo por ter me concedido saúde, por ter me capacitado, guiado meus passos nos momentos decisivo e por ter aberto e fechado portas. A Ele toda a glória.

A minha família que sempre me incentivou a dar o meu melhor, e que me deu toda base necessária, carinho, amor e conselhos. Muito obrigada por todas as orações.

Ao meu orientador prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos que além de mestre, me inspira por seu profissionalismo e me incentiva a estudar mais e buscar mais. Muito obrigada pelos ensinamentos, ajuda, apoio e paciência.

Ao meu esposo Lucas por entender minha ausência, por ouvir meus medos, aguentar meus surtos e por sonhar junto comigo. Obrigada por trazer leveza, por ter me ajudado com os problemas do meu computador e por tantas vezes conseguir recuperar meus arquivos perdidos. Você é fera.

A todos os amigos do laboratório de instrumentação e desenvolvimento em química analítica (LINQA por todas as conversas, momentos de descontração, e, em especial a Célia, pelo companheirismo na chefia, nos trabalhos em conjunto, por me ajudar nos ensaios com os solos e por tantas conversas de incentivo e desabafo. A Ary, que me acompanha desde a graduação, dividindo noites de estudos, me incentivando e que sempre está pronta para me ajudar em várias situações.

Ao professor Sérgio por fornecer os derivados de julolidinas. Ao professor Ângelo de Fátima por fornecer os derivados de aminoácidos. A professora Luiza Valentina Modolo que realizou os estudos cinéticos. Ao professor Thiago Aquino que realizou os estudos de docking molecular. A professora Jadriane pelo pelo acolhimento e por disponibilizar o leitor de microplaca.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas – FAPEAL e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho

#### **RESUMO**

A inibição da atividade da urease pode ser explorada em diversas áreas, e principalmente no contexto clínico e agrícola. Assim, tem-se buscado desenvolver inibidores eficazes para este fim. Dessa forma, esse trabalho propõe avaliar a atividade dos derivados de julolidinas e de aminoácidos (com núcleo da tioureia), como inibidores da urease in vitro. Estudos cinéticos indicaram que o derivado RS12-J2 da classe das julolidinas atuou como inibidor competitivo, enquanto os outros derivados como inibidores mistos. Por fluorescência molecular foi verificado que os derivados de RS12 apresentaram maiores valores de K<sub>b</sub> (0,10 - 7,33×10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>), com a ocorrência de quenching estático, e transferência de energia não-radiativa no processo de interação. As interações hidrofóbicas foram as forças predominantes na estabilização do complexo para os derivados de **RS11** ( $\Delta H > 0$  e  $\Delta S > 0$ ), e forças de van der Waals e ligações de hidrogênio  $(\Delta H < 0 e \Delta S < 0)$  para os derivados de **RS12**. Empregando o derivado **RS12-J2** como modelo verificou-se nos estudos de fluorescência 3D, UV-vis e fluorescência sincronizada que o processo de interação levou a alteração na estrutura da enzima e a microrregião próxima ao resíduo de Tir (sítio ativo) foi mais afetada, corroborando o estudo de interação com cátions de Ni(II) por espectroscopia de absorção molecular. Por estudos de competição comprovou-se que o derivado RS12-J2 atua no sítio ativo da enzima. A avaliação do potencial inibitório dos compostos RS12-J1 e RS12-J2 nas ureases do solo demonstrou que o derivado RS12-J2 apresentou eficiência equiparada ao NBPT (inibidor comercial) para os solos S1 e S4, os quais apresentam elevado teor de matéria orgânica. Por fim, nos estudos empregando docking molecular observou-se que a orientação do anel diidrofurano desempenha um papel essencial na coordenação envolvendo o par de elétrons livres do átomo de oxigênio do anel de diidrofurano e os íons Ni(II). Para os derivados de aminoácidos inicialmente foram determinados os valores da concentração inibitória (IC<sub>50</sub>) para avaliar o potencial destes compostos em inibir a atividade da urease de Jack bean (modelo), sendo obtidos valores entre 0,37 - 0,74 µM, contudo, não foi verificada influência da enantiosseletividade, uma vez que os valores não diferiram estatisticamente a um nível de confiança de 95%, esta tendência também foi obtida nos estudos de interação para os valores de Kb. As possíveis interações intermoleculares envolvidas no processo de interação para os derivados 110-L, 110-D, 110 ac-L, 110 ac-D e 116 foram as forças de van der Waals e ligações de hidrogênio e parara os derivados 106 ac-L e 106 ac-D foram as interações hidrofóbicas. Ademais, observou-se a ocorrência de quenching estático, e que não houve influência da força iônica no processo de interação a um nível de confiança de 95%, com exceção do composto 110-L. Os estudos por fluorescência 3D e UV-vis indicaram mudanças na estrutura secundária da após o processo de interação, no qual houve transferência de energia não-radiativa. O estudo por fluorescência sincronizada indicou que os derivados 110 ac-L, 110 ac-D e 116 ligam-se à microrregião próxima ao resíduo de Tir. Já os derivados 110-L e 110-D interagem próximo aos resíduos de Trp. O estudo de competição indicou que os derivados de aminoácidos competiram pelo sítio ativo, na presença dos inibidores clássicos, corroborando o estudo de interação com cátions de Ni(II) por espectroscopia de absorção molecular. Nos ensaios empregando amostras de solo, foi observado que para todos os solos, os derivados foram mais potentes quando comparado ao NBPT. Dessa forma, os derivados de julolidinas e os derivados de aminoácidos apresentaram inibição da atividade da urease in vitro, e em amostras de solo, sendo possíveis inibidores potentes de urease.

**Palavras chaves**: Atividade ureolítica; derivados de julolidinas; derivados de aminoácidos; atividade inibitória; estudos biofísicos; técnicas espectroscópicas.

#### ABSTRACT

The inhibition of urease activity can be explored in several areas, and mainly in the clinical and agricultural context. Thus, efforts have been made to develop effective inhibitors for this purpose. Thus, this work proposes to evaluate the activity of julolidine and amino acid derivatives (with thiourea nucleus) as in vitro urease inhibitors. Kinetic studies indicated that the **RS12-J2** derivative of the julolidine class acted as a competitive inhibitor, while the other derivatives as mixed inhibitors. By molecular fluorescence it was verified that the **RS12** derivatives presented higher  $K_b$  values (0.10 - 7.33×10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>), with the occurrence of static quenching and non-radiative energy transfer in the interaction process. Hydrophobic interactions were the predominant forces in complex stabilization for **RS11** derivatives ( $\Delta H > 0$  and  $\Delta S > 0$ ), and van der Waals forces and hydrogen bonds ( $\Delta H < 0$  and  $\Delta S < 0$ ) for **RS12** derivatives. Using the **RS12-J2** derivative as a model, it was verified in the 3D fluorescence, UV-vis and synchronized fluorescence studies that the interaction process led to alteration in the enzyme structure and the microregion close to the Tyr residue (active site) was more affected, corroborating the study of interaction with Ni(II) cations by molecular absorption spectroscopy. Through competition studies, it was proved that the RS12-J2 derivative acts in the active site of the enzyme. The evaluation of the inhibitory potential of the RS12-J1 and RS12-J2 compounds on soil ureases showed that the RS12-J2 derivative showed equivalent efficiency to the NBPT (commercial inhibitor) for soils S1 and S4, which have a high content of organic matter. Finally, in studies using molecular docking, it was observed that the orientation of the dihydrofuran ring plays an essential role in the coordination involving the free electron pair of the oxygen atom of the dihydrofuran ring and the Ni(II) ions. For the amino acid derivatives, the values of the inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) were initially determined to evaluate the potential of these compounds to inhibit the activity of Jack bean urease (model), obtaining values between 0.37 - 0.74 µM, however, no influence of enantioselectivity was verified, since the values did not differ statistically at a confidence level of 95%, this tendency was also obtained in the interaction studies for K<sub>b</sub> values. The possible intermolecular interactions involved in the interaction process for derivatives 110-L, 110-D, 110 ac-L, 110 ac-D and 116 were van der Waals forces and hydrogen bonds and for derivatives 106 ac-L and 106 ac-D were the hydrophobic interactions. Furthermore, the occurrence of static quenching was observed, and that there was no influence of ionic strength on the interaction process at a confidence level of 95%, with the exception of compound 110-L. The 3D fluorescence and UV-vis studies indicated changes in the secondary structure after the interaction process, in which there was non-radiative energy transfer. The study by synchronized fluorescence indicated that derivatives 110 ac-L, 110 ac-D and 116 bind to the microregion close to the Tyr residue. Derivatives 110-L and 110-D interact close to Trp residues. The competition study indicated that amino acid derivatives competed for the active site, in the presence of classical inhibitors, corroborating the study of interaction with Ni(II) cations by molecular absorption spectroscopy. In tests using soil samples, it was observed that for all soils, derivatives were more potent when compared to NBPT. Thus, the derivatives of julolidines and the derivatives of amino acids showed inhibition of urease activity in vitro, and in soil samples, being possible potent urease inhibitors.

**Keywords:** ureolytic activity; julolidine derivatives; amino acid derivatives; inhibitory activity; biophysical studies; spectroscopic techniques

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da urease (em marca d'água, ao fundo), e destaque para o sítio ativo
da enzima, sendo W1, W2 e W3 moléculas de água18
Figura 2: Esquema ilustrando as duas etapas da reação de hidrólise da ureia 19
Figura 3. Mecanismos de hidrólise da ureia propostos (A) por Karplus e col. (1997); e
(B) por Benini e col. (1999)
Figura 4. (A) Diferentes unidades funcionais e organizações estruturais; (B)
Sobreposição e similaridade do sítio ativo das ureases de Jack bean e H. pylori 21
Figura 5. Esquema ilustrando os diferentes tipos de inibidores: (A) competitivo; (B) não
competitivo; (C) incompetitivo; (D) misto
Figura 6. Atividade ureolítica de ureases presentes na superfície das células bacterianas
da <i>H.pylori</i>
Figura 7. Derivados de ácido hidroxâmico contendo anilina com ligação simples N-
hidroxipropanamida
Figura 8. Híbridos de diidropirimidina e ácido hidroxâmico
Figura 9. Derivado para-etoxi substituído
Figura 10. Derivado 5-(2-morfolino-2-oxoetil)-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6(1H, 5H)-
diona
<b>Figura 11</b> . (A) (R)-(+)-ácido úrsnico e (B) (S)-(-)-ácido úrsnico 32
Figura 12. Gráfico relacionando a variação da população mundial (bilhões de pessoas) e
a área agricultável per capita, entre 1950 e 2050 33
Figura 13. Influência da amônia no ciclo do nitrogênio
Figura 14. (A) Derivado 2-(4-piridil) benzotiazol; (B) Derivado 2-(3-hidroxifenil)
benzotiazol
Figura 15. (A) N-[(4-clorofenil) carbamotioil] benzamida; (B) N-[(4-hidroxifenil)
carbamotioil] benzamida; (C) N-[(3-metoxifenil) carbamotioil] benzamida; (D) N-[(3-
clorofenil) carbamotioil] benzamida
Figura 16. (A) Composto (1): etil 4-(3,4-dihidroxifenil)-6-metil-2-oxo-3,4-di-hidro-1H-
pirimidina-5-carboxilato; (B) Composto (2): etil 4-(3,4-dihidroxifenil)-6-metil-2-tioxo-
3,4-di-hidro-1H-pirimidina-5-carboxilato; (C) Composto (3): etil 4-(4-hidroxi-3-metoxi-
fenil)-6-metil-2-tioxo-3,4-di-hidro-1H-pirimidina-5-carboxilato; (D) Composto (4): etil
4-(4-hidroxi-3,5-dimetoxi-fenil)-6-metil-2-tioxo-3,4-di-hidro-1H-pirimidina-5-
carboxilato
Figura 17. Alicina

Figura 18. (A) 4-(2-hidroxibenzilidenoamino) fenol; (B), 4-(3-hidroxibenzilidenoamino)
fenol
Figura 19. (A) Ibuprofeno e (B) Diclofope-metílico
Figura 20. (A) Bronfeniramina; (B) Clorferinamina e (C) orfenadrina
Figura 21. Complexos quirais macrocíclicos de Mn(III)
Figura 22. Derivado 3 - [(R)-(3-bromo-5-cloro-2-hidroxifenil) metilenamino] propano-
1,2- diol
Figura 23. Derivado 6-metil-9-oxo-N-(1-feniletil) xanteno-2-carboxamida
Figura 24. Compostos ácido 1-(R) e (S)-aminometilpentilfosfônico
<b>Figura 25</b> . R-(-) e S-(+)-carvona
Figura 26. Derivado 2-(4-nitrofenil)-3-(4-(pirrolidin-1-il) fenil)-3,3a-di-hidro-2H-
pirazol[3,4-d] tiazol(6H)-tiona
Figura 27 Derivado (E,Z)-(S)-2-(6-metoxinaftalen-2-il)-N'-(2,3,4-trimetoxibenzilideno)
propano-hidrazina
Figura 28. (R ou S)-1-(1H-benzo[d]imidazol-2-il) etanol
Figura 29. (A) Ácido 2-carboxi-3-(3,4-dihidroxifenil) propilfosfônico; (B) Ácido 1-(3,4-
dihidroxifenil)-2-metoxicarboniletil (2-carboxietil) fosfínico
Figura 30. Estrutura mais simples das julolidinas
Figura 31. Derivado ácido 2-ciano-3-(5'-(cis,cis-1,7-dietoxi-3-isopropiljulolidinil)-3,3'-
dimetil-2,2'-bitiofen-5-il) acrílico
Figura 32. Derivados de cumarina associada ao núcleo da julolidina
Figura 33. (A) compostos Flavesine G; (B) Flavesine J e (C) Alopecurina B 52
Figura 34. Sonda fluorescente de julolidina - fluoresceína para a detecção de cisteína.52
Figura 35. (A) 9-(2,2-dicianovinil) julolidina; (B) 2,3-bis (4-(fenil (4-(1,2,2-
trifenilvinil)fenil) amino) fenil) fumaronitrila
Figura 36. (E)-9-((2-(6-cloropiridazin-3-il) hidrazono) metil)-2,3,6,7 tetrahidro-1H,5H-
pirido [3,2,1-il] quinolin-8-ol)
Figura 37. Esquema de estrutura dos derivados de julolidinas. (A) RS11-J1; (B) RS11-
<b>J2</b> ; (C) <b>RS12-J1</b> ; (D) <b>RS12-J2</b>
Figura 38. Derivado 3β-(L-Glicil)-Lup-20 (29)-eno-28-diol-3,5,6-trimetilpirazin-2-
carboxilato

Figura 39. (A) L-treonina; (B) L-triptofano; (C) L-valina
Figura 40. (A) (S)-N-(3-hidroxicarbamoil-propionil)-fenilalanina; (B) (S)-N-(3-
hidroxicarbamoil-propionil)-prolina; (C) (S)-N-(3-hidroxicarbamoil-propionil)-
fenilalanina ácido hidroxâmico; (D) (S)-N-(3-hidroxicarbamoil-propionil)-prolina ácido
hidroxâmico
Figura 41. (A) Terbutil (S,E)-(3-(2-(2-hidroxibenzilideno) hidrazina)-3-oxo-1-
fenilpropil) carbamato; (B) Terbutil(S,E)-(1-(2-(4-clorobenzilideno) hidrazineil)-4-metil-
1-oxopentan-2-il) carbamato; (C) Terbutil (S,E)-(1-(2-(2,4-di-hidroxibenzilideno)
hidrazina)-4-metil-1-oxopentan-2-il) carbamato
<b>Figura 42</b> . 1-aril-3-(4-aminossulfonilfenil) tioureia com R= 4-ClC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> 60
Figura 43. 1-(4-clorofenil)-3-palmitoiltioureia
Figura 44. Derivado N-(2-cloro-4-nitrofenil)-2-(2-(4-isobutilfenil) propanoil) hidrazina-
1-carbotioamida
Figura 45. Esquema de estrutura dos derivados de aminoácidos com núcleo da tioureia.
(A) 110-L; (B) 110-D; (C) 110 ac-L; (D) 110 ac-D; (E) 116; (F) 106 ac-L; (G) 106 ac-
<b>D.</b>
Figura 46. Gráficos de Lineweaver-Burk para os derivados (A) RS11-J1; (B) RS11-J2;
(C) <b>RS12-J1</b> ; (D) <b>RS12-J2</b>
Figura 47. (A) BA5-S; (B) 1-(3-clorofenil)-3-(3,4-diclorofenil) tioureia
Figura 48. (A) (Z)-N-(3-(4-aminossulfonilfenil)-4-metiltiazol-2(3H)-ilideno)-3-
fluorobenzamida; (B) 1-(4- fluorobenzil)-4-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il) metil)-
1H-1,2,3-triazolenzima
Figura 49. (A) Perfil espectral de emissão de urease (2 $\mu$ M) na presença de diferentes
concentrações de <b>RS12-J2</b> a pH 7,4 e 38 °C. (B) Gráfico de supressão de Stern-Volmer.
(C) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação
Figura 50. Os espectros de fluorescência tridimensional da: (A) urease e (B) do complexo
$\textbf{RS12-J2}$ -urease em pH 7,00. A enzima e os ligantes foram usados a 2,0 e 40 $\mu M,$
respectivamente
Figura 51. Espectros de fluorescência sincronizada de urease (2,0 µM) após adição de
concentrações crescentes de <b>RS12-J2</b> em pH 7,4, monitorando (A) $\Delta\lambda = 60$ nm (resíduos
de Trp) e (B) $\Delta\lambda = 15$ nm (resíduos de Tir)
Figura 52. Espectros de absorção no UV-vis da urease na ausência e presença do RS12-
<b>J2</b> , a pH 7,4

Figura 53. Espectro de UV-vis do RS12-J2 na presença e ausência de íons Ni(II) todos
na mesma concentração (10 µM) em pH 7,4 90
Figura 54. Sobreposição dos espectros normalizados de fluorescência da Urease (10 $\mu$ M)
que atua como doador (D) de radiação e absorção molecular do $\textbf{RS12-J2}~(20~\mu\text{M})$ que
atua como aceptor em pH 7,4
Figura 55. Estrutura dos derivados benzotiazóis (A) BZT-10 e (B) BZT-17
Figura 56. Estrutura dos derivados benzotiazóis (A) BTU-26; (B) BTU-32; (C) BTU-34;
(D) BTU-38
Figura 57. Interações de RS11-J1 (A; ciano), RS11-J2 (A; roxo), RS12-J1 (B; laranja)
e <b>RS12-J2</b> (B; amarelo) com metais Ni e resíduos da urease de <i>Jack bean</i> . A conformação
de ligação dos ligantes é mostrada na representação em bastão e os dois metais Ni são
representados por esferas verdes
Figura 58. Gráficos RMSD para os átomos da cadeia principal Cα da urease (A) e RS12-
$J2$ (B). Gráficos Rg do complexo urease (C). Gráficos RMSF para os átomos C $\alpha$ da cadeia
principal da urease (D) com numeração do PDB. Gráficos SASA de urease sozinha (E) e
<b>RS12-J2</b> (F)
Figura 59. Instantâneos representativos mostrando poucas mudanças no arranjo espacial
do derivado <b>RS12-J2</b> em 1 (amarelo) e 15 ns (ciano) no sítio ativo da urease
Figura 60. (A) Derivados de ibuprofeno hidrazida e (B) derivado mais ativo de
aciltioureia
Figura 61. Derivados de diidropirimidina e ácido hidroxâmico
Figura 62. (A) 4-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-6-metil-2-tioxo-3,4-di-hidro-1H-
pirimidina-5-carboxilato e (B) N-carbamotioilbenzamida
Figura 63. (A) Perfil espectral de emissão de urease (2 $\mu$ M) na presença de diferentes
concentrações de <b>110 ac-D</b> a pH 7,4 e 38 °C. (B) Gráfico de supressão de Stern-Volmer.
(C) Curva logarítmica dupla para cálculo constante de ligação104
Figura 64. Avaliação do efeito do NaCl (200 mM) no processo de interação entre urease
e derivados de aminoácidos, em pH = 7,4 109
Figura 65. (A) Os espectros de fluorescência tridimensional da urease; (B) Espectro do
complexo 110 ac-D -urease, em pH 7. A enzima e os ligantes foram usados a 2,0 e 10
μM, respectivamente
Figura 66. N-3, N-3'-bis-(dissubstituído)isoftalil-bis-(tioureias) simétricas 113

Figura 67. Espectros de fluorescência sincronizada de urease (2,0 $\mu$ M) após adição de
concentrações crescentes de <b>110 ac-D</b> em pH 7,4, monitorando (A) $\Delta\lambda = 60$ nm (resíduos
de Tir) e (B) $\Delta\lambda = 15$ nm (resíduos de Tir)
Figura 68. Espectros de absorção no UV-vis da urease na ausência e presença do derivado
110 ac-D, a pH 7,4
Figura 69. Espectro de UV-vis do 110 ac-D (10 $\mu$ M) na presença e ausência de íons
Ni(II) (20 µM) em pH 7,4 116
Figura 70. (A) Derivado BA5-S e (B) BA7-S 118
Figura 71. Sobreposição dos espectros normalizados de fluorescência da Urease (10 $\mu$ M)
que atua como doador (D) de radiação e absorção molecular do 110 ac-D (20 $\mu M)$ que
atua como aceptor em pH 7.4

Figura S5 1. (D1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de **RS11-J1** a pH 7,4 e 22 °C. (D2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (D3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação ...... 135 Figura S5 2. (E1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de RS11-J1 a pH 7,4 e 30 °C. (E2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. Figura S5 3. (F1) Perfil espectral de emissão de urease  $(2 \mu M)$  na presença de diferentes concentrações de **RS11-J1** a pH 7,4 e 38 °C. (F2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. **Figura S5 4**. (G1) Perfil espectral de emissão de urease  $(2 \mu M)$  na presença de diferentes concentrações de **RS11-J2** a pH 7,4 e 22 °C. (G2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. **Figura S5 5**. (H1) Perfil espectral de emissão de urease  $(2 \mu M)$  na presença de diferentes concentrações de **RS11-J2** a pH 7,4 30 °C. (H2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. **Figura S5 6**. (11) Perfil espectral de emissão de urease  $(2 \ \mu M)$  na presença de diferentes concentrações de RS11-J2 a pH 7,4 38 °C. (I2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. Figura S5 7. (J1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de RS12-J1 a pH 7,4 22 °C. (J2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (J3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação. ..... 141

Figura S6 1. (D1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de 110-L a pH 7,4 e 22 °C. (D2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (D3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação ...... 147 Figura S6 2. (E1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de 110-L a pH 7,4 e 30 °C. (E2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. Figura S6 3. (F1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de 110-L a pH 7,4 e 38 °C. (F2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. Figura S6 4. (G1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de 110-D a pH 7,4 e 22 °C. (G2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. **Figura S6 5**. (H1) Perfil espectral de emissão de urease  $(2 \mu M)$  na presença de diferentes concentrações de 110-D a pH 7,4 e 30 °C. (H2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. Figura S6 6. (11) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de 110-D a pH 7,4 e 38 °C. (I2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. 

Figura S6 7. (J1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de **110 ac-L** a pH 7,4 e 22 °C. (J2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. Figura S6 8. (K1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de 110 ac-L a pH 7,4 e 30 °C. (K2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (K3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação......154 Figura S6 9. (L1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de 110 ac-L a pH 7,4 e 38 °C. (L2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. Figura S6 10. (M1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de **110 ac-D** a pH 7,4 e 22 °C. (M2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (M3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação. ...... 156 Figura S6 11. (N1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de **110 ac-D** a pH 7,4 e 30 °C. (N2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. Figura S6 12. (O1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de **116** a pH 7,4 e 22 °C. (O2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (O3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação......158 Figura S6 13. (P1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de **116** a pH 7,4 e 30 °C. (P2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (P3) Figura S6 14. (Q1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de **116** a pH 7,4 e 38 °C. (Q2). Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (Q3) Figura S6 15. (R1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de 106 ac-L a pH 7,4 e 38 °C. (R2). Gráfico de supressão de Stern-Volmer. Figura S6 16. (S1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de **106 ac-L** a pH 7,4 e 38 °C. (S2). Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (S3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação...... 162 Figura S6 17. (T1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de **106 ac-L** a pH 7,4 e 38 °C. (T2). Gráfico de supressão de Stern-Volmer. 

Figura S6 18. (U1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de **106 ac-D** a pH 7,4 e 38 °C. (U2). Gráfico de supressão de Stern-Volmer. Figura S6 19. (V1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de **106 ac-D** a pH 7,4 e 38 °C. (V2). Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (V3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação......165 Figura S6 20. (X1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de **106 ac-D** a pH 7,4 e 38 °C. (X2). Gráfico de supressão de Stern-Volmer. Figura S6 21. Os espectros de fluorescência tridimensional da urease na presença do: (C) 110-L); (D) 110- D; (E) 110 ac-L; (F) 116) em pH 7,4. A enzima e os ligantes foram Figura S6 22. Espectros de fluorescência sincronizada de urease (2,0 µM) após adição de concentrações crescentes de **110-** L em pH 7,4, monitorando (C)  $\Delta\lambda$  igual a 60 nm Figura S6 23. Espectros de fluorescência sincronizada de urease (2,0 µM) após adição de concentrações crescentes de 110- D em pH 7,4, monitorando (E)  $\Delta\lambda$  igual a 60 nm Figura S6 24. Espectros de fluorescência sincronizada de urease (2,0 µM) após adição de concentrações crescentes de **110 ac-L** em pH 7,4, monitorando (G)  $\Delta\lambda$  igual a 60 nm Figura S6 25. Espectros de fluorescência sincronizada de urease (2,0 µM) após adição de concentrações crescentes de 116 em pH 7,4, monitorando (I)  $\Delta\lambda$  igual a 60 nm Figura S6 26. Espectros de absorção no UV-vis da urease na ausência e presença do (A) 110-L; (B) 110-D; (C) 110 ac-L; (D) 116; (E) 106 ac-L; (F) 106 ac-D, a pH 7,4..... 170 Figura S6 27. Espectros de UV-vis do (A) 110-L; (B) 110-D; (C) 110 ac-L; (D) 116; (E) 106 ac-L; (D) 106 ac-D. Os compostos 110-L, 110-D, 110 ac-L e 116 estavam na concentração de 10 µM na presença e ausência de íons Ni(II) a 20 µM, em pH 7,4. Os compostos 106 ac-L e 106 ac-D estavam na concentração de 10 µM na presença e ausência de íons Ni(II) a 10 µM, em pH 7,4. ..... 171 Figura S6 28. Sobreposição dos espectros normalizados de fluorescência da Urease (10  $\mu$ M) que atua como doador (D) de radiação e absorção molecular do: (A) **110-L** (40  $\mu$ M);

(B) <b>110-D</b> (40 $\mu$ M); (C) <b>110 ac-L</b> (20 $\mu$ M); (D) 116 (20 $\mu$ M) que atua como ace	eptor em
pH 7,4	172

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais técnicas empregadas em estudos biofísicos e suas respectivas
informações obtidas, vantagens e desvantagens
<b>Tabela 2</b> . Valores das constantes de inibição urease na presença de julolidinas
Tabela 3. Parâmetros de ligação e termodinâmico para a interação entre urease e os
derivados da julolidina
Tabela 4. Parâmetros de fluorescência tridimensional para urease livre ou na presença do
composto <b>RS12-J2</b>
Tabela 5. Inibição de ureases em diferentes amostras de solo na presença de 0,5 mM
RS12-J1 e <b>RS12-J2</b> em comparação com NBPT93
Tabela 6. Valores de IC <sub>50</sub> dos derivados de aminoácidos e dos inibidores clássicos:
Hidroxuireia (HU), Tioureia (TU), Ácido Acetohidroxâmico (AA) e NBPT 100
Tabela 7. Parâmetros de ligação e termodinâmico para a interação entre urease e os
derivados de aminoácidos106
Tabela 8. Parâmetros de fluorescência tridimensional para urease livre ou na presença
dos derivados de aminoácidos111
Tabela 9. Parâmetros de fluorescência sincronizada para urease na presença dos
derivados de aminoácidos114
Tabela 10. Relação das constantes de ligação da urease na ausência (Kb) e na presença
(Kb <sup>'</sup> ) dos inibidores clássicos da urease
Tabela 11. Parâmetros calculados relacionados ao processo de FRET quanto a interação
entre urease e derivados de aminoácidos119
Tabela 12. Inibição da urease em diferentes amostras de solo na presença de 0,5 mM dos
derivados de aminoácidos em comparação com o NBPT 120
Tabela S4 1. Características fisicoquímicas das amostras de solo usadas (S1, S2, S3, S4).

# LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

	······································
3D	Tridimensional
DMSC	) Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
F	Fluorescência na presença do ligante
F <sub>0</sub>	Fluorescência na ausência do ligante
FRET	Transferência de energia por ressonância de fluorescência
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória média
K <sub>b</sub>	Constante de ligação
Ki	Constante de inibição
Ksv	Constante de Stern-Volmer
CIM	Concentração inibitória mínima
n	Número de sítios de ligação do complexo
NBPT	N-(n-butil) tiofosfórico triamida
Phe	Fenilalanina
Tir	Tirosina
Trp	Triptofano
UV	Ultravioleta-visível
ΔG	Energia livre de Gibbs
$\Delta H$	Variação de Entalpia
$\Delta S$	Variação de Entropia
Δλ	Deslocamento Stokes

- $\lambda_{em} \qquad Comprimento \ de \ onda \ de \ emissão$
- $\lambda_{ex} \qquad Comprimento \ de \ onda \ de \ excitação$

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	. 18
1.1. Urease: aspectos estruturais importantes	. 18
1.2. Importância de inibir enzimas	. 22
1.3. Aplicações de inibidores de urease no contexto clínico e agrícola	. 26
1.3.1. Aplicação de inibidores de urease no contexto clínico	. 26
1.3.2. Aplicação de inibidores de urease no contexto agrícola	. 33
1.4. Importância da enantiosseletividade no desenvolvimento de inibidores enzimáticos	. 41
1.4.2. Derivados de aminoácidos associados a tioureia: um potencial inibidor de urease.	. 55
1.5. Técnicas para avaliação do processo de interação proteína-ligante	. 62
1.5.1. Espectroscopia de fluorescência molecular	. 66
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE DO TRABALHO	. 68
3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	. 69
3.1 Geral	. 69
3.2 Específicos	. 69
4. EXPERIMENTAL	. 70
4.1. Reagentes e preparo das soluções para os estudos de interação	. 70
4.2. Equipamentos utilizados	. 70
4.3. Ensaios enzimáticos e cinéticos para os derivados de julolidinas	.71
4.4. Determinação do valor IC <sub>50</sub> para os derivados de aminoácidos	. 72
4.5. Medidas de fluorescência no estado estacionário	. 72
4.6. Fluorescência tridimensional (3D): avaliação de alterações conformacionais	.73
4.7. Fluorescência sincronizada: avaliação do microambiente dos resíduos de Tir e Trp	.73
4.8. Estudos por UV-vis	.73
4.9. Estudos de competição	.74
4.10. Transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET)	. 74
4.11. Atividade antiureolítica em amostras de solo	. 74
PARTE I. DERIVADOS DE JULOLIDINAS	. 77
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	. 77
5.1. Estudos Cinéticos	. 77
5.2. Estudos de interação e parâmetros termodinâmicos	. 80
5.3. Avaliação de mudanças conformacionais da urease	. 85
5.4. Estudos por fluorescência sincronizada	. 87
5.5. Estudos por UV-vis	. 88
5.6. Avaliação do sítio preferencial de interação	. 89

5.7. Estudo de transferência de energia ressonante	
5.8. Avaliação do potencial de inibição da urease em amostras de solo	
5.9. Docking molecular	
5.9.1. Simulações de Dinâmica Molecular	
5.9.2. Cálculos MM-PBSA	
5.10. CONCLUSÕES	
PARTE II. DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS	
6. RESULTADOS	
6.1. Determinação do valor IC50 para os derivados de aminoácidos	
6.2. Estudos de interação e parâmetros termodinâmicos	102
6.3. Avaliação de mudanças conformacionais da urease	109
6.4. Estudos de fluorescência sincronizada	
6.5. Estudos por UV-vis	
6.6. Avaliação do sítio preferencial de interação	116
6.7. Estudo de transferência de energia ressonante (FRET)	117
6.8. Avaliação do potencial de inibição da urease em amostras de solo	119
6.9. CONCLUSÕES	121
7. CONCLUSÕES GERAIS	121
8. PERSPECTIVAS	121
REFERÊNCIAS	122
APÊNDICES	135

# 1. INTRODUÇÃO

1.1. Urease: aspectos estruturais importantes

A urease (ureia amidohidrolase EC 3.3.1.5) é a única metalohidrolase dinuclear a possuir íons Ni(II) no sítio ativo (KRAJEWSKA, 2009). O sítio ativo da urease foi caracterizado a partir de estudos espectroscópicos empregando diferentes técnicas de absorção de raios-X (HASNAIN & PIGGOTT, 1983). Esses estudos indicaram que os dois íons de Ni(II) estão ligados por meio de uma ponte através de resíduo de lisina carbamilada e um íon hidróxido (Fig. 1). Este sistema apresenta elevada afinidade, de forma que a remoção destes só ocorre com o uso de desnaturantes ou ácidos (KAFARSKI & TALMA, 2018). Além disso, um dos íons de Ni(II) está ligado a um resíduo de aspartato e cada íon metálico também está ligado a dois resíduos de histidina e a uma molécula de água (KAPPAUN *et al.*, 2018).

**Figura 1**. Estrutura da urease (em marca d'água, ao fundo), e destaque para o sítio ativo da enzima, sendo W1, W2 e W3 moléculas de água



Fonte: Adaptado de LAGE et al., 2018.

As ureases atuam na hidrólise da ureia a uma velocidade de até 10<sup>32</sup> vezes maior que a velocidade da reação não catalisada (KAPPAUN *et al.*, 2018). Do ponto de vista reacional, o processo de hidrólise da ureia envolve duas etapas: na primeira, uma molécula de amônia e uma molécula de ácido carbâmico são formadas. Em solução aquosa, a segunda etapa consiste na conversão espontânea do carbamato a segunda molécula de amônia e ácido carbônico (Fig. 2). Este processo resulta no aumento do pH do meio, devido ao caráter básico da amônia (GOULD, 2014; KONIECZNA *et al.*, 2012). Esse evento ocorre espontaneamente em condição de pH fisiológico (7,20), uma vez que a enzima é ativa no intervalo de pH entre 4 a 10, e apresenta máxima eficiência em pH próximo a 8 (BALASUBRAMANIAN & PONNURAJ, 2010).

Figura 2: Esquema ilustrando as duas etapas da reação de hidrólise da ureia



Fonte: Elaborado pela autora. Adaptado de Rego et al. 2018

O mecanismo de hidrólise da ureia pela urease é bem reportado. De forma geral, a ureia desloca as moléculas de água do sítio ativo da urease e se liga a um dos íons de Ni(II), por meio do oxigênio carbonílico, tornando o carbono da ureia mais eletrofílico e, portanto, mais suscetível ao ataque nucleofílico. As principais divergências surgem com relação ao ataque nucleofílico. Karplus e col. (1997). sugeriram que a etapa subsequente seria o ataque nucleofílico pela forma de hidróxido da molécula de água ligada ao segundo íon Ni(II) para formar um intermediário tetraédrico. Assim, o nitrogênio da amida se tornaria mais básico, facilitando a posterior transferência de um próton da forma protonada da cadeia lateral do resíduo de α-His320, em uma etapa que ocorreria concomitantemente ou após o ataque nucleofílico (Figura 3A) (MAZZEI et al., 2020). Por outro lado, Benini e col. (1999) defendem que na etapa seguinte a ureia se liga ao outro íon de Ni(II) por meio de um dos átomos de nitrogênio amídico, estabelecendo uma ligação bidentada com a urease, o que facilita o ataque nucleofílico no carbono carbonílico, o qual, ocorreria pela hidroxila ligada em ponte entre os íons de Ni(II), resultando em um intermediário tetraédrico, a partir do qual a NH3 e carbamato são liberados (Figura 3B) (MAZZEI et al., 2020).





Fonte: Retirado de Mazzei et al., 2020

As ureases são produzidas por bactérias, fungos, plantas e invertebrados, e a partir da atividade ureolítica fornecem nitrogênio, que auxilia no crescimento desses organismos (KAPPAUN *et al.*, 2018), além, de diminuir o acúmulo de nitrogênio quando as dietas contêm alto teor de ureia (GETAHUN *et al.*, 2019). Estudos de cristalografia de raios-X revelaram que ureases vegetais e bacterianas possuem uma estrutura trimérica básica comum, diferindo no número de polipeptídios da unidade funcional (Fig. 4A).

O número de cadeias polipeptídicas que formam a unidade funcional varia de acordo com a fonte de urease. Para ureases vegetais e fúngicas, esta unidade funcional é formada por uma única cadeia polipeptídica ( $\alpha$ ). A unidade funcional das ureases bacterianas é formada por dois ( $\alpha \in \beta$ , até então encontradas apenas no gênero Helicobacter) ou três ( $\alpha, \beta \in \gamma$ ) tipos de cadeias polipeptídicas. A estrutura mais abundante das ureases vegetais é um dímero de trímeros ( $\alpha_3$ )<sub>2</sub>. As ureases bacterianas são trímeros ([ $\alpha\beta\gamma$ ]<sub>3</sub>), enquanto a urease de *Helicobacter pylori* foi cristalizada como um tetrâmero de trímeros ([ $\alpha\beta$ ]<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (Fig. 4A) (KAPPAUN *et al.*, 2018). Apesar de se observar diferença no número de subunidades, a estrutura do sítio ativo é conservada e induz ao mesmo mecanismo quanto a atividade catalítica (Fig. 4B).

**Figura 4**. (A) Diferentes unidades funcionais e organizações estruturais; (B) Sobreposição e similaridade do sítio ativo das ureases de *Jack bean* e *H. pylori*.



Fonte: (A) Adaptado de KAPPAUN et al., 2018; (B) LAGE et al., 2018

Historicamente, tanto a urease quanto a ureia representam marcos da investigação científica. O primeiro microrganismo ureolítico identificado foi o *Micrococcus ureae* isolado da urina em 1864 por van Tieghem, enquanto que a primeira enzima ureolítica foi obtida em 1874 por Musculus também a partir da urina e, conforme proposto por Miquel em 1890, foi denominada urease (KRAJEWSKA, 2009).

A urease de *Canavalia ensiformis* (feijão de-porco ou *Jack bean*) foi a primeira enzima cristalizada (BALASUBRAMANIAN & PONNURAJ, 2010). Essa enzima é composta por 840 aminoácidos, sendo 90 resíduos de cisteína, além de quatro resíduos de triptofano nas posições 495, 648, 708 e 728, e vinte e um resíduos de Tir (18, 32, 46, 171, 179, 188, 279, 283, 306, 309, 349, 410, 417, 544, 676, 680, 693, 750, 778, 814, 837), com massa molar, sem os íons Ni(II), de 90,77 kDa (BALASUBRAMANIAN & PONNURAJ, 2010; TAKISHIMA; SUGA; MAMIYA, 1988). Devido à alta similaridade no sítio ativo das ureases vegetais e bacterianas, a urease de *Jack bean* é amplamente empregada como modelo de urease em estudos *in vitro*, por ser mais barata comercialmente.

Já descoberta da ureia na urina humana foi reportada pela primeira por H.M. Rouelle em 1773, e mais tarde se tornou o primeiro composto orgânico preparado em condições laboratoriais, sendo estável e com meia-vida da hidrólise não enzimática igual a 3,6 anos (KRAJEWSKA, 2009). Adicionalmente, Fourcroy e Vauquelin em 1798 descobriram que amônia na urina derivava da fermentação da ureia (KRAJEWSKA, 2009). Atualmente já se sabe que a ureia é um produto endógeno do catabolismo de proteínas e aminoácidos e aproximadamente de 20 a 35 g de ureia são excretados na urina humana por dia (KONIECZNA *et al.*, 2012).

Nesse contexto, a ureia tem sido usada em grandes quantidades como principal fertilizante nitrogenado, sendo uma fonte exógena de amônia para as plantas. Ademais, diversos compostos têm sido sintetizados para aplicações como inibidores de urease nos últimos anos, visando produzir fertilizantes nitrogenados de alta eficiência. Dentre os diferentes inibidores, podemos destacar: *N*-(n-butil) tiofosfórico triamida (NBPT), que já é amplamente utilizado e, alternativamente, novos derivados de benzotiazóis, imidazóis e benzoiltioureia, naftaldeído semicarbazona, fosforamidas, benzaldeídos, além de fluoreto, íons metálicos, hidroxiureia, tioureia e produtos naturais (TAVARES *et al.*, 2021a).

#### 1.2. Importância de inibir enzimas

As enzimas são necessárias para a maioria, senão todos, os processos vitais e atuam de forma a catalisar uma reação bioquímica, reduzindo a energia de ativação necessária para que a mesma ocorra (COOPER, 2000). Na ausência de catálise enzimática, a maioria das reações bioquímicas é tão lenta que não ocorreria nas condições

amenas de temperatura e pressão compatíveis com a vida. No entanto, as enzimas precisam ser rigidamente reguladas para garantir que os níveis do produto não aumentem para níveis indesejados; e em outros casos precisam ser inibidas, como é o caso de muitos tratamentos terapêuticos que se baseiam na inibição enzimática, realizada por meio de inibidores (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002).

Os processos de inibição de enzimas estão divididos em dois tipos: inibição reversível e inibição irreversível. Na inibição irreversível o inibidor se liga ao sítio ativo através de ligação covalente. Porém, inibidores dessa natureza não são muito estudados, pelo fato de essa ligação poder promover a destruição de grupos funcionais essenciais à enzima, e ainda estão relacionados com desvantagens como toxicidade geral e imunogenicidade (KAFARSKI; TALMA, 2018; KUDDUS, 2019).

A inibição reversível, por sua vez, leva à formação de um complexo, estabilizado por uma ou mais interações químicas não covalentes como, ligação de hidrogênio, interação hidrofóbica, ligação iônica, van der Walls e dipolo-dipolo, em um sistema em equilíbrio, no qual a enzima apresenta um grau definido de inibição que é dependente das concentrações dos reagentes no meio (enzima, inibidor e substrato) e se divide em três tipos básicos: competitivo, não competitivo e incompetitivo. Além desses tipos de inibidores, também existe a inibição mista (MARQUES & YAMANAKA, 2008).

Os inibidores competitivos possuem estruturas semelhantes ao do substrato, competindo pelo sítio ativo da enzima. Como consequência, tem-se a diminuição do número de moléculas de substrato que podem se ligar à enzima, de modo que a velocidade de reação é reduzida (Fig. 5A). Dessa forma, o nível de inibição depende da concentração relativa de substrato e inibidor (MARQUES & YAMANAKA, 2008).

Os inibidores não competitivos ligam-se a um local diferente do sítio ativo, denominado sítio alostérico (Fig. 5B). Devido a essa ligação, ele deforma a estrutura da enzima de modo a não permitir a formação do complexo enzima-substrato. Como esses inibidores não competem com o substrato, o nível de inibição não é afetado pela concentração do substrato (KUDDUS, 2019).

Um inibidor incompetitivo é aquele que se liga somente ao complexo enzimasubstrato (Fig. 5C). A ligação entre o inibidor e o complexo é efetuada por um sítio de ligação diferente do sítio ativo, como no caso do inibidor não competitivo, porém, no processo de não competitivo, como dito anteriormente, o inibidor se liga tanto à enzima livre, quanto ao complexo, o que não ocorre com o processo de inibição incompetitiva, em que o inibidor tem afinidade apenas pelo complexo formado (KUDDUS, 2019). Este tipo de inibição é raro, mas pode ocorrer em enzimas multiméricas (MARQUES & YAMANAKA, 2008).

Por fim, na inibição mista o inibidor se liga a uma região da enzima, diferente do sítio ativo, sem interferir na ligação do substrato, o qual também não impede a ligação do inibidor (Fig. 5D). O inibidor pode se ligar tanto a enzima livre, quanto ao complexo enzima-substrato, formando o complexo enzima-substrato-inibidor, que é cataliticamente inativo, ou seja, o substrato não vai ser transformado no produto da reação (KAFARSKI; TALMA, 2018).

Nesse contexto, muitos medicamentos e pesticidas comumente utilizados atuam como inibidores. Por exemplo, derivados de safinamida, um anticonvulsivante usado para tratar a doença de Parkinson, é um inibidor reversível de monoamina oxidases presentes em plaquetas, células gliais e neurônios serotonérgicos. Já os derivados de hidrazina, usados como antidepressivos, inibem as monoamina oxidases de forma irreversível (RAMSAY & TIPTON, 2017). Além disso, muitos dos inseticidas mais comumente usados são baseados em organofosforados ou carbamatos, que atuam inibindo a acetilcolinesterase (GRAZIANO, 2019). Os organofosforados são ditos inibidores irreversíveis da acetilcolinesterase, enquanto os carbamatos inibidores competitivos (CALDAS, 2000).

Inúmeros inibidores já foram reportados com potencial para inibir a atividade da urease, porém, ainda há a necessidade de desenvolver novos inibidores, uma vez que existe potencial de aplicação em diversas áreas, como genética, bioquímica, fisiologia, agricultura, pecuária, engenharia e medicina, destacando-se as aplicações clínicas e agrícolas que serão exploradas nos tópicos seguintes (KRAJEWSKA, 2018; MODOLO *et al.*, 2018; GRAHAMA & MIFTAHUSSURUR, 2018; CANTARELLA *et al.*, 2018).





Fonte: Adaptado de MARQUES & YAMANAKA, 2008

#### 1.3. Aplicações de inibidores de urease no contexto clínico e agrícola

A necessidade de se desenvolver inibidores de urease é decorrente do fato de as implicações da hidrólise da ureia serem relevantes em vários aspectos. Estudos dessa natureza começaram a ser desenvolvidos há aproximadamente 50 anos. Do ponto de vista clínico, a atividade da urease é um fator patogênico importante, e dez entre doze patógenos resistentes a antibióticos, designados de patógenos prioritários pela Organização Mundial de Saúde (OMS), são de fato ureolíticos (SVANE *et al.*, 2020). Do ponto de vista agrícola, inibidores de urease nas práticas agrícolas (fertilizantes de eficiência aumentada) constituem uma das estratégias para garantir o abastecimento de alimentos em quantidades suficientes, uma vez que a ureia, um dos fertilizantes que contem nitrogênio (N) mais usados em todo o mundo, sofre rapidamente hidrólise conduzida pelas ureases presentes no solo, resultando em perdas de até 70% de N para o meio ambiente (MODOLO *et al.*, 2018).

#### 1.3.1. Aplicação de inibidores de urease no contexto clínico

No contexto clínico, a bactéria patogênica humana *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) pode colonizar o estômago levando a doenças, como úlceras gástricas, gastrite, e até o desenvolvimento de câncer de estômago (REGO *et al.*, 2018). Esta bactéria produz grandes quantidades de urease (a urease representa 10% da massa total de proteínas da *H. pylori*), sendo esta encontrada no citoplasma e/ou ligada à superfície, tendo como função hidrolisar a ureia para sobreviver no ambiente gástrico ácido (MOBLEY; MENDZ; HAZELL, 2001). Postula-se que a *lise* de algumas células do patógeno leva à liberação de ureases citosólicas que se ligam à superfície das células bacterianas intactas e causam a hidrólise da ureia presente no organismo humano na concentração de 3 mM (Figura 6). A amônia (NH<sub>3</sub>) formada aumenta o pH do meio, criando um ambiente favorável para a sobrevivência da *H. pylori* (REGO *et al.*, 2018).

Figura 6. Atividade ureolítica de ureases presentes na superfície das células bacterianas da *H.pylori*.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Na cavidade oral, a *Streptococcus salivarius* produz amônia a partir da hidrólise da ureia em resposta à redução do pH meio, levando à deposição de placa dentária, que quando endurecem dão origem ao tártaro (SVANE *et al.*, 2020). Outras bactérias ureolíticas, como *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* estão envolvidos na pneumonia, formação de cálculos renais e infecções do trato urinário (JUAREZ; MATEYCA; GALVAN, 2020). Além dessas existem outras bactérias patogênicas que apresentam atividade ureolítica: *Clostridium perfringens*, *Salmonella sp.*, *Ureaplasma urealyticum*, *Yersinia enterocolitica* (REGO *et al.*, 2018).

A urease bacteriana mais estudada é a da *H. pylori*, pois estima-se que cerca de 50% da população global já foi acometida por essa bactéria (SALIH, 2009; MABEKU; NGAMGA; LEUNDJI, 2018). Esta bactéria pode persistir no estômago dos indivíduos infectados, por toda a vida, sem causar sintomas de doença. Desta forma, a alta prevalência da *H. pylori* na população humana indica que tal microrganismo desenvolveu mecanismos de resistência contra as defesas do hospedeiro (VIANNA *et al.*, 2016).

Durante os últimos 20 anos, o tratamento contra *H. pylori* consistia na combinação dos antibióticos amoxicilina e claritromicina, com omeprazol, que é um inibidor da bomba de prótons nas células. No entanto, o aumento da resistência da *H. pylori* a esses antibióticos (particularmente à claritromicina) tornou essa terapia uma opção não atraente (GRAHAMA & MIFTAHUSSURUR, 2018). Nesse contexto, outras estratégias de tratamento surgiram, que incluem o uso de compostos de bismuto combinados com um inibidor da bomba de prótons celular, ou a combinação de outras classes de antibióticos (por exemplo, fluoroquinolonas, aminopenicilinas, tetraciclinas, entre outras) (MODOLO *et al.*, 2015)

Dessa forma, os inibidores de urease podem constituir terapias eficazes para o tratamento, não só de doenças causadas pela *H. pylori*, mas também por outros microrganismos patogênicos dependentes de urease. Em 1965 já foram reportados trabalhos sobre a síntese de inibidores de urease, como derivados de ureia, ácido hidroxâmico, fosforamidato, oxima, polifenol e curcumina, dentre os quais, os fosforamidatos foram os mais ativos (FISHBEIN; CARBONE; HOCHSTEIN, 1965). Contudo, os fosforamidatos apresentam como principal limitação a rápida hidrólise em meio ácido (condição do estômago), o que inviabilizou o desenvolvimento e comercialização de medicamentos com esta classe de compostos (REGO *et al.*, 2018).

Por outro lado, os derivados do ácido hidroxâmico são fortes quelantes bidentados de íons metálicos e podem se ligar aos íons de níquel do sítio ativo da urease, tornando a enzima inativa (ALAM, 2019). O inibidor de urease mais conhecido derivado de ácidos hidroxâmicos é o ácido aceto-hidroxâmico, o qual foi aprovado como medicamento (*Lithostat*) pela FDA (Food and Drug Administration) desde 1983. No entanto, o ácido aceto-hidroxâmico requer uma dose relativamente elevada (pelo menos 1 g / dia para adultos) e exibe atividade moderada (MAMIDALA; BHIMATHATIC; VEMA, 2021). Assim, essas observações indicam fortemente a necessidade do desenvolvimento de inibidores potentes de urease com maior estabilidade e eficácia.

Nesse contexto, a maioria dos estudos destinam-se a melhorar a atividade de compostos, que já têm suas atividades inibitórias comprovadas, a partir de alterações estruturais. Por exemplo, Liu e col. (2018) avaliaram uma nova série de derivados do ácido hidroxâmico contendo anilina com ligação simples *N*-hidroxipropanamida (Fig. 7) para o tratamento de gastrite e úlcera gástrica causadas pela *H. pylori*, sendo descoberto três inibidores potentes: (1) o derivado 3-(3,5-diclorofenilamino) com concentração inibitória (*inhibitory concentration*) IC<sub>50</sub> = 0,043 µM), (2) o 3-(2-clorofenilamino) (IC<sub>50</sub> = 0,055 µM) e (3) o 3-(2,4-diclorofenilamino) ( IC<sub>50</sub> = 0,018 µM), os quais na dose de 32 mg kg<sup>-1</sup> apresentaram erradicação da *H. pylori* de 92, 85 e 100%, respectivamente, em camundongos infectados com *H. pylori* (LIU *et al.*, 2018)

$R_4$ $H$ $N$ $O$ $H$ $R_3$ $R_2$ $R_1$ $O$ $H$						
Composto	R <sub>1</sub>	$R_2$	R <sub>3</sub>	$R_4$	$R_5$	IC <sub>50</sub>
1	Н	C1	Н	Cl	Н	0,043 μM
2	Cl	Н	Н	Н	Н	0,055 μΜ
3	Cl	Н	Cl	Н	Н	0,018 µM

Figura 7. Derivados de ácido hidroxâmico contendo anilina com ligação simples *N*-hidroxipropanamida.

р

Fonte: Adaptado de LIU et al., 2018.

MAMIDALA; BHIMATHATIC; VEMA (2021) avaliaram a atividade inibitória de 24 novos híbridos de diidropirimidina e ácido hidroxâmico (Figura 8) frente a enzima urease de *H. pylori*. Dentre os compostos, dois se destacaram de forma mais acentuada: (1) 2-[[4-(4-clorofenil)-6-oxo-1,6-di-hidropirimidina-2-il]-amino]-*N*-hidroxiacetamida (com substituinte 4-cloro-fenil) com IC<sub>50</sub> = 0,082  $\mu$ M), e (2) 2-[[4-(4-hidroxifenil)-6oxo-1,6-di-hidropirimidina-2-il]-amino]-*N*-hidroxiacetamida (com substituinte 4-OHfenil) com IC<sub>50</sub> = 0,014  $\mu$ M),sendo ambos mais potentes que o ácido acetohidroxâmico (IC<sub>50</sub> = 27,4  $\mu$ M) (MAMIDALA; BHIMATHATIC; VEMA, 2021). Figura 8. Híbridos de diidropirimidina e ácido hidroxâmico



Fonte: Adaptado de MAMIDALA; BHIMATHATIC; VEMA, 2021.

Wahid e col. (2020) avaliaram a capacidade inibitória de análogos de atenolol frente a urease de *Jack bean*. Entre todos os compostos, o derivado *para*-etoxi substituído (Fig. 9) (IC<sub>50</sub> = 11,73  $\mu$ M) foi identificado como o análogo mais potente nesta série quando comparado com a tioureia (IC<sub>50</sub> = 21,74  $\mu$ M) e com o medicamento original atenolol (IC<sub>50</sub> = 64,36  $\mu$ M) (WAHID *et al.*, 2020).

Figura 9. Derivado para-etoxi substituído



Fonte: Adaptado de WAHID et al., 2020.

Abdulwahab e col. (2020) desenvolveram novos derivados de tiobarbitúricos. Todos os compostos testados inibiram efetivamente a atividade da enzima urease de *Jack bean* com valores de IC<sub>50</sub> entre 8,21 e 16,95  $\mu$ M, os quais foram superiores ao controle (tioureia, IC<sub>50</sub> = 20,04  $\mu$ M). Além disso, a atividade antibacteriana dos compostos sintetizados foi estimada frente a cepas padrão e isolados clínicos de bactérias produtoras de urease, de forma que derivado 5-(2-morfolino-2-oxoetil)-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6(1H, 5H)-diona (IC<sub>50</sub> = 8,21  $\mu$ M) (Fig. 10), superou em 2 vezes a potência do fármaco de referência, no caso a cefalexina (ABDULWAHAB *et al.*, 2020).

Figura 10. Derivado 5-(2-morfolino-2-oxoetil)-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6(1H, 5H)-diona..



Fonte: Adaptado de ABDULWAHAB et al., 2020.

Outros trabalhos, por sua vez, empenham-se no desenvolvimento de novos inibidores isolados de compostos naturais. Por exemplo, Lage e col. (2018) investigaram a capacidade de metabólitos secundários de líquens: (R)-(+)-ácido úrsnico (Fig. 11A); (S)-(-)-ácido úrsnico (Fig. 11B), em inibir a atividade da urease de *H. pylori*, sendo observado que os mesmos foram mais eficazes do que o medicamento de referência omeprazol para inibir o crescimento de *H. pylori*. A concentração inibitória mínima (CIM) para o (R)-(+)-ácido úrsnico foi de 3,8 a 7,8 vezes menor do que a do omeprazol, enquanto que para o composto (S)-(-)-ácido úrsnico foi de 2- 4 vezes mais eficiente que o fármaco (LAGE *et al.*, 2018).

Figura 11. (A) (R)-(+)-ácido úrsnico e (B) (S)-(-)-ácido úrsnico.



Fonte: Adaptado de LAGE et al., 2018.

Nos vários trabalhos de revisão é notório que houve um avanço no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de urease (KAFARSKI; TALMA, 2018; MODOLO *et al.*, 2015; SVANE *et al.*, 2020). Algumas classes de compostos orgânicos já são bem estabelecidas como potentes inibidores, como por exemplo, as quinonas, os flavonoides, os compostos heterocíclicos aromáticos, os derivados de ureia, de ácido hidroxâmico, de fosforamidato, de oxima, de polifenol e de curcumina (REGO *et al.*, 2018; KAFARSKI; TALMA, 2018;)

É observado também que a maioria dos estudos envolve interação com urease de *Jack bean*. Apesar do alto grau de homologia entre ureases de bactérias e de vegetais, pode ocorrer uma diminuição parcial ou completa da atividade inibitória dos compostos, quando testados em enzimas de diferentes espécies, uma vez que o sítio alostérico da urease é consideravelmente menos conservado do que o sítio catalítico (REGO *et al.*,2018). Assim, os inibidores que atuam por meio da interação no sítio alostérico são mais suscetíveis à discordância de resultados aplicando-se diferentes ureases. Portanto, torna-se necessário estudos envolvendo urease bacteriana no desenvolvimento de inibidores para tratar doenças causadas por bactérias ureolíticas, sendo também necessário realizar estudos de *docking* molecular empregando diferentes ureases, para se ter uma melhor compreensão e identificação dos sítios alostéricos.

Em se tratando de compostos naturais, uma visão geral demonstra claramente o grande potencial dos metabólitos secundários das plantas de diferentes classes, porém ainda existem alguns desafios a serem superados como, por exemplo, a dificuldade em isolar e identificar os constituintes de extratos vegetais; estabelecer relação entre estrutura-atividade; avaliar o mecanismo de ação dos compostos naturais puros e produzir os compostos promissores em grande escala quando a disponibilidade é limitada na natureza (MODOLO *et al.*, 2015; SVANE *et al.*, 2020)

1.3.2. Aplicação de inibidores de urease no contexto agrícola

A agricultura possui grandes desafios tendo em vista o aumento populacional. Segundo a ONU, aproximadamente 9,7 bilhões de pessoas irão habitar o planeta até 2050 (Fig. 12). Para conseguir produzir alimento suficiente seria necessário aumentar em 70% a produção agrícola até 2050, segundo a FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura). Porém com a diminuição de terras agricultáveis, devido ao crescimento das cidades e das áreas destinadas à criação de animais (que indiretamente reflete a necessidade de alimentos) surge um outro desafio: o uso de estratégias eficientes para o melhor aproveitamento dos fertilizantes, como forma de aumentar a produção agrícola (MODOLO *et al.*, 2018).

**Figura 12**. Gráfico relacionando a variação da população mundial (bilhões de pessoas) e a área agricultável per capita, entre 1950 e 2050.



Fonte: Adaptado de FAO, 2018.

Nesse contexto, os fertilizantes de nitrogênio (N) são essenciais para a produção agrícola, pois esse elemento é obrigatório para o crescimento e desenvolvimento das
plantas (RUTHROF *et al.*, 2019). A ureia é um dos fertilizantes, que contém N, mais usados em todo o mundo, principalmente devido ao seu alto teor de N (46%), custo relativamente baixo por unidade de N, disponibilidade na maioria dos mercados, alta solubilidade em água, baixa capacidade de corrosão, compatibilidade com a maioria dos fertilizantes e alta absorção foliar (CANTARELLA *et al.*, 2018). O uso de fertilizantes nitrogenados em todo o mundo atingiu mais de 109 milhões de toneladas em 2015, valor que deve ultrapassar 9,3 bilhões de toneladas até 2050, devido ao aumento da população mundial (CHAVES-SILVA *et al.*, 2020; GLOBALFERT, 2021).

Por outro lado, em condições de campo, a eficiência da ureia é reduzida devido às perdas de nitrogênio (acima de 50%) causadas, entre outros fatores, pela volatilização da NH<sub>3</sub> a partir da ação de ureases presentes no solo, microrganismos como bactérias presentes nas fezes dos animais e no solo, e materiais vegetais (DE SOUZA *et al.*, 2017). Uma outra problemática refere-se a questões ambientais, pois a hidrólise da ureia leva a formação de NH<sub>3(g)</sub> e a emissão excessiva deste composto para a atmosfera, periodicamente, causando desequilíbrio no ciclo do nitrogênio (Figura 13) (KROL *et al.*, 2020).

Parte dessa amônia combina-se com a água do solo e forma o hidróxido de amônio, que se ioniza e produz o íon amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e o íon hidróxido (OH<sup>-</sup>). Tanto o íon amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), quanto parte da a amônia (NH<sub>3</sub>) são convertidos em nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) pela ação de nitrossomas (bactérias nitrificantes), e estes, posteriormente, são convertidos em nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) pela ação de nitrobactérias (bactérias nitrificantes) CANTARELLA *et al.*, 2018). O nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) é absorvido pelas células das raízes das plantas, contribuindo na produção de aminoácidos, ácidos nucléicos e alguns metabólitos secundários (LI *et al.*, 2019; CANTARELLA *et al.*, 2018). Porém, o que não for usado pela planta poderá ser facilmente lixiviado para aquíferos, rios e lagos, contribuindo para o processo de eutrofização, resultando em florescimento de algas e redução das populações de peixes e animais (MODOLO *et al.*, 2018). Ademais, pela ação de bactérias nitrito redutases, parte dos íons nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) é reduzida a óxido nítrico NO, e este, por sua vez é reduzido pela ação das bactérias óxido nítrico redutase, a óxido nitroso N<sub>2</sub>O, um gás estufa (KROL *et al.*, 2020).

Figura 13. Influência da amônia no ciclo do nitrogênio.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Atualmente existem algumas alternativas para minimizar as perdas de nitrogênio e a diminuição da emissão de amônia gasosa, como o uso de fertilizantes de liberação lenta. Esses possuem em sua superfície produtos químicos hidrofóbicos que funcionam como uma barreira física contra a água, promovendo a liberação gradual de ureia (DE SOUZA *et al.*, 2017). Outra estratégia é o uso de inibidores de nitrificação que são capazes de retardar a oxidação do NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, evitando a formação de NO<sub>3</sub> <sup>-</sup>e a lixiviação de nitrogênio no solo (BARTH *et al.*, 2020). Alternativamente pode-se adicionar outras fontes de nitrogênio, como sulfato de amônio e nitrato de amônio, que não estão sujeitos a sofrer perdas de NH<sub>3</sub> por volatilização em solos ácidos, mas são mais caros por unidade N. Além disso, o nitrato de amônio enfrenta restrições crescentes devido ao seu uso como material explosivo (CANTARELLA *et al.*, 2018).

Inibidores de urease podem ser estratégias eficazes para o desenvolvimento de fertilizantes de eficiência aumentada. Desde 1973 trabalhos foram publicados sobre a síntese de inibidores orgânicos de urease para aplicação em solos (BREMNER; DOUGLAS, 1973). O primeiro composto a ser patenteado foi o ditiocarbamato, e desde então, muitas classes de inibidores já foram relatadas, como os derivados de fosforamidatos, hidroquinonas, quinonas, (di)tioureias substituídas, benzotiazóis, derivados cumarínicos e derivados de aldeído fenólico (CANTARELLA *et al.*, 2018).

Porém, antes da chegada das moléculas orgânicas como inibidores de urease na agricultura, espécies metálicas eram amplamente testadas. Shaw e col. (1954) avaliaram a ação dos metais, mostrando esta sequência de poder de inibição: Ag(I) ~ Hg(II) > Cu(II) > Cd(II) > Co(II) > Ni(II) > Zn(II) = Sn(II) = Mn(II) = Pb(II) (SHAW *et al.*, 1954). Os metais inibem a urease criando uma ligação química com um ou mais sítio ativo dos grupos sulfidrilas livres para produzir sulfetos de baixa solubilidade; consequentemente, o metal com maior afinidade forma o sulfeto menos solúvel, sendo o inibidor mais efetivo. Comparativamente, o efeito inibitório dos íons metálicos é menor que o efeito inibitório das fosforamidas. Além disso, a aplicação de espécies potencialmente tóxicas no solo pode causar problemas ambientais como bioacumulação, não sendo, portanto, uma aplicação prática (MODOLO *et al.*, 2018).

Dentro das diferentes classes de compostos orgânicos avaliados como inibidores de urease para solo, os fosforamidatos apresentam maior destaque, sendo o NBPT (*N*-(n-butil) tiofosfórico triamida) o derivado comercial mais conhecido, inicialmente comercializado como Agrotain nos EUA em meados de 1990 (CANTARELLA *et al.*, 2018). Atualmente, diferentes marcas comercializam o NBPT em todo o mundo (FAN *et al.*, 2018).

Mesmo o NBPT sendo bastante utilizado, há espaço para melhorias, pois este composto tem um período relativamente curto de inibição efetiva nos solos, especialmente sob altas temperaturas (CANTARELLA *et al.*, 2018). Além disso, Fan e col. (2018) descobriram que o pH do solo demonstrou ser o parâmetro que mais interfere na estabilidade (rege o efeito inibitório) do NBPT, de forma que a velocidade de decomposição do NBPT aumentou substancialmente em solo com pH mais baixo, com meia-vida de 0,07 dias em solo com pH em torno de 5,0; e com meia vida de 8,2 dias em solo com pH 8,0 (FAN *et al.*, 2018). Além da classe dos fosforamidatos, diversas outras classes de compostos já foram reportadas como sendo moléculas com potencial aplicação no solo. Nesse sentindo, serão expostos alguns resultados de trabalhos da literatura que avaliaram algumas dessas classes.

Araújo e col. (2015) avaliaram a atividade inibitória de derivados de benzotiazóis na concentração de 1,6 mM frente a urease de *Jack bean*, e frente a ureases em amostras de solo do Cerrado brasileiro. Nos estudos *in vitro*, o derivado 2-(4-piridil) benzotiazol, foi o mais ativo, tendo um percentual de inibição comparável ao da hidroxiureia (62%) (Fig. 14A). Já nos estudos em amostras de solo, o derivado que foi inativo *in vitro* foi o mais ativo 2-(3-hidroxifenil) benzotiazol (Fig. 14B) apresentando aproximadamente 45% de inibição, se mostrando mais ativo que o NBPT (38%) (ARAUJO *et al.*, 2015).





Fonte: Adaptado de ARAUJO et al., 2015.

Devido a atividade ureolítica promissora do derivado 2-(4-piridil) benzotiazol (Fig. 14A), Pereira e col. (2022) sintetizaram o benzimidazol, que é análogo ao benzotiazol, avaliando o efeito de mudança do átomo de enxofre (S) existente no 2-(4-piridil) benzotiazol, pelo grupo –NH. Dessa forma, foi observado que nos estudos *in vitro* com urease de *Jack bean*, o derivado 2-(4-piridil) benzotiazol (IC<sub>50</sub> = 0,77 mM) apresentou valor de IC<sub>50</sub> menor que o seu análogo (IC<sub>50</sub> = 2,14 mM). Nos estudos empregando cepas de *H. pylori*, foi observado que o derivado 2-(4-piridil) benzotiazol foi mais eficiente em cinco das seis cepas avaliadas, apresentando concentração inibitória mínima (CIM) entre 38-150  $\mu$ M, enquanto seu análogo foi mais eficiente em duas cepas avaliadas, apresentando CIM entre 20-164  $\mu$ M (PEREIRA *et al.*, 2022).

Brito e col. (2015) avaliaram a atividade inibitória de benzoiltioureias *N*-substituídas (BTU) na concentração de 0,5 mM frente a urease de *Jack bean* e de amostras de solo do Cerrado brasileiro. No estudo *in vitro*, o derivado denominado de *N*-[(4-clorofenil) carbamotioil] benzamida (Fig. 15A) foi o mais ativo, com 73,9% de inibição, sendo comparável ao inibidor de referência hidroxiureia (73,6%) e 3,2 vezes mais eficiente que a tioureia (22,6%). Nos estudos em amostras de solo, os derivados: *N*-[(4-hidroxifenil) carbamotioil] benzamida (Fig. 15B), *N*-[(3-metoxifenil) carbamotioil] benzamida (Fig. 15B), *N*-[(3-metoxifenil) carbamotioil] benzamida (Fig. 15D) (todos a 0,5 mM) foram os mais ativos, com inibições de 50, 48, 48%, respectivamente, assim, sendo mais efetivos do que o NBPT (40%) (BRITO *et al.*, 2015).

**Figura 15**. (A) *N*-[(4-clorofenil) carbamotioil] benzamida; (B) *N*-[(4-hidroxifenil) carbamotioil] benzamida; (C) *N*-[(3-metoxifenil) carbamotioil] benzamida; (D) *N*-[(3-clorofenil) carbamotioil] benzamida.



Fonte: Adaptado de BRITO et al., 2015.

Horta e col. (2016) avaliaram a capacidade inibitória de quatro adutos de Biginelli frente a urease de Jack bean. Os compostos foram sintetizados a partir de aldeídos fenólicos naturais associados ao núcleo ureia ou tioureia. O ensaio in vitro mostrou que os derivados: (1) etil 4-(3,4-dihidroxifenil)-6-metil-2-oxo-3,4-di-hidro-1H-pirimidina-5carboxilato (Fig. 16A) e (2) etil 4-(3,4-dihidroxifenil)-6-metil-2-tioxo-3,4-di-hidro-1Hpirimidina-5-carboxilato (Fig. 16B) foram os mais potentes, mostrando resultados (94% de inibição de urease) comparáveis ao observado para o inibidor padrão hidroxiureia. Os (3)etil 4-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-6-metil-2-tioxo-3,4-di-hidro-1Hcompostos pirimidina-5-carboxilato (Fig. 16C) e (4) etil 4-(4-hidroxi-3,5-dimetoxi-fenil)-6-metil-2tioxo-3,4-di-hidro-1H-pirimidina-5-carboxilato (Fig. 16D) tiveram um percentual de inibição de 59%. Nos estudos em amostras de solo, os derivados foram capazes de inibir as ureases do solo em diferentes extensões; 1 e 4 foram considerados tão eficiente quanto o NBPT (40% de inibição da enzima), enquanto o 3 e o 2 inibiram as ureases do solo em até 30%. Os valores de IC<sub>50</sub> para 1 e 4 foram, em média 3,25 mM, enquanto que 3 apresentou IC<sub>50</sub> = 0,05 mM (HORTA *et al.*, 2015).

**Figura 16**. (A) Composto (1): etil 4-(3,4-dihidroxifenil)-6-metil-2-oxo-3,4-di-hidro-1H-pirimidina-5-carboxilato; (B) Composto (2): etil 4-(3,4-dihidroxifenil)-6-metil-2-tioxo-3,4-di-hidro-1H-pirimidina-5-carboxilato; (C) Composto (3): etil 4-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-6-metil-2-tioxo-3,4-di-hidro-1H-pirimidina-5-carboxilato; (D) Composto (4): etil 4-(4-hidroxi-3,5-dimetoxi-fenil)-6-metil-2-tioxo-3,4-di-hidro-1H-pirimidina-5-carboxilato



Fonte: Adaptado de HORTA et al., 2015.

Mathialagan e col. (2017) avaliaram a atividade inibitória da alicina (Fig. 17), um bioinibidor, frente a ureases de amostras de solo. Os efeitos inibitórios sobre a urease no solo para aplicações agrícolas, utilizando 5% do peso da alicina sobre o peso da ureia aplicada resultou na melhor inibição da urease. Porém, a inibição da alicina foi cerca de 75% menor do que o NBPT (MATHIALAGAN *et al.*, 2017).

Figura 17. Alicina.



Fonte: Adaptado de MATHIALAGAN et al., 2017.

Chaves-Silva e col. (2020) avaliaram a atividade inibitória de derivados de base de Schiff (0,5 mM) frente a urease de *Jack bean*. Nos estudos *in vitro*, os derivados 4-(2hidroxibenzilidenoamino) fenol (Fig. 18A), 4-(3-hidroxibenzilidenoamino) fenol (Fig. 18B) foram os mais potentes, com um inibições de 66 e 58%, respectivamente, e comparáveis a hidroxiureia (63%). No solo, os compostos mais ativos foram o 4-(2hidroxibenzilidenoamino) fenol, 4-(3-hidroxibenzilidenoamino) fenol (todos a 0,5 mM), com inibições de 65 e 69, respectivamente, e assim superiores ao NBPT (52%). Por fim, o composto 4-(3-hidroxibenzilidenoamino) fenol apresentou o menor valor de IC<sub>50</sub> (28  $\mu$ M), sendo 4,7 vezes mais eficaz do que o 4-(2-hidroxibenzilidenoamino) fenol (129  $\mu$ M) (CHAVES-SILVA *et al.*, 2020).

Figura 18. (A) 4-(2-hidroxibenzilidenoamino) fenol; (B), 4-(3-hidroxibenzilidenoamino) fenol.



Fonte: Adaptado de CHAVES-SILVA et al., 2020.

De forma geral, é possível notar que nem sempre ocorre uma concordância entre os resultados dos estudos *in vitro* e em amostras de solo. Isso se deve ao fato de que o ensaio *in vitro* com urease purificada é um sistema menos complexo quando comparado ao solo, no qual tanto as características físico-químicas quanto a variedade de microrganismos e diferentes compostos podem afetar o desempenho dos inibidores avaliados de forma a melhorar ou suprimir a sua eficiência. Dessa forma, torna-se necessário no processo de desenvolvimento de inibidores a realização de estudos em amostras de solo.

Estratégias rápidas para determinar a atividade de possíveis inibidores *in vitro* e no solo são interessantes tendo em vista a otimização do tempo de análise. Nessa perspectiva Tavares e col. (2021a) desenvolveram um método simples, rápido, reprodutível e de baixo custo para avaliar os inibidores enzimáticos, empregando-se um dispositivo analítico baseado em papel. Os resultados obtidos por meio do dispositivo não

diferiram estatisticamente (intervalo de confiança de 95%) daqueles que empregam o método clássico baseado na reação de Berthelot (TAVARES *et al.*, 2021a).

Por fim, é notório que muitos compostos já foram reportados na literatura com potencial aplicação em solos. No entanto, algumas limitações ainda precisam ser superadas, como: o curto período de inibição efetiva e a vida útil limitada, sendo necessário estudos visando melhorar ainda mais os atuais inibidores de urease e desenvolver novas moléculas ou misturas de moléculas com potencial aplicação. Além disso, um outro desafio consiste na necessidade de produzir um inibidor nacional, não ficando dependente do mercado internacional quanto ao NBPT.

### 1.4. Importância da enantiosseletividade no desenvolvimento de inibidores enzimáticos

O desenvolvimento de novos inibidores para a urease é um processo desafiador, uma vez que é necessário considerar muitos aspectos, sendo, portanto, indispensável o uso de abordagens multidisciplinares (MODOLO *et al.*, 2018). Nesse contexto, um método muito empregado no desenvolvimento de inibidores consiste em ter como modelo uma estrutura tridimensional de uma enzima alvo, determinada por cristalografia de raios-X ou por RMN, ligada ao seu ligante natural (substrato) ou moléculas que regulem sua atividade (efetores), e a partir desse modelo, produzir novos inibidores. As estruturas cristalinas publicadas recentemente indicam a necessidade de pelo menos três elementos indispensáveis para um inibidor competitivo ser considerado eficiente: a presença de uma região que forme complexo com íons de Ni(II) do sítio ativo, uma região capaz de realizar ligações de hidrogênio, e uma estrutura flexível (KAPPAUN *et al.*, 2018).

Um aspecto de grande importância que deve ser levado em conta no processo de desenvolvimento de inibidores é a enantiosseletividade. Pelo fato de proteínas serem quirais, a ligação dessa macromolécula com outras moléculas, de forma geral, apresenta elevada seletividade/afinidade (SILVA *et al.*, 2018). Nesse contexto, os enantiômeros podem se ligar de formas diferentes à proteína, e como consequência apresentam diferenças farmacológicas e toxicológicas, incluindo o perfil cinético, o qual está relacionada ao nível de absorção, distribuição, metabolismo e excreção ou dinâmica que, por sua vez, está relacionado com o nível de potência e eficácia ou ainda diferenças no mecanismo de ação (COELHO *et al.*, 2018).

Tendo em vista a importância de se avaliar a influência da enantiosseletividade no processo de desenvolvimento de inibidores e fármacos, proteínas como albuminas, α-

glicoproteínas e também o DNA são abordados na literatura em estudos envolvendo a avaliação da atividade de diversos compostos quirais, mostrando certa enantiosseletividade. A albumina de soro humano (HSA) se mostrou enantioseletiva para o anti-inflamatório (R)-ibuprofeno ao sítio II com uma afinidade 2,3 vezes maior do que para o enantiômero (S) (Fig. 19A) (YAMASAKI *et al.*, 2013) e para o pesticida (S)-diclofope-metílico, que apresentou maior constante de ligação ( $K_b = 7,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) quando comparado ao (R) ( $K_b = 4,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) (Fig. 19B) (ZHANG *et al.*, 2014).

Figura 19. (A) Ibuprofeno e (B) Diclofope-metílico.



Fonte: (A) Adaptado de YAMASAKI et al., 2013; (B) Adaptado de ZHANG et al., 2014.

Martínez - Gomez e col. (2007) avaliaram a afinidade da HSA com diferentes histamínicos: bronfeniramina, clorfeniramina e orfenadrina. Para a bronfeniramina, a HSA apresentou maior afinidade para o enatiômero (S) ( $K_b = 2,60 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) (Fig. 20A) do que para o enantiômero (R) ( $K_b = 9,39 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ ); para a clorfeniramina a afinidade da HSA foi maior para o enantiômero na configuração (S) ( $K_b = 1,69 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) do que para o enantiômero (R) ( $K_b = 9,20 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ ) (Fig. 20B) e por fim, para a orfenadrina, a constante de afinidade também foi maior para o enantiômero (S) ( $K_b = 1,67 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ quando comparado ao (R) ( $K_b = 1,26 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) (Fig. 20C) (MARTÍNEZ - GÓMEZ *et al.*, 2007(a)). Figura 20. (A) Bronfeniramina; (B) Clorferinamina e (C) orfenadrina.



Fonte: Adaptado de MARTÍNEZ - GÓMEZ et al., 2007(a).

Dentro desse aspecto, a HSA e a α-glicoproteína têm sido utilizadas como seletores quirais, juntamente com técnicas analíticas de separação, como eletroforese capilar, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), e cromatografia eletrocinética de afinidade, para enantioseparação de compostos (MARTÍNEZ-GÓMEZ *et al.*, 2007 (b); ZHU *et al.*, 2019). Além da separação enantiomérica, a utilização de proteínas como seletores pode fornecer informações úteis sobre a diferenciação farmacocinética de enantiômeros de fármacos (ZHU *et al.*, 2019).

Pandya e col. (2012) relataram a síntese, caracterização e estudo de interação com o DNA de timo de bezerro (*in vitro*) de novos complexos quirais macrocíclicos de Mn(III) (Fig. 21) (S-1, R-1, S-2 e R-2). Esses complexos quirais mostraram capacidade de se ligar ao DNA, sendo o complexo S-1 o que exibiu a maior constante de ligação ( $K_b = 1,20 \times 10^6$  M<sup>-1</sup>) (PANDYA *et al.*, 2012).

Figura 21. Complexos quirais macrocíclicos de Mn(III).



Fonte: Adaptado de PANDYA et al., 2012.

Ariyaeifar e col. (2018) avaliaram a atividade antiproliferativa de células tumorais de bases de Schiff enantiomericamente puras, frente ao DNA de esperma de peixe (*in vitro*) e a células cancerígenas HeLa, sendo observado que os enantiômeros R apresentaram maior constante de ligação que os enantiômeros S, sendo o derivado 3-[(R)-(3-bromo-5-cloro-2-hidroxifenil) metilenamino] propano-1,2-diol, o que apresentou maior valor para constante de ligação ( $K_b = 7,8 \times 10^4 M^{-1}$ ) (Fig. 22). Ademais, a atividade anticâncer foi significativamente dependente da quiralidade dos compostos, uma vez que os compostos R exibiram atividade maior do que os compostos S, pois, nas mesmas condições experimentais, a mortalidade celular foi de 75% (enantiômeros R), enquanto que para os enantiômeros S, a porcentagem foi de 64% (ARIYAEIFAR *et al.*, 2018).

Figura 22. Derivado 3 - [(R)-(3-bromo-5-cloro-2-hidroxifenil) metilenamino] propano-1,2- diol.



Fonte: Adaptado de ARIYAEIFAR et al., 2018.

Carraro e col. (2020) sintetizaram novos derivados enantiomericamente puros de xantonas e avaliaram a atividade antitumoral frente ao DNA de diferentes linhagens de célula cancerígenas: A375-C5 (melanoma), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e NCI-H460 (câncer de pulmão de células não pequenas), sendo observada uma alta enantiosseletividade para a linhagem MCF-7 com o 6-metil-9-oxo-*N*-(1-feniletil) xanteno-2-carboxamida (Fig. 23), onde o enantiômero (S) exibiu baixo efeito inibitório (IC<sub>50</sub> = 112  $\mu$ M) e seu enantiômero (R) apresentou IC <sub>50</sub> = 24,1  $\mu$ M (CARRARO *et al.*, 2020).

Figura 23. Derivado 6-metil-9-oxo-N-(1-feniletil) xanteno-2-carboxamida.



Fonte: Adaptado de CARRARO et al., 2020.

Ademais, vários trabalhos na literatura demonstram que pode haver diferenças na atividade inibitória de compostos quirais frente a diversas enzimas. Drag; Pawelczak; Kafarsk (2003) avaliaram a atividade inibitória de aminofosfonatos usando misturas equimolares de diastereoisômeros sobre leucina aminopeptidase, que é uma enzima seletiva a peptídeos contendo L - aminoácidos N - terminais. Logo, foi observado que os inibidores contendo carbonato de configuração R (que corresponde à configuração L) foram mais potentes do que aqueles da configuração S. Esse comportamento foi notório

ao comparar os compostos ácido 1-(R)-aminometilpentilfosfônico ( $K_i = 6,5 \mu M$ ) e ácido 1-(S)-aminometilpentilfosfônico ( $K_i = 116 \mu M$ ) (Fig. 24) (DRAG; PAWELCZAK; KAFARSK, 2003).

Figura 24. Compostos ácido 1-(R) e (S)-aminometilpentilfosfônico



Fonte: Adaptado de DRAG; PAWELCZAK; KAFARSK, 2003.

Papatheodorou; Margariti; Vokou (2014) avaliaram a atividade dos enantiômeros R-(-) e S-(+)-carvona (Fig. 25) frente a desidrogenase, urease e fosfomonoesterase alcalina presentes no solo. Sendo observado um efeito significativo apenas frente a ureases, de forma que a atividade foi inibida em aproximadamente 52% na presença do enantiômero S-carvona, enquanto que na presença do R-carvona a atividade foi inibida em aproximadamente 28%. (PAPATHEODOROU; MARGARITI; VOKOU, 2014).

Figura 25. R-(-) e S-(+)-carvona



Fonte: Adaptado de PAPATHEODOROU; MARGARITI; VOKOU, 2014.

Sicak e col. (2017) avaliaram a atividade de novos derivados de pirazol com carbonos quirais, na forma de mistura racêmica, frente à urease de *Jack bean* e tirosinase. Todos os compostos sintetizados demonstraram melhor atividade inibidora da urease com valor de IC<sub>50</sub> de 11,7 a 29,8  $\mu$ M quando comparados a tioureia (IC<sub>50</sub> = 23  $\mu$ M). Por fim, o derivado 2-(4-nitrofenil)-3-(4-(pirrolidin-1-il) fenil)-3,3a-di-hidro-2H-pirazol[3,4-d] tiazol(6H)-tiona (Fig. 26), foi o mais ativo frente à urease (IC<sub>50</sub> = 11,7  $\mu$ M) e à tirosinase (IC<sub>50</sub> = 6,12  $\mu$ M) (SICAK *et al.*, 2017).

**Figura 26**. Derivado 2-(4-nitrofenil)-3-(4-(pirrolidin-1-il) fenil)-3,3a-di-hidro-2H-pirazol[3,4-d] tiazol(6H)-tiona.



Fonte: Adaptado de SICAK et al., 2017.

Além disto, Salar e col. (2017) relataram a atividade inibitória de bases de Schiff de S-hidrazida de proxenoderivado frente a urease de *Jack bean (in vitro*), sendo o derivado (E, Z)-(S)-2-(6-metoxinaftalen-2-il)-*N*'-(2,3,4-trimetoxibenzilideno) propanohidrazina (Fig. 27) o que apresentou melhor atividade (IC<sub>50</sub> = 14  $\mu$ M) (SALAR *et al.*, 2017).

**Figura 27** Derivado (E,Z)-(S)-2-(6-metoxinaftalen-2-il)-N'-(2,3,4-trimetoxibenzilideno) propano-hidrazina.



Fonte: Adaptado de SALAR et al., 2017.

Lage e col. (2018) mostraram que a urease de *Jack bean* apresentou certa seletividade ao interagir com enantiômeros do ácido úrsnico (USN) (Fig. 11), sendo observado que a interação com o (R)-(+)-USN ( $K_b = 35,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) foi mais intensa que com o (S)-(-)-USN ( $K_b = 15,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ). Foi também avaliado a concentração mínima ( $\mu$ M) necessária para inibir o crescimento da *H. pylori*, sendo observado que para diferentes cepas resistentes da bactéria o (R)-(+)-USN foi mais eficiente que o (S)-(-)-USN (LAGE *et al.*, 2018).

Aman e col. (2020) avaliaram a interação de derivados quirais de benzimidazóis com a urease de *Jack bean*. Os compostos apresentaram valores de IC<sub>50</sub> entre 22 e 99  $\mu$ M. Os mais ativos foram: (R ou S)-1-(1H-benzo[d]imidazol-2-il) etanol (Fig. 28) (IC<sub>50</sub> (S) = 22,3  $\mu$ M e IC<sub>50</sub> (R) = 31,4  $\mu$ M), sendo o composto com configuração S mais ativo quando comparado com seu enantiômero R (AMAN *et al.*, 2018).

Figura 28. (R ou S)-1-(1H-benzo[d]imidazol-2-il) etanol



Fonte: Adaptado de AMAN et al., 2018.

Pagoni e col. (2021) avaliaram uma nova classe de inibidores bifuncionais frente à urease de *S. pasteurii*. O inibidor reversível mais ativo foi o ácido 2-carboxi-3-(3,4dihidroxifenil) propilfosfônico (Fig. 29A) (IC<sub>50</sub> = 40,5  $\mu$ M), e o inibidor irreversível mais ativo foi ácido 1-(3,4-dihidroxifenil)-2-metoxicarboniletil (2-carboxietil) fosfínico (Fig. 29B) (IC<sub>50</sub> = 12,8  $\mu$ M). Ambos foram testados experimentalmente como mistura racêmica, mas por estudo de modelagem molecular dos complexos de ambos os enantiômeros observou-se que apresentaram resultados similares (PAGONI *et al.*, 2021). **Figura 29**. (A) Ácido 2-carboxi-3-(3,4-dihidroxifenil) propilfosfônico; (B) Ácido 1-(3,4dihidroxifenil)-2-metoxicarboniletil (2-carboxietil) fosfínico.



Fonte: Adaptado de PAGONI et al., 2021.

Dessa forma, esse trabalho avaliou a atividade de compostos como inibidores da urease, *in vitro*, partindo dos derivados de julolidinas e de aminoácidos que possuem em suas estruturas o núcleo da tioureia (inibidor clássico da urease), avaliando a influência da enantioseletividade para os derivados de aminoácidos.

1.4.1. Derivados de julolidinas: uma proposta de aplicação inovadora

As julolidinas são uma das classes mais funcionais e importantes de *N*heterocíclicos e têm atraído enorme interesse (DE PAIVA *et al.*, 2019). Estruturalmente, estes compostos derivam da anilina com dois substituintes alquil na posição *orto* compartilhando um átomo de nitrogênio e, assim, formando um sistema de anéis conjugados. A estrutura mais simples é a 2,3,6,7-tetra-hidro-1H,5H-benzo [1,2]quinolizina (Fig. 30) (VAREJÃO; VAREJÃO; FERNANDES, 2019). **Figura 30**. Estrutura mais simples das julolidinas.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Essa classe de compostos pode atuar como um sistema contendo fluoróforo comportando-se como rotores moleculares, os quais são constituídos por um grupo doador de elétrons e um grupo aceptor de elétrons ligados entre si por um sistema  $\pi$  conjugado (ABRANCHES *et al.*, 2018) e por isso são capazes de formar um estado de transferência de carga intramolecular torcida (TICT) durante a excitação, cujos valores dos rendimentos quânticos são sensíveis à viscosidade, de forma que quanto maior a viscosidade do meio, menor a taxa de rotação intramolecular e, consequentemente, maior o rendimento quântico (VAREJÃO; VAREJÃO; FERNANDES, 2019).

Esse movimento restrito e a forte capacidade de doação de elétrons da porção da julolidina fundida são bastante eficazes para melhorar as propriedades fotofísicas, pois aumenta o rendimento quântico dos fluoróforos contendo esta porção (XIA *et al.*, 2018). Recentemente os derivados da julolidina têm sido amplamente explorados em várias

aplicações, como: sondas e sensores fluorescentes para detecção de diferentes espécies (metais, proteínas, entre outras), projeção de células solares, antiviral, liberação controlada de aminoácidos e bioimageamento (XIA *et al.*, 2018; ABRANCHES *et al.*, 2018; DE PAIVA *et al.*, 2019)

Choi e col. (2007) sintetizaram novos corantes orgânicos contendo derivados de julolidina e bitiofeno, os quais foram aplicados em células solares sensibilizadas com corante TiO<sub>2</sub> nanocristalino, sendo obtido uma alta eficiência de conversão solar em elétrica (2,95%) para o derivado ácido 2-ciano-3-(5'-(cis,cis-1,7-dietoxi-3-isopropiljulolidinil)-3,3'-dimetil-2,2'-bitiofen-5-il) acrílico (Fig. 31) (CHOI *et al.*, 2007). **Figura 31**. Derivado ácido 2-ciano-3-(5'-(cis,cis-1,7-dietoxi-3-isopropiljulolidinil)-3,3'-dimetil-2,2'-bitiofen-5-il) acrílico.



Fonte: Adaptado de CHOI et al., 2007.

Piloto e col. (2013) avaliaram a liberação fotoinduzida de vários aminoácidos neurotransmissores (glicina, alanina, ácido glutâmico, β-alanina e ácido  $\gamma$ -aminobutírico) empregando como grupo protetor foto removível uma cumarina associada ao núcleo da julolidina (Fig. 32). Os resultados da fotólise revelaram que a liberação da molécula ativa ocorreu em tempos curtos (4 - 20 min, ou no intervalo 5 - 10 min após irradiação a 419 nm) sendo mais efetivo que os conjugados de éster cumarínico, cujo tempo de liberação de *N*-benziloxicarbonil foi entre 242 - 513 min (4 - 9 h) a 419 nm (PILOTO *et al.*, 2013).

Figura 32. Derivados de cumarina associada ao núcleo da julolidina.



Fonte: Adaptado de PILOTO et al., 2013.

Zhang e col. (2018) isolaram alcaloides à base de quinolizidina das raízes de *Sophora flavescens*, Esses derivados de alcaloides foram avaliados quanto à sua atividade antiviral contra o vírus da hepatite B, sendo os compostos Flavesine G (Fig. 33A), Flavesine J (Fig. 33B), e Alopecurina B (Fig. 33C), os mais ativos, com capacidade de inibir o vírus em 37,2%, 44,3%, 46,0%, respectivamente, em concentrações não citotóxicas de 0,2 ou 0,4 mM, o que sugeriu que estes alcaloides tinham potências comparáveis a matrina (34,7% a uma concentração de 0,4 mM) e eram mais ativos do que o controle positivo lamivudina (31,5% a uma concentração de 1,0 mM) (ZHANG *et al.*, 2018).

Figura 33. (A) compostos Flavesine G; (B) Flavesine J e (C) Alopecurina B.



Fonte: Adaptado de ZHANG et al., 2018.

Ji., Dai, Zhou (2019) sintetizaram uma sonda fluorescente de julolidina fluoresceína para a detecção de cisteína (Fig. 34), sendo observado que a sonda foi seletiva a cisteína na presença de glutationa, homocisteína, albumina do soro bovino (BSA), e vários aminoácidos (constantes de velocidade de segunda ordem: 85 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (cisteína); 8,96 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (glutationa), 6,56 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (homocisteína) e 13,18 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (BSA), tendo um limite de detecção de 39,2 nM. Além disso, foi aplicado com sucesso para detectar seletivamente cisteína intracelular com base em sua baixa citotoxicidade e boa permeabilidade celular (JI; DAI; ZHOU, 2018).

Figura 34. Sonda fluorescente de julolidina - fluoresceína para a detecção de cisteína.



Fonte: Adaptado de JI, DAI, ZHOU, 2019.

Minei e col. (2021) propuseram o uso de rotores moleculares fluorescentes como 9-(2,2-dicianovinil) julolidina (Fig. 35A) e 2,3-bis (4-(fenil (4-(1,2,2-trifenilvinil) fenil) amino) fenil) fumaronitrila (Fig. 35B) para o monitoramento em tempo real da formação de poliuretano em uma solução de dimetilacetamida, sendo utilizado como parâmetro a medida da viscosidade do meio, de forma que os rotores tem sua emissão aumentada à medida que a viscosidade do meio aumenta. A sensibilidade da molécula derivada de julolidina (0,3 mM) foi maior quando comparada à molécula derivada de fumaronitrila (0,6 mM) pois foi necessária uma concentração mais baixa para exibir o mesmo efeito (MINEI *et al.*, 2021).

**Figura 35**. (A) 9-(2,2-dicianovinil) julolidina; (B) 2,3-bis (4-(fenil (4-(1,2,2-trifenilvinil)fenil) amino) fenil) fumaronitrila.



Fonte: Adaptado de MINEI et al., 2021.

Gil, Suh, Kim (2021) sintetizaram um quimiossensor colorimétrico reversível baseado na porção de julolidina ((E)-9-((2-(6-cloropiridazin-3-il) hidrazono) metil)-2,3,6,7 tetrahidro-1H,5H-pirido [3,2,1-il] quinolin-8-ol) (Fig. 36) para a detecção de íons fluoreto *in vitro*. O quimiosensor exibiu uma detecção colorimétrica seletiva para os íons fluoreto, com uma variação de cor de incolor à amarelo, e limite de detecção de 12  $\mu$ M (GIL; SUH; KIM, 2021)

**Figura 36**. (E)-9-((2-(6-cloropiridazin-3-il) hidrazono) metil)-2,3,6,7 tetrahidro-1H,5H-pirido [3,2,1-il] quinolin-8-ol).



Fonte: Adaptado de GIL, SUH, KIM, 2021.

Devido à sua promissora aplicação em uma variedade de áreas científicas e tecnológicas, as julolidinas têm ganhado destaque. Porém, ainda não há nenhum relato na literatura sobre a capacidade inibitória da atividade da urease dessa classe de compostos. A fim de expandir o potencial de aplicação desta classe de compostos, este trabalho propõe avaliar a capacidade inibitória de derivados de julolidina (Fig. 37) frente a urease, a partir de ensaios enzimáticos, estudos cinéticos e estudos de interação molecular, empregando espectroscopia de fluorescência molecular.

Figura 37. Esquema de estrutura dos derivados de julolidinas. (A) RS11-J1; (B) RS11-J2; (C) RS12-J1; (D) RS12-J2.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Abranches e col. (2018) relataram a síntese desses derivados de julolidina, a qual foi composta de uma única etapa (reação multicomponente) em um reator de micro-ondas, empregando como catalisador homogêneo o ácido p-sulfônico calix[4]areno. As julolidinas foram obtidas com alta pureza e o rendimento total para os derivados utilizados nesse trabalho foi de 71% para os derivados do **RS11** e 59% para os derivados do **RS12** (ABRANCHES *et al.*, 2018). De Paiva e col. (2019) relataram uma outra proposta de síntese para os mesmos derivados, a qual também foi composta de uma única etapa em

condições experimentais similares, contudo, utilizando como catalisador heterogêneo o ácido *p*-sulfônico calix[4]areno suportado em sílica. Nessa síntese empregou-se concentrações menores dos reagentes e catalisador, além disto, o tempo de reação foi reduzido para 10 min, sendo possível obter os derivados de julolidinas com alta pureza e com rendimento total de 66% para os derivados de **RS11**, e de 62% para os derivados de **RS12**. Dessa forma, é possível inferir que a estratégia proposta por de Paiva e col. (2019) seria a mais vantajosa, uma vez que os rendimentos não diferiram de forma significativa (De PAIVA *et al.*, 2019).

De forma geral, as sínteses dos derivados utilizados nesse trabalho ocorrem de maneira eficiente, com tempos de reação curtos, sem a adição de metal, são de baixo custo e usam um catalisador barato, facilmente disponível e não tóxico. Essas vantagens tornam a síntese promissora e viável do ponto de vista ecológico e econômico.

### 1.4.2. Derivados de aminoácidos associados a tioureia: um potencial inibidor de urease

Os aminoácidos são biomoléculas importantes e os constituintes básicos das proteínas (aminoácidos proteinogênicos) (IDREE *et al.*, 2020). Nas proteínas, estes compostos apresentam pelo menos um grupo amino, um grupo carboxila e uma cadeia lateral com diferentes funções em suas estruturas e são unidos por ligações peptídicas (amida), na qual o grupo carboxila de um aminoácido se liga ao grupo amino de outro, liberando uma molécula de água (IDREE *et al.*, 2020).

Os 19 aminoácidos proteinogênicos mais comuns exibem quiralidade, pois o carbono central em suas moléculas está ligado a quatro grupos diferentes. A glicina é o único aminoácido aquiral, pois tem dois hidrogênios ligados ao carbono central (IDREE *et al.*, 2020). A quiralidade dos aminoácidos é de importância significativa quando se trata de projetar peptídeos sintéticos biologicamente ativos (VALE *et al.*, 2018) e também desempenha um papel significativo na determinação da função dos aminoácidos (PATZOLD; BRUCKNER, 2005). Por exemplo, os L-aminoácidos são proteinogênicos e formam proteínas, bem como participam da formação da parede celular microbiana, enquanto os D-aminoácidos não são proteinogênicos e regulam diferentes funções, como a formação da parede celular e a dispersão do biofilme microbiano (CAVA *et al.*, 2010).

Os derivados de aminoácidos têm sido amplamente usados no desenvolvimento de pró-fármacos, e sua utilização resultou em melhorias em várias propriedades, como aumento da biodisponibilidade e diminuição da toxicidade do fármaco original (VALE *et* 

*al.*, 2018). O termo pró-fármaco foi introduzido na década de 1950 para descrever uma ligação covalente entre um fármaco e uma porção química. A baixa toxicidade de derivados de aminoácidos associados a outras moléculas é explorada na literatura.

Guo e col. (2020) relataram a síntese de derivados de aminoácidos/dipeptídeo ligustrazina - betulina como agentes antitumorais e suas atividades citotóxicas *in vitro* foram avaliadas contra quatro linhas de células cancerosas (Hela, HepG2, BGC-823 e HT-29) e células normais (MDCK), sendo observado que a maioria dos derivados demonstrou uma atividade antitumoral melhor do que o fármaco padrão cisplatina, de forma que o mais ativo foi o derivado  $3\beta$ -(L-Glicil)-Lup-20 (29)-eno-28-diol-3,5,6-trimetilpirazin-2-carboxilato (Fig. 38) com um valor de IC<sub>50</sub> (4,86 ± 1,16 µM) 3 vezes maior do que contra as células normais (IC<sub>50</sub> = 16,11 ± 2,29 µM). Além disso, esse derivado mostrou melhor efeito citotóxico do que o fármaco (cisplatina) (DDP) em células tumorais. Além disso, o teste de avaliação da toxicidade em larvas do peixe-zebra indicou alta biossegurança desses derivados, uma vez que não foi observado nenhuma mudança morfológica significativa, enquanto que quando tratadas com a cisplatina, foram observados graus de deformidade, como curvatura da coluna vertebral, edema da cavidade pericárdica, curvatura da cauda (GUO *et al.*, 2020).

**Figura 38**. Derivado 3β-(L-Glicil)-Lup-20 (29)-eno-28-diol-3,5,6-trimetilpirazin-2-carboxilato.



Fonte: Adaptado de GIL, SUH, KIM, 2021.

Kang e col. (2020) avaliaram a toxicidade de três aminoácidos: L-treonina (Fig. 39A), L-triptofano (Fig. 39B) e L-valina (Fig. 39C) comumente adicionados em alimentos, analisando a genotoxicidade *in vitro* e a toxicidade animal aguda *in vivo*. De forma geral, os resultados sugerem que os três aditivos de aminoácidos são seguros, sem

efeitos adversos, e podem ser aplicados como ingredientes ou outros usos biológicos (KANG et al., 2020).

Figura 39. (A) L-treonina; (B) L-triptofano; (C) L-valina.



Fonte: Adaptado de KANG et al., 2020.

Além disso, outros trabalhos já reportam a aplicação da associação de derivados de aminoácidos com diferentes classes de moléculas, como inibidores de enzimas, incluindo a urease. Kobashi e col. (1975) avaliaram o efeito inibitório de derivados do ácido hidroxâmico associados a aminoácidos sobre a atividade da urease de *Jack bean (in vitro)*, sendo observado que o ácido metionina - hidroxâmico foi o inibidor mais potente (IC<sub>50</sub> =  $3,9 \,\mu$ M).

Tegoni e col. (2004) sintetizam quatro novos derivados de hidroxamatos de  $\alpha$ aminoácidos, os quais foram testados com relação a interação com Cu(II), Zn(II), Ni(II) em solução aquosa, uma vez que o sítio catalítico das metaloenzimas contém pelo menos um íon metálico. Dessa forma, foram determinadas as constantes de estabilidade dos complexos e os modos de coordenação correspondentes. A constante de estabilidade para os derivados (S)-*N*-(3-hidroxicarbamoil-propionil)-fenilalanina (Fig. 40A) e (S)-*N*-(3hidroxicarbamoil-propionil)-prolina (Fig. 40B) foi maior na presença de íons Cu(II):  $41 \times 10^{21}$  e  $1,58 \times 10^{22}$ , respectivamente, sugerindo a formação preferencial do complexo [Cu<sub>5</sub>L<sub>4</sub>H<sub>-4</sub>]<sup>2-</sup>. Para os derivados (S)-*N*-(3-hidroxicarbamoil-propionil)-fenilalanina ácido hidroxâmico (Fig. 40C) e (S)-*N*-(3-hidroxicarbamoil-propionil)-prolina ácido hidroxâmico (Fig. 40D), as constantes de estabilidade também foram maiores na presença de íon Cu(II):  $3,98 \times 10^{32}$  e  $4,57 \times 10^{32}$ , respectivamente, indicando a formação preferencial do complexo [CuL<sub>2</sub>H<sub>2</sub>]. De forma geral, foi observado comportamento semelhante ao dos ácidos mono-hidroxâmicos simples (TEGONI *et al.*, 2004).

**Figura 40.** (A) (S)-*N*-(3-hidroxicarbamoil-propionil)-fenilalanina; (B) (S)-N-(3-hidroxicarbamoil-propionil)-prolina; (C) (S)-*N*-(3-hidroxicarbamoil-propionil)-fenilalanina ácido hidroxâmico; (D) (S)-*N*-(3-hidroxicarbamoil-propionil)-prolina ácido hidroxâmico



Fonte: Adaptado de TEGONI et al., 2004.

Rafiq e col. (2021) sintetizaram bases de Schiff associadas a aminoácidos e avaliaram o potencial inibitório da anidrase II carbônica,  $\alpha$  - glucosidase e urease de *Jack bean (in vitro*). Os resultados indicaram que os compostos terbutil (S,E)-(3-(2-(2-hidroxibenzilideno) hidrazina)-3-oxo-1-fenilpropil) carbamato (Fig.41A) (IC<sub>50</sub> = 11,8  $\mu$ M), terbutil(S,E)-(1-(2-(4-clorobenzilideno) hidrazineil)-4-metil-1-oxopentan-2-il)carbamato (Fig.41B) (IC<sub>50</sub> = 83,3  $\mu$ M) e terbutil (S,E)-(1-(2-(2,4-di-hidroxibenzilideno) hidrazina)-4-metil-1- oxopentan-2-il) carbamato (Fig.41C) (IC<sub>50</sub> = 88,2  $\mu$ M) são os derivados mais ativos contra a anidrase carbônica II,  $\alpha$ -glucosidase e urease, respectivamente (RAFIQ *et al.*, 2021)

**Figura 41**. (A) Terbutil (S,E)-(3-(2-(2-hidroxibenzilideno) hidrazina)-3-oxo-1-fenilpropil) carbamato; (B) Terbutil<math>(S,E)-(1-(2-(4-clorobenzilideno) hidrazineil)-4-metil-1-oxopentan-2-il) carbamato; (C) Terbutil <math>(S,E)-(1-(2-(2,4-di-hidroxibenzilideno) hidrazina)-4-metil-1-oxopentan-2-il) carbamato.



Fonte: Adaptado de RAFIQ et al., 2021.

A tioureia, por sua vez, é um bloco estrutural importante na síntese de compostos heterocíclicos, e tem chamado atenção devido ao seu amplo espectro de atividades, como atividade antitripanossoma, atividade inibitória frente a neuraminidase do vírus influenza, atividade antifúngica e atividades anticâncer (BANO *et al.*, 2018; SAEED, *et al.*, 2013). Além disso, já é bem conhecido que a tioureia é um inibidor clássico da urease e, portanto, seus derivados são relatados como potenciais inibidores desta enzima (LI *et al.*, 2018). Mais recentemente, muitas investigações examinando inibidores de urease à base de tioureia desenvolveram derivados de tioureia que apresentam maior potência inibitória do que os equivalentes derivados da ureia (BANO *et al.*, 2018).

Saeed e col. (2013) sintetizaram uma série de novas moléculas híbridas contendo modelos de sulfanilamida e tioureia. Esses compostos foram avaliados quanto às atividades inibitória da urease de *Jack bean in vitro*. De forma geral, os derivados apresentaram concentração inibitória entre 0,20 - 7,50  $\mu$ M, sendo o composto 1-aril-3-(4aminossulfonilfenil) tioureia com R= 4-ClC<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (Fig. 42) o mais ativo (IC<sub>50</sub> = 0,20  $\mu$ M,) o qual foi 100 vezes mais potente do que a tioureia (SAEED *et al.*, 2013).

**Figura 42**. 1-aril-3-(4-aminossulfonilfenil) tioureia com R= 4-ClC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>.



Fonte: Adaptado de SAEED et al., 2013.

Saeed e col. (2017) sintetizaram derivados de aciltioureias e avaliaram seus efeitos inibitórios sobre a urease de *Jack bean in vitro*. Os resultados indicaram que todos os compostos sintetizados inibiram significativamente a urease, sendo o derivado 1-(4-clorofenil)-3-palmitoiltioureia (Fig. 43) o mais ativo (IC<sub>50</sub> = 0,017  $\mu$ M) em comparação com o valor de IC<sub>50</sub> = 4,72  $\mu$ M da tioureia (SAEED *et al.*, 2017.

Figura 43. 1-(4-clorofenil)-3-palmitoiltioureia.



Fonte: Adaptado de SAEED et al., 2017.

Seraj e com (2021) sintetizaram derivados de ibuprofeno hidrazida com núcleo da tioureia e avaliaram a inibição da atividade da urease de *Jack bean (in vitro*), obtendo-se valores de IC<sub>50</sub> de 2,96 a 178  $\mu$ M, sendo mais eficientes que a tioureia (IC<sub>50</sub> = 21,3  $\mu$ M), de forma que o derivado *N*-(2- cloro-4-nitrofenil)-2-(2-(4-isobutilfenil) propanoil) hidrazina-1-carbotioamida (Fig. 44) foi o mais ativo( IC<sub>50</sub> = 2,96 ± 1,11  $\mu$ M) (SERAJ *et al.*, 2021).

**Figura 44**. Derivado *N*-(2-cloro-4-nitrofenil)-2-(2-(4-isobutilfenil) propanoil) hidrazina-1-carbotioamida.



Fonte: Adaptado de SERAJ et al., 2021.

Assim, a união desses dois blocos estruturais (aminoácidos e tioureia) irá produzir um inibidor de urease potente (propriedade da tioureia) e ao mesmo tempo com baixa toxicidade (propriedade dos aminoácidos). Dessa forma, esse trabalho também visou a avaliação da capacidade inibitória de derivados de aminoácidos que possuem em suas estruturas o núcleo da tioureia (Fig. 45).

Figura 45. Esquema de estrutura dos derivados de aminoácidos com núcleo da tioureia. (A) 110-L; (B) 110-D; (C) 110 ac-L; (D) 110 ac-D; (E) 116; (F) 106 ac-L; (G) 106 ac-D.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Do ponto reacional, a síntese baseou-se na reação de condensação direta de  $\alpha$ aminoácidos (treonina e valina) com a tioureia. Para isso, uma mistura de L-aminoácido (60 mmol) e tioureia (20 mmol) foi colocada em um balão de fundo redondo e aquecida a 170-210°C por 60 min sob agitação magnética. A mistura foi deixada arrefecer à temperatura ambiente e foi adicionada água (20 mL). A mistura resultante foi aquecida para dissolver todos os sólidos presentes e, em seguida, armazenada a 5°C por 24 h. Os cristais foram removidos por filtração a vácuo e o produto bruto foi purificado por recristalização em água. A reação foi composta por uma etapa e os produtos foram isolados através de recristalização em água com rendimento total de 62%, como reportado por de Carvalho e col. (2020), sendo portando uma síntese promissora e viável do ponto de vista ecológico e econômico.

Para essa classe de compostos foi avaliado a influência da enantiosseletividade, empregando espectroscopia de fluorescência molecular. Vale ressaltar que no estudo de interação molecular empregando espectroscopia de fluorescência molecular, a enantiosseletividade de uma proteína pode ser inferida pelo valor da constante de ligação, sendo esse o parâmetro utilizado neste trabalho (LAGE *et al.*, 2018).

### 1.5. Técnicas para avaliação do processo de interação proteína-ligante

Para avaliar a interação proteína/enzima - ligante, *in vitro*, são utilizas diversas estratégias empregando técnicas espectroscópicas, como absorção de UV-Vis, fluorescência, dicroísmo circular, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), ressonância plasmônica de superfície e ressonância magnética nuclear, bem como métodos não espectroscópicos, como eletroforese, ultrafiltração, cromatografia de afinidade, calorimetria de titulação isotérmica (ITC), modelagem molecular e espectrometria de massas (DONG, MA, LIU, 2013; CHEN *et al.*, 2019). Desta forma, as principais técnicas empregadas nos estudos de interação macromolécula - ligante são brevemente descritas na Tabela. 1, considerando os principais aspectos quanto às informações que podem ser obtidas, vantagens e desvantagens.

Técnica	Informações obtidas	Vantagens	Desvantagens	Referências
Absorção molecular no UV-vis	<ul> <li>-Formação do complexo proteína- ligante;</li> <li>-Mudanças na estrutura da macromolécula;</li> <li>-Polaridade do microambiente dos resíduos dos aminoácidos Trp e Tir;</li> <li>-Mecanismo de <i>quenching</i> (de forma qualitativa);</li> <li>-Constante de ligação.</li> </ul>	-Baixo custo -Simplicidade -Permite monitorar proteína ou ligante separadamente; -Não destrutiva.	<ul> <li>-Precisa de técnicas complementares;</li> <li>-Baixa seletividade;</li> <li>-Menos sensível que a fluorescência molecular.</li> <li>-Informações imprecisas em caso de sobreposição espectral;</li> <li>-Deve seguir a Lei de Beer.</li> </ul>	Ranjbar <i>et al.</i> , 2013; Rauf <i>et al.</i> , 2016; Tian et al., 2015; Wang & Ni, 2014.
Fluorescência molecular	-Mecanismodequenching(quantitativa);Mudançasnaestruturadamacromolécula;Númerodesítiosdeligação(estequiometria);-Constantes de ligação (Kb);-Parâmetros termodinâmicos ( $\Delta$ H, $\Delta$ S e $\Delta$ G);-Tipo de forças intermoleculares;-Distâncias intermoleculares;-Sítio preferencial de ligação.	<ul> <li>-Avaliação qualitativa e quantitativa;</li> <li>-Alta sensibilidade;</li> <li>-Fácil operação;</li> <li>-Mais sensível que a absorção molecular no UV-vis;</li> <li>-Não destrutiva.</li> </ul>	-Efeito do filtro interno; -Variedade de equações para analisar os dados de fluorescência.	Siddiqui, alothman, rahman, 2017; Ghasemi, 2016; Madrakian <i>et al.</i> , 2014; Suryawanshi et al., 2016; Azreena; Shevin; Feroz, 2019.
Modelagem molecular	<ul> <li>-Conformação mais estável do ligante ao se ligar a proteína;</li> <li>-Previsão da afinidade de ligação;</li> <li>-Estrutura espacial do complexo;</li> <li>-Energia de ligação</li> </ul>	-Avaliação qualitativa e quantitativa; -Relativa rapidez e economia quando comparado com outras técnicas computacionais; -	<ul> <li>-Considera a estrutura rígida da macromolécula;</li> <li>-Não considera o efeito do solvente;</li> <li>-Não considera o grau de protonação das moléculas;</li> </ul>	Salmaso & Moro, 2018; Fu; Zhao; Chen, 2018; Prieto-Martínez; Arciniega;

 Tabela 1. Principais técnicas empregadas em estudos biofísicos e suas respectivas informações obtidas, vantagens e desvantagens.

				Medina-Franco, 2018.
Dicroísmo Circular	-Estrutura secundária das proteínas; -Mudanças na estrutura da macromolécula, em diferentes condições de temperatura, força iônica e presença de ligantes; -Modo de ligação.	-Alta sensibilidade; -Uso de pequenas quantidades da macromolécula e do ligante; -Obtenção dos resultados em menor tempo quando comparado a difração de raio X e RMN;	<ul> <li>-Avaliação apenas qualitativa;</li> <li>-As soluções devem ser transparentes aos raios ultravioletas (limita o uso de certos tampões, sais e solventes);</li> <li>-Não pode ser usada de forma fácil / confiável para determinar e interpretar a estrutura terciária.</li> </ul>	Murakami; Ruller, 2016; Chaves et al., 2016; Kelly et al., 2005; Chowdhry; Harding, 2001.
RMN	<ul> <li>Mapeamento do epítopo da macromolécula ou ligante;</li> <li>-Constante de ligação;</li> <li>-Parâmetros termodinâmico.</li> </ul>	<ul> <li>-Avaliação qualitativa e quantitativa;</li> <li>-Informações obtidas em diferentes condições de temperatuta, solventes, valores de pH e força iônica.</li> <li>-Avalia o ligante ou a macromolécula</li> <li>-Alta capacidade de detectar o ligante principal em uma mistura;</li> <li>-Não destrutivo.</li> </ul>	<ul> <li>-Requer grande quantidade da amostra;</li> <li>-Inadequado para aquelas proteínas com com peso molecular relativo &gt; 30 kDa;</li> <li>-Alto custo;</li> <li>-Ligantes deve ser solúvel em água;</li> <li>-Requer altas concentrações de solvente deuterado.</li> </ul>	Cabrita <i>et al.</i> , 2011; Cala; Guilliere; Krimm, 2014; Goldflam, <i>et al.</i> , 2011; Skinner; Laurence, 2001.
Espectrometria de massa	<ul> <li>-Razões estequiométricas entre ligante e macromoléculas;</li> <li>-Constante de ligação;</li> <li>-Sítio de ligação;</li> <li>-Cinética da reação</li> </ul>	<ul> <li>-Alta sensibilidade;</li> <li>-Avaliação qualitativa e quantitativa;</li> <li>-Rapidez e especificidade;</li> <li>-Não se limita pela solubilidade e peso molecular relativo;</li> <li>-Facilmente combinado com várias técnicas cromatográficas.</li> </ul>	-Técnica destrutiva; -Alto custo.	Chen et al., 2019; Borkar <i>et al.</i> ,2015; Ishii; Noda; Uchiyama, 2016.; Zinn et al., 2012.

Titulações calorimétrica isotérmica	<ul> <li>-Número de sítios de ligação;</li> <li>-Constante de equilíbrio;</li> <li>-Parâmetros termodinâmicos;</li> <li>-Tipo de forças intermoleculares;</li> </ul>	<ul> <li>-Determinação simultânea dos parâmetros de ligação e termodinâmicos em um único experimento;</li> <li>-Avaliação qualitativa e quantitativa;</li> <li>-Tempo de resposta rápido;</li> <li>-Fácil operação;</li> <li>-Não destrutiva</li> </ul>	<ul> <li>-Proteína e ligante precisam ser dialisados, pois impurezas podem interferir;</li> <li>-Alto consumo de proteínas e ligantes</li> </ul>	CHEN et al.,2017; SABOURY, 2006; Baranauskienė et al., 2009; Olofsson; Loh, 2009.
---	--	---	--	--

Fonte: RANJBAR *et al.*, 2013; SIDDIQUI; ALOTHMAN; RAHMAN, 2017; SALMASO & MORO, 2018; CHAVES *et al.*, 2016; CABRITA *et al.*, 2011; SABOURY, 2006.

#### 1.5.1. Espectroscopia de fluorescência molecular

Dentre as técnicas citadas anteriormente, a espectroscopia de fluorescência molecular tem se destacado, devido à sua alta sensibilidade, rapidez e facilidade de implementação. Além de permitir medições não destrutivas de substâncias em baixa concentração sob várias condições experimentais (TRNKOVÁ *et al.*, 2011). Por isso, essa técnica será melhor esplanada neste tópico. A fluorescência molecular (relaxação radiativa) é um processo de emissão, no qual a molécula inicialmente é excitada pela absorção de radiação eletromagnética, no comprimento de onda de absorção (comprimento de onda de excitação,  $\lambda_{ex}$ ) (SIDDIQUI, ALOTHMAN, RAHMAN, 2017). Em seguida, a espécie excitada relaxa, voltando ao estado fundamental, emitindo seu excesso de energia como fótons. Essa emissão é medida em um comprimento de onda mais alto denominado comprimento de onda de fluorescência (SIDDIQUI, ALOTHMAN, RAHMAN, 2017).

Além da fluorescência, há outro mecanismo de relaxação que é chamado de relaxação não-radiativa, o qual é classificado como relaxação vibracional e conversão interna (SKOOG, et al., 2006). A relaxação vibracional ocorre entre os níveis vibracionais de um mesmo estado excitado, e é decorrente da colisão entre a espécie excitada e o solvente. A conversão interna, por sua vez, ocorre quando a relaxação não-radiativa se dá entre o nível vibracional menos energético de um estado excitado e o nível vibracional menos energético de um estado excitado e o nível vibracional mais energético de outro estado excitado. Os mecanismos exatos pelos quais esses dois processos de relaxação ocorrem ainda não são totalmente compreendidos, porém, o resultado líquido é um pequeno aumento na temperatura do meio (SKOOG, et al., 2006).

Esses dois métodos de relaxação não-radiativa competem com a fluorescência, de forma que para que o processo de fluorescência ocorra, a molécula precisa ter uma estrutura que diminua a velocidade dos processos de relaxação não-radiativa, e aumente a velocidade do processo de fluorescência (LAKOWICZ, 2006). Assim, compostos que contêm estruturas rígidas e com ligações duplas altamente conjugadas tendem a emitir fluorescência (TIAN et al., 2015).

Nesse contexto, a partir da técnica de espectroscopia de fluorescência molecular, é possível avaliar vários aspectos do processo de interação proteína-ligante, monitorando o sinal (intensidade) de fluorescência intrínseco da proteína, na presença e ausência do ligante, como: mecanismo de *quenching* (dinâmico, estático ou ambos), número de sítios de ligação (estequiometria), constantes de ligação (K<sub>b</sub>), parâmetros termodinâmicos ( $\Delta$ H,

 $\Delta$ S e  $\Delta$ G), tipo de forças intermoleculares envolvidas no processo de interação, distâncias intermoleculares, entre outros (BRAGA et al., 2019; SILVA et al., 2018).

Dentro dos aspectos avaliados, o processo de supressão de fluorescência (*quenching*) tem sido amplamente estudado tanto como fenômeno fundamental, quanto como fonte de informação sobre sistemas bioquímicos. Esse processo é definido como a redução da intensidade de fluorescência que ocorre devido a rearranjos moleculares, transferência de energia ou elétrons, formação de complexo no estado fundamental e extinção por colisões. A molécula ou espécie que entra em contato com o fluoróforo (F) (capaz de emitir fluorescência) no estado excitado e o desativa, é denominada *quencher* (Q) (WANG *et al.*, 2015; SURYAWANSHI *et al.*, 2016).

A partir da avaliação do processo de *quenching* de fluorescência é possível compreender o mecanismo de interação que ocorre entre o fluoróforo, que no caso das proteínas, seriam os resíduos dos aminoácidos aromáticos Trp, Tir e Phe e o *quencher* (ligante). Os mecanismos de *quenching* são classificados como *quenching* dinâmico (colisional) ou estático, podendo, em alguns casos, ocorrer os dois mecanismos simultaneamente. O *quenching* dinâmico ocorre quando o fluoróforo no estado-excitado (F<sup>\*</sup>) é desativado ao entrar em contato com outra molécula (Q). O contato entre ambos é momentâneo, ocorrendo apenas durante a existência do estado excitado (tempo da ordem de ns). O *quenching* estático refere-se à formação de um complexo não-fluorescente (F - Q). Este mecanismo ocorre no estado fundamental e não depende de processos de difusão ou colisões moleculares (MOLINA-BOLÍVAR *et al*, 2014; WANI *et al.*, 2017).

Para avaliar qual o mecanismo preferencial de *quenching*, deve-se realizar o experimento em diferentes temperaturas, e a seguir, calcular os valores da constante de Stern-Volmer (K<sub>SV</sub>). Quando o valor de K<sub>SV</sub> aumenta em função da elevação da temperatura se associa ao processo de *quenching* dinâmico, uma vez que temperaturas mais elevadas levam a um maior coeficiente de difusão, e por consequência aumenta-se o número de choques entre o fluoróforo e o *quencher*. Quando os valores da constante diminuem com o aumento da temperatura é indicativo de *quenching* estático, visto que temperaturas elevadas afetam a estabilidade do complexo fluoróforo-*quencher* no estado fundamental (WANI et al., 2017; SURYAWANSHI et al., 2016). Porém, é preferível avaliar o mecanismo preferencial calculando-se o valor de K<sub>q</sub> em diferentes temperaturas, uma vez que o mecanismo preferencial de *quenching* é inferido comparando o valor de K<sub>q</sub> calculado com um valor de referência, de forma que quando o valor da constante for

maior que o referencial  $2,0 \times 10^{10}$  L mol<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> é indicativo de *quenching* estático, e se for menor é indicativo de *quenching* dinâmico (SHU *et al.*, 2015).

# 2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE DO TRABALHO

A urease é uma hidrolase que converte ureia em amônia e ácido carbâmico. Estratégias de inibição deste processo enzimático podem ser amplamente utilizadas na agricultura e medicina, trazendo diversos benefícios para a sociedade. Nesse contexto, a avaliação do processo de interação entre compostos com potencial inibitório e urease, empregando estudos biofísicos, é um modelo que consegue mimetizar os sistemas biológicos de interesse, e assim, fornecer informações relevantes, para a compreensão dos processos que ocorrem *in vivo* e desta forma, quando possível, justificar a eficácia, seletividade e estabilidade de diferentes ligantes.

Assim, considerando as potencialidades deste trabalho foram estabelecidas as seguintes hipóteses: (I) os derivados de julolidinas e os derivados de aminoácidos são inibidores eficientes da urease em estudos *in vitro* e ativos em amostras de solo? (II) Há influência da enantiosseletividade e da matéria orgânica na atividade dos derivados de aminoácidos?

# **3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS**

## 3.1 Geral

Avaliar por meio de estudos biofísicos *in vitro* a capacidade dos derivados de julolidinas e aminoácidos de inibir a atividade enzimática da urease, empregando técnicas espectroscópicas simulando condições fisiológicas, a fim de expandir o potencial de aplicação destas classes de compostos.

## 3.2 Específicos

i) Avaliar a inibição da atividade ureolítica empregando estratégias de estudo cinético e cálculo da concentração inibitória (IC<sub>50</sub>), bem como avaliar a influência da substância húmica no valor de IC<sub>50</sub> dos derivados de aminoácidos;

ii) Determinar a estequiometria dos complexos urease-ligante, os parâmetros de ligação (K<sub>SV</sub>, K<sub>q</sub> e K<sub>b</sub>) e termodinâmicos ( $\Delta$ G,  $\Delta$ H e  $\Delta$ S), assim como avaliar o mecanismo preferencial de *quenching;* 

 iii) Avaliar a influência da força iônica no processo de interação entre urease e derivados de aminoácidos;

iv) Avaliar as mudanças na conformação da enzima por fluorescência tridimensional fluorescência sincronizada e UV-vis;

 v) Estabelecer o sítio de ligação preferencial para os sistemas avaliados utilizando competidores clássicos;

vi) Calcular as distâncias intermoleculares entre os ligantes avaliados e a urease além do índice de hidrofobicidade;

vii) Avaliar a atividade inibitória dos derivados de julolidinas e dos derivados de aminoácidos mais ativos em diferentes amostras de solo.
### 4. EXPERIMENTAL

4.1. Reagentes e preparo das soluções para os estudos de interação

A urease Canavalia ensiformis (Jack bean, tipo III), hidroxiureia (CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), N-(n-butil) tiofosfóricotriamida (NBPT), omeprazol  $(C_{17}H_{19}N_{3}O_{3}S)$ e ácido acetohidroxâmico ( $C_2H_5NO_2$ ) foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). Fosfato de potássio tribásico (K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), tioureia (CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>S) e ureia (CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O) foram obtidos da Vetec (Brasil). Os derivados de julolidinas (RS11 e RS12) foram sintetizados, caracterizados e fornecidos pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Sérgio Fernandes da Universidade Federal de Viscosa (UFV) conforme trabalhos prévios publicados (ABRANCHEM et al., 2018; DE PAIVA et al., 2019). Os derivados de aminoácidos (110-L, 110-D, 110 ac-L, 110 ac-D, 116, 106 ac-L, 106ac-D) foram sintetizados, caracterizados e fornecidos pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Ângelo de Fátima da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Outros reagentes empregados nos ensaios foram de grau analítico com pureza acima de 98%. Em todos os experimentos foi utilizada água ultrapura (condutividade  $< 0,1 \ \mu S \ cm^{-1}$ ) obtida pelo sistema Master System 2000 (Brasil, Gehaka).

A solução estoque de urease *C. ensiformis* (*Jack bean*, tipo III) a 6  $\mu$ M foi preparada em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4 ± 0,1), enquanto os derivados de julolidina foram dissolvidos diretamente em etanol, produzindo soluções a 5,7 mM (**RS11**) e 6,0 mM (**RS12**). Os derivados de aminoácidos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO), seguidos de diluições em tampão fosfato a 20 mM. A concentração máxima dos solventes orgânicos (etanol e DMSO) nos sistemas avaliados com a urease não foi superior a 3% (v/v).

## 4.2. Equipamentos utilizados

Para as medidas espectrofluorimétricas empregou-se espectrofluorímetro Shimadzu RF (modelo 5301PC, Japão) com cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico, equipado com lâmpada de xenônio de 150 W. As medidas espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro de varredura com feixe duplo Micronal (modelo AJX- 54 6100PC, Brasil) equipado com cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico. Para as medidas do IC<sub>50</sub> e para a avaliação da atividade antiureolítica, os sinais de absorvâncias foram obtidas em um leitor de microplacas (96 poços) Tecan Infinite 200 PRO RCHISTO (Mannedorf, Suíça). As medidas de pH foram realizadas com eletrodo combinado de vidro associado ao potenciômetro Gehaka (PG 1800, Brasil). As massas dos reagentes foram medidas em balança analítica eletrônica Gehaka (AG 200, Brasil) com precisão de 0,1 mg.

### 4.3. Ensaios enzimáticos e cinéticos para os derivados de julolidinas

Os ensaios enzimáticos foram realizados pelo grupo de pesquisa da professora Luzia Modolo do Departamento de Botânica da UFMG, da Universade Federal de Minas Gerais (UFMG). A urease purificada de *Canavalia ensiformis (Jack bean*) foi utilizada para avaliar a capacidade dos derivados de julolidinas. Os ensaios foram realizados em tampão fosfato 20 mM com 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (pH 7,0), sendo adicionado uma concentração fixa de ureia (10 mM) e urease (12,5 mU), na ausência e na presença de cada composto avaliado 1,6 mM. Os sistemas foram incubados por 10 min a 25°C e em seguida adicionou-se fenol a 1% (m / v) contendo 5 mg L<sup>-1</sup> de nitroprussiato de sódio (SNP), NaOH a 0,5% (m/v) contendo NaOCl a 0,1% (v/v). Após 5 mim de incubação das amostras a 50°C, a absorvância foi medida em 630 nm para determinar a quantidade de amônia formada, sendo esse parâmetro usado para determinar a capacidade dos compostos de inibir a urease. Três experimentos independentes foram realizados, cada um com quatro repetições (LAGE *et al.*, 2018).

Para os estudos cinéticos, foram selecionadas concentrações dos derivados de julolidinas, capazes de inibir a atividade na urease entre 30 e 40%, e em seguida foram incubados no meio contendo 20 mM de tampão fosfato (pH 7), 1 mM de EDTA, ureia (no intervalo de 1 - 32 mM) e concentração fixa de urease (12,5 mU). As reações foram interrompidas, o NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foi quantificado a partir das medidas de absorvância de cada reação a 630 nm. Os parâmetros da urease: velocidade inicial, constante de Michaelis Menten (K<sub>m</sub>) e velocidade máxima (V<sub>m</sub>) foram obtidos usando o Hyper 32 Software (Easterby, 2003). A hipérbole de Michaelis Menten e Lineweaver-Burk foram obtidas utilizando o OriginPro 9.0. Finalmente, foram determinadas as constantes de equilíbrio de dissociação para ureia e complexo com os inibidores (K<sub>i</sub>) (VOET; VOET, 2011)

#### 4.4. Determinação do valor IC<sub>50</sub> para os derivados de aminoácidos

Para a determinação do IC<sub>50</sub> dos derivados de aminoácidos, foi utilizado como controle, o sistema urease-ureia, e os valores obtidos para os derivados foi comparado com inibidores clássicos: hidroxiureia, tioureia, ácido acetohidroxâmico e NBPT. A determinação do IC<sub>50</sub> foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico do azul de indofenol, conforme descrito por Tavares *et al.*, 2021a, com adaptações. Neste experimento, 12 mU de urease (em tampão de fosfato de sódio 25 mM, EDTA 10 mM, pH 7,0) foram incubados com concentrações crescentes de cada derivado de aminoácido ou inibidor clássico por 5 min (Para o inibidor clássico TU, o tempo de incubação foi de 15 min). Em seguida, se adicionou ureia (10 mM, concentrações final), completando o volume total de 100  $\mu$ L com tampão. Essa mistura foi incubada a temperatura de 25 °C e sob agitação por 10 min. A concentração de amônio gerado foi determinada a 655 nm após 30 min de incubação a 37 °C e sob agitação com as soluções A [salicilato de sódio 11 % (m/v) e nitroprussiato de sódio 1,1  $\mu$ M)] e solução B [NaClO 0,13% (v/v) e NaOH 0,15 M)] a 37°C. Por fim, os resultados foram comparados ao sistema de referência obtido da curva analítica com urease padrão na ausência do inibidor.

#### 4.5. Medidas de fluorescência no estado estacionário

No estudo de interação com urease foi realizada titulação espectrofluorimétrica da urease (2  $\mu$ M) frente aos derivados de julolidinas (**RS11 e RS12**) (10 a 150  $\mu$ M) e aos derivados dos aminoácidos (**110-L, 110-D, 110 ac-L, 110 ac-D, 116 -** 10 a 250  $\mu$ M). Nestes experimentos, se empregou  $\lambda_{ex} = 280$  nm e  $\lambda_{em} = 334$  nm com *slit* de 5 nm para excitação e emissão (LAGE *et al.*, 2018). Para os derivados **106 ac-L, 106 ac-D** (10 - 30  $\mu$ M) foi empregado como estratégia o uso da fluorescência sincronizada, fixando o  $\Delta\lambda$  em 25 nm, empregando-se  $\lambda_{ex} = 255$  nm e  $\lambda_{em} = 315$  nm com *slit* de 5 nm para excitação e emissão. Em todos os estudos de interação, se utilizou como critério analítico e parâmetro de avaliação os valores da constante de Stern-Volmer (K<sub>SV</sub>) e/ou da constante de ligação (K<sub>b</sub>) relativo ao processo de interação proteína-ligante. Para avaliação dos parâmetros termodinâmicos foram realizadas titulações espectrofluorimétricas a 22, 30 e 38°C, em seguida, os valores de K<sub>b</sub> foram calculados para sistema e aplicando-se a equação de Vant't Hoff foram estabelecidos os valores de  $\Delta$ H,  $\Delta$ S e posteriormente,  $\Delta$ G (SILVA, 2017).

#### 4.6. Fluorescência tridimensional (3D): avaliação de alterações conformacionais

Os estudos fluorescência 3D foram realizados com urease, na presença e ausência dos ligantes, mantendo-se a concentração da urease a 2  $\mu$ M, enquanto para os ligantes se usou: **RS12-J2** (40  $\mu$ M), **110-L**, **110-D**, **110 ac-L**, **110 ac-D**, **116**, **106 ac-L**, **106 ac-D** (100  $\mu$ M) a pH 7,4. As condições experimentais foram as seguintes:  $\lambda_{ex} = 220$  a 400 nm (variando de 10 em 10 nm),  $\lambda_{em} = 250$  a 450 nm, e *slit* de excitação e emissão igual a 5 nm (BRAGA *et al.*, 2019).

### 4.7. Fluorescência sincronizada: avaliação do microambiente dos resíduos de Tir e Trp

Os resíduos de Trp foram monitorados utilizando-se  $\Delta\lambda = 60$  nm ( $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$ ) e os resíduos de Tir foram monitorados utilizando-se  $\Delta\lambda = 15$  nm. Por fim, se avaliou o processo de interação dentro da faixa espectral de 280 a 450 nm. As medidas foram realizadas na ausência dos ligantes, mantendo-se a concentração da urease fixa a 2  $\mu$ M, e na presença deste variando a concentração a depender da classe de cada composto avaliado (SANTOS, 2017).

#### 4.8. Estudos por UV-vis

Para os estudos de UV-vis visando avaliar a formação do complexo e alterações na estrutura da urease empregou-se 1  $\mu$ M da urease de *Jack bean*, variando-se a concentração dos ligantes de 5 a 30  $\mu$ M para os ligantes **RS11** e **RS12** (WANI *et al.*, 2017). Para os derivados de aminoácidos a urease foi mantida fixa em 2  $\mu$ M e a concentração dos derivados variou de 0,1 a 1,5  $\mu$ M. Os dois sistemas foram avolumados em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4) Os espectros foram obtidos nos comprimentos de onda entre 200 a 300 nm (WANI *et al.*, 2017).

Foram também avaliados os efeitos dos ligantes na capacidade de interação com os íons Ni(II) por UV-vis. Para o ligante **RS12-J2** e para os derivados **106 ac-L e 106 ac-D**, tanto as concentrações dos ligantes, como dos íons Ni(II) foram de 10  $\mu$ M, sendo os espectros obtidos nos comprimentos de onda entre 240- 400 nm. Para os derivados **110-L**, **110-D**, **110 ac-L**, **110 ac-D** e **116**, as concentrações dos ligantes foram de 10  $\mu$ M e a concentração dos íons Ni(II) foi de 20  $\mu$ M (LAGE *et al*, 2018).

#### 4.9. Estudos de competição

Para o estudo de competição no sítio catalítico da urease foram empregados os inibidores clássicos desta enzima como a hidroxiureia (HU), omeprazol (OMP), tioureia (TU), *N*-(n-butil) tiofosfóricotriamida (NBPT) e ácido acetohidroxâmico (AA), mantendo-se a proporção entre urease e inibidor em 1:25. Para o derivado **RS12-J2**, a concentração da urease foi de 1  $\mu$ M e para os derivados de aminoácidos, foi de 2  $\mu$ M. Em seguida, foi realizado uma titulação espectrofluorimétrica com: **RS12-J2** (10 - 150  $\mu$ M) e derivados de aminoácidos: **110-L**, **110-D**, **110 ac-L**, **110 ac-D**, **116** (10 - 250  $\mu$ M), **106 ac-L**, **106 ac-D** (10 - 30  $\mu$ M) na presença e na ausência dos inibidores (BRAGA *et al.*, 2019).

### 4.10. Transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET)

Para a avaliação da distância intermolecular entre fluoróforo e o composto *quencher* foram realizadas medidas de fluorescência molecular da urease e do sistema proteína-ligante, assim como, do perfil de absorção molecular dos ligantes. Para tanto, para o derivado **RS12-J2** foi mantida a proporção da urease e ligante em 1:2, sendo empregada a urease em 10  $\mu$ M e o ligante em 20  $\mu$ M. Para os derivados de aminoácidos **110-L e 110-D** a proporção foi de 1:4, sendo usada urease a 10  $\mu$ M e os ligantes a 40  $\mu$ M. Para os demais derivados **110 ac-L**, **110 ac-D** e **116**, a proporção foi de 1:2, mantendo a urease de 10  $\mu$ M e os ligantes a 20  $\mu$ M (BRAGA *et al.*, 2019).

### 4.11. Atividade antiureolítica em amostras de solo

O ensaio da atividade antiureolítica foi realizado empregando quatro amostras de solos, coletados e caracterizados previamente (TAVARES *et al.*, 2021a; SILVA *et al.*, 2019) com diferentes teores de matéria orgânica e características físico-químicas (Tabela S4.1). A atividade residual foi determinada com base na metodologia descrita por Cordero *et al.* (2019) com adaptações, e os resultados expressos quanto ao valor médio de inibição. Assim, 4 g de cada solo (S1, S2, S3, S4) foram pesados e transferidos para frascos erlenmeyer, sendo adicionado o inibidor clássico NBPT ou composto (derivados de julolidinas ou derivados de aminoácidos) a 0,5 mM para um volume final de 10 mL (solução tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5). Este sistema seguiu para agitação constante a 650 rpm por 30 min. Em seguida, 500 µL de cada suspensão foram

transferidos para tubos Falcon, adicionando-se 200  $\mu$ L de ureia 80 mM ou 200  $\mu$ L de solução tampão de acetato de sódio 50 mM (sistema de controle), seguido de agitação constante por 2 h. Em sequência, 2 mL de KCl 2 M foram adicionados a cada tubo e o sistema foi agitado durante 30 min. Por fim, as suspensões foram centrifugadas (2900 rpm, 10 min), e o sobrenadante foi separado do resíduo. O sistema de referência (100% de atividade) foi considerado aquele contendo as ureases extraídas com ureia na ausência do inibidor. A concentração de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foi determinada em 680 nm em leitor de microplaca utilizando 75  $\mu$ L de sobrenadante após centrifugação, 75  $\mu$ L de água ultrapura e incubação por 30 min com 75  $\mu$ L de solução A [salicilato de sódio 1,3% (m/v) e nitroprussiato de sódio 1,1  $\mu$ M) e 30  $\mu$ L de solução B [NaClO 0,1% (v/v) e NaOH 0,15 M), nesta ordem (TAVARES *et al.*, 2021a). Nesta avaliação, os experimentos foram realizados em triplicata (n = 3) e expressos em termos de média ± SD (desvio padrão). Os dados obtidos foram analisados pelo teste de comparações múltiplas baseado em análise de variância (ANOVA, *one-way*) seguido do teste de Tukey, considerando a distribuição normal dos dados e intervalo de 95% de confiança.

# 4.12. Docking Molecular e Simulações de Dinâmica para os derivados de julolidinas

Para o estudo in silico, as julolidinas estudadas RS11-J1, RS11-J2, RS12-J1 e RS12-J2 foram desenhadas e convertidas em estruturas tridimensionais usando o software MarvinSketch® com o estado de protonação em pH neutro (7,4) (MARVINSKETCH, 2020). Além disso, os compostos foram minimizados energeticamente (semi - método empírico Austin Modelo 1 - AM1) utilizando o software Orca® (NEESE, 2012). Todas as simulações de encaixe foram realizadas utilizando o software Gold 2020 v.1.10.5®, considerando o sítio ativo da urease de Jack bean e utilizando a função ChemPLP, conforme protocolo validado descrito pelo grupo de pesquisa do professor Thiago Mendonça de Aquino (JONES, 1997). As figuras de interação foram geradas usando o software Chimera 13.1® (PETTERSEN et al., 1605). Para o derivado **RS12-J2**, as ligações de menor energia foram escolhidas como as conformações iniciais para as simulações MD, conforme protocolo descrito anteriormente (JONES, 1997). O desvio quadrático médio (RMSD), flutuação quadrático médio (RMSF), giro de raio (Rg) e gráficos da área de superfície acessível ao solvente (SASA) foram calculados com base na análise de a trajetória MD e gerada usando o software Xmgrace® (TURNER, 2005). Por fim, a qualidade dos ângulos quanto a estereoquímica e os diedros na estrutura pós-dinâmica foram validados por gráficos de Ramachandran usando o *software* web Saves<sup>®</sup> (https://saves.mbi.ucla .edu/) aplicando a ferramenta Procheck® (LASKOWSKI *et al.*, 1993).

## 4.12.1. Cálculos MM-PBSA

Para determinar a afinidade de **RS12-J2** e energia de interações entre ligante e urease, realizamos cálculos de afinidade usando o método de Mecânica Molecular/Área de Superfície de Poisson-Boltzmann (MM-PBSA) (KUMARI; KUMAR; LYNN, 2014). Este método calculou a energia livre de Gibbs ( $\Delta G_{ligação}$ ) considerando as interações de van der Waals e as interações eletrostáticas (não ligadas) de um ligante e seu receptor durante uma simulação de dinâmica molecular (SARMA & MATTAPARTHI, 2019). Esses cálculos foram realizados usando a ferramenta *g\_mmpbsa* e os arquivos de trajetória obtidos após a simulação de dinâmica molecular usando o software GROMACS, a 50 ns. Finalmente,  $\Delta G_{ligação}$  foi determinado como a média das energias de interação livre e de solvatação (SARMA & MATTAPARTHI, 2019).

### PARTE I. DERIVADOS DE JULOLIDINAS

# **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 5.1. Estudos Cinéticos

Os estudos cinéticos foram realizados pelo grupo de pesquisa da Profa. Luzia Modolo do Instituto de Botânica da UFMG. Com os resultados obtidos foi possível plotar o gráfico de Lineweaver-Burk (Fig. 46), que é a forma linearizada da equação de Michaelis-Menten. Nessa forma linearizada, 1/Velocidade (eixo y) é plotado contra 1/ [Substrato] (eixo x). Ajustando-se esses dados a uma reta, y = a + b.x, o coeficiente linear obtido seria 1/V<sub>m</sub> (correspondente ao termo a) e o coeficiente angular,  $k_m/V_m$  (correspondente ao termo b). De forma que V<sub>m</sub> é a máxima velocidade inicial, teoricamente atingida quando a enzima está saturada pela alta concentração de substrato, e  $k_m$ , denominada constante de Michaelis, é a concentração de substrato na qual é atingida uma velocidade igual à metade da máxima e indica a afinidade.

Dessa forma, analisando os gráficos de Lineweaver-Burk, foi verificado que os derivados **RS11-J1**(Fig. 46A), **RS11-J2** (Fig. 46B) **RS12-J1** (Fig. 46C) podem ser classificados como inibidores não competitivo ou misto, pois houve alteração no valor de  $V_m$ , enquanto os valores de  $k_m$  praticamente não mudaram, com a adição de incrementos das sustâncias avaliadas (KHAN *et al.*, 2014). Em contrapartida, para o derivado **RS12-J2** (Fig. 48D) não houve alteração nos valores de  $V_m$  e os valores de  $k_m$  diminuíram com a adição de incrementos da sustância avaliada, sendo, portanto, classificado como inibidor competitivo (BRAGA *et al.*, 2019). Em seguida foram obtidos os valores das constantes de inibição (K<sub>i</sub>) e de inibição aparente (K<sub>i</sub>'), onde Ki e K'<sub>i</sub> são medidas pela afinidade do inibidor com a enzima ou com o complexo enzima-substrato, respectivamente (Tabela 2)



Figura 46. Gráficos de Lineweaver-Burk para os derivados (A) RS11-J1; (B) RS11-J2; (C) RS12-J1; (D) RS12-J2.

Fonte: disponibilizado pela Profa Luzia Modolo (UFMG).

Composto	$K_i (\mu M)$	K <sub>i</sub> ' (μM)
R11-J1	$1230\pm320$	$15070\pm2167$
R11-J2	$900 \pm 150$	$1910\pm250$
R12-J1	$940 \pm 200$	$1370\pm940$
R12-J2	$850 \pm 120$	*

Tabela 2. Valores das constantes de inibição urease na presença de julolidinas.

\* Não se aplica porque o composto é um inibidor competitivo.

Fonte: disponibilizado pela Profa Luzia Modolo (UFMG).

Verificou-se que os valores das constantes de inibição (K<sub>i</sub>) foram estatisticamente similares (média de 980 ± 171  $\mu$ M), uma vez que foram analisados por ANOVA (*one way*, *p* = 0,20 > 0,05), indicando similaridade estatística a um nível de confiança de 95%. Braga e col. (2019) obtiveram valores similares de K<sub>i</sub> (960  $\mu$ M) para o derivado de adultos de Biginelli (BA5-S) (Fig. 47A), o qual foi classificado como inibidor competitivo. Já Khan e col. (2014) classificou o composto 1-(3-clorofenil)-3-(3,4-diclorofenil) tioureia (Fig. 47B) como inibidor competitivo, obtendo K<sub>i</sub> = 11,7  $\mu$ M. Figura 47. (A) BA5-S; (B) 1-(3-clorofenil)-3-(3,4-diclorofenil) tioureia.



Fonte: (A) Adaptado de BRAGA et al., 2019; (B) Adaptado de KHAN et al., 2014.

Saeed e col. (2016) obtiveram valor menor de K<sub>i</sub> (0,02  $\mu$ M) para o composto (Z)-*N*-(3-(4-aminossulfonilfenil)-4-metiltiazol-2(3H)-ilideno)-3-fluorobenzamida (Fig. 48A) frente a enzima urease (*Jack bean*), sendo o composto classificado como inibidor misto. Rezaei e col. (2021) obtiveram um baixo valor de K<sub>i</sub> (1,21  $\mu$ M) para o composto 1-(4fluorobenzil)-4-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il) metil)-1H-1,2,3-triazolenzima (Fig. 48B) frente a urease (*Jack bean*), classificando o inibidor como não competitivo.

**Figura 48**. (A) (Z)-*N*-(3-(4-aminossulfonilfenil)-4-metiltiazol-2(3H)-ilideno)-3-fluorobenzamida; (B) 1-(4- fluorobenzil)-4-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il) metil)-1H-1,2,3-triazolenzima.



Fonte: (A) Adaptado de SAEED et al., 2016; (B) Adaptado de REZAEI et al., 2021.

Considerando a eficiência dos derivados de julolidinas para inibir a urease baseado no perfil cinético foram realizados estudos biofísicos do processo de interação para um melhor entendimento do sistema em estudo.

#### 5.2. Estudos de interação e parâmetros termodinâmicos

Os estudos de interação entre os derivados da julolidina (**RS11-J1**, **RS11-J2**, **RS12-J1**, **RS12-J2**) e urease foram realizados empregando espectroscopia de fluorescência molecular a fim de se obter um melhor entendimento do processo de inibição enzimática destes compostos. A fluorescência intrínseca da urease está associada à presença dos resíduos de aminoácidos aromáticos Trp, Tir e Phe. O Trp é o principal fluoróforo devido ao seu maior rendimento quântico ( $\Phi = 0,20$ ) em condição de pH fisiológico, quando comparado a Tir ( $\Phi = 0,14$ ) e Phe ( $\Phi = 0,04$ ) e também, pelo fato da fluorescência da Tir ser parcialmente desativada quando está ionizada e próxima a grupos amino, carboxílico, ligações dissulfeto ou do próprio Trp (GHISAIDOOBE & CHUNGS, 2014; TIAN *et al.*, 2015). A urease de *C. ensiformis (Jack bean*) possui quatro resíduos de Trp (495, 648, 708 e 728) e vinte e um resíduos de Tir (18, 32, 46, 171, 179, 188, 279, 283, 306, 309, 349, 410, 417, 544, 676, 680, 693, 750, 778, 814, 837) (TAKISHIMA; SUGA; MAMIYA, 1988). Portanto, os resíduos de Trp podem ser usados como fluoróforos para estudos de interação proteína-ligante e para o processo de avaliação de alterações conformacionais da proteína.

O processo de interação urease - julolidinas foi avaliado a partir da titulação espectrofluorimétrica da enzima (2  $\mu$ M) frente aos ligantes (10 a 150  $\mu$ M) empregando medidas de fluorescência no estado estacionário. Os espectros de fluorescência molecular da urease na ausência e presença de quantidades crescentes de **RS12-J2** são apresentados na Fig. 49A. Perfis semelhantes foram obtidos para os outros compostos (Fig. S5.1 – Fig. S5.11, material suplementar).

Avaliando esses espectros, observa-se que urease apresentou uma banda de fluorescência intensa em 334 nm ( $\lambda_{ex} = 280$  nm), indicando que os resíduos de Trp estão parcialmente protegidos do solvente (água), uma vez que a urease está com sua estrutura nativa (Fig. 49A). A adição de concentrações crescentes do **RS12-J2** levou a uma redução da intensidade de fluorescência da urease, indicando a ocorrência do processo de *quenching*. Em aproximadamente 345 nm verifica-se ainda a existência de ponto isosbéstico (Fig. 49A), que evidencia o equilíbrio entre urease e o ligante, e reflete a formação do complexo entre as espécies, indicando que é formado um complexo no estado fundamental (MITRA *et al.*, 2016). Vale ressaltar que a presença do ponto isosbéstico também foi observada para os demais derivados.

Figura 49. (A) Perfil espectral de emissão de urease (2  $\mu$ M) na presença de diferentes concentrações de **RS12-J2** a pH 7,4 e 38 °C. (B) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (C) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Além disto, um deslocamento do comprimento de onda de máxima emissão para menores comprimentos de onda (blue-shift) de 330 para 325 nm foi observado. A redução da intensidade do sinal de fluorescência é atribuída a alterações conformacionais na estrutura nativa da enzima induzidas pela interação com **RS12-J2**, de forma que houve uma diminuição da polaridade do microambiente dos resíduos de Trp (LI *et al.*, 2017; ALBANI, 2007). Esse mesmo perfil foi observado para os demais derivados.

Para determinar o mecanismo de *quenching* preferencial analisou-se a variação dos valores da constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) e de velocidade bimolecular difusional ( $k_q$ ) calculadas a partir da equação (1):

$$\frac{\mathbf{F}_0}{\mathbf{F}} = 1 + \mathbf{K}_{\rm SV}[\mathbf{Q}] = 1 + \tau_0 \mathbf{k}_{\rm q}[\mathbf{Q}] \qquad \text{equação (1)}$$

Onde F<sub>0</sub> e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do ligante, respectivamente, [Q] é a concentração do ligante que atua como *quencher*,  $\tau_0$  é o tempo de vida médio da proteína no estado excitado (10<sup>-8</sup> s). O valor de Ksv foi calculado a partir da linearização de equação (1) (Fig. 49B) (SURYAWANSHI *et al.*, 2016).

De forma geral, os valores de  $K_{SV}$  reduziram com aumento da temperatura. Este perfil, é um indicativo de mecanismo de *quenching* estático (Tabela 3) com formação de complexo supramolecular no estado fundamental (SHU *et al.*, 2015). Adicionalmente, Shu e col. (2015) indicam que valores de  $k_q > 2,0\times10^{10}$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> estão associados a ocorrência preferencial de *quenching* estático. Os valores de  $k_q$  obtidos neste estudo variaram de 0,61 a  $3,41\times10^{12}$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (Tabela 3), confirmando que o processo de interação entre os ligantes e a urease ocorreu por meio de *quenching* estático (LAGE *et al.* 2018).

Para avaliar a força de interação entre a urease e os derivados da julolidina, foi calculada a constante de ligação (K<sub>b</sub>):

$$\log\left[\frac{(\mathbf{F}_{0} - \mathbf{F})}{\mathbf{F}}\right] = \log K_{b} + n\log[\mathbf{Q}] \qquad \text{equação (2)}$$

onde *n* é proporção estequiométrica do complexo macromolecular formado entre proteína e ligante (DANTAS *et al.*, 2017). A linearização da equação (2) permitiu calcular os parâmetros de ligação K<sub>b</sub> e *n* (Fig. 49C), para cada ligante frente a urease. De forma geral, os valores das constantes de ligação obtidos para os derivados **RS11** variaram de 1,16 a  $25,9\times10^4$  M<sup>-1</sup>, sendo menores quando comparados aos derivados **RS12** (0,10 a 7,33×10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>) para o intervalo de 22 a 38°C, sugerindo que estes possuem maior afinidade pela urease (Tabela 3). Os valores de n variaram de 0,98 e 1,59 indicando que as interações entre a estrutura da urease e os ligantes acontecem na razão de 1:1. Os valores de K<sub>b</sub> para os derivados **RS12** estão no mesmo intervalo de valores relatados por Braga e col. (2019) para os adutos de Biginelli (K<sub>b</sub> = 0,66 a 8,49×10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>) enquanto os valores obtidos para derivados **RS11** apresentam similaridade com trabalho de Lage e col. (2018) para compostos extraídos de líquen (0,21 a  $52.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ). Assim, as constantes de ligação calculadas indicaram alta afinidade entre a macromolécula e os ligantes pois, de forma geral, apresentam K<sub>b</sub>  $\geq 10^5$  (SILVA *et al.*, 2017).

Os parâmetros termodinâmicos ( $\Delta$ H e  $\Delta$ S) associados ao processo de interação foram determinados, a partir da equação de Van't Hoff, a fim de avaliar as principais forças intermoleculares responsáveis pela estabilização do complexo urease-julolidinas:

$$\ln K_{\rm b} = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \left[\frac{1}{T}\right] + \frac{\Delta S}{R} \qquad \text{equação (3)}$$

onde R é a constante dos gases ideais e T é a temperatura experimental (em K) (ALANAZI & ABDELHAMEED, 2016). A energia livre de Gibbs ( $\Delta$ G), por sua vez, foi calculada de acordo com a equação (4):

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \qquad \text{equação (4)}$$

		Parâmetros de ligação						Parâmetros termodinâmicos		
Ligante	Т (°С)	K <sub>SV</sub> (M <sup>-1</sup> )	r	$k_q$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	K <sub>b</sub> (M <sup>-1</sup> )	п	r	ΔG (kJ mol <sup>-1</sup> )	ΔH (kJ mol <sup>-1</sup> )	ΔS (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
	22	$6,43 \pm 0,03 \times 10^3$	0,9896	6,43×10 <sup>11</sup>	$1,16 \pm 0,23 \times 10^{4}$	$1,\!07\pm0,\!05$	0,9931	- 23,63		
RS11.J1	30	$6,08 \pm 0,05 \times 10^3$	0,9781	6,08×10 <sup>11</sup>	$13,32 \pm 0,10 \times 10^4$	$1,\!35\pm0,\!03$	0,9989	- 28,31	148,83	584,74
	38	$5,91 \pm 0,03 \times 10^{3}$	0,9846	5,91×10 <sup>11</sup>	$25,91 \pm 0,41 \times 10^4$	$1,\!43\pm0,\!10$	0,9873	- 32,99		
RS11.J2	22	$7,78 \pm 0,04 \times 10^{3}$	0,9940	$7,78 \times 10^{11}$	$1,72 \pm 0,15 \times 10^4$	$1,\!09\pm0,\!03$	0,9965	- 24,55		
	30	$6,97 \pm 0,03 \times 10^{3}$	0,9898	6,97×10 <sup>11</sup>	$12,71 \pm 0,32 \times 10^4$	$1,\!31\pm0,\!07$	0,9901	- 28,27	112,52	464,71
	38	$6,89 \pm 0,07 \times 10^{3}$	0,9784	6,89×10 <sup>11</sup>	$18,02 \pm 0,20 \times 10^4$	$1,\!37\pm0,\!05$	0,9954	- 31,98		
RS12.J1	22	$3,41 \pm 0,33 \times 10^{4}$	0,9737	3,41×10 <sup>12</sup>	$7,33 \pm 0,31 \times 10^{6}$	$1{,}57 \pm 0{,}07$	0,9935	- 38,95		
	30	$2,71 \pm 0,30 \times 10^4$	0,9639	2,71×10 <sup>12</sup>	$5,71 \pm 0,31 \times 10^{6}$	$1{,}57 \pm 0{,}07$	0,9935	- 38,82	- 43,85	- 16,64
	38	$2,28 \pm 0,24 \times 10^4$	0,9669	2,28×10 <sup>12</sup>	$2,91 \pm 0,34 \times 10^{6}$	$1{,}52\pm0{,}08$	0,9915	- 38,68		
RS12.J2	22	$2,82 \pm 0,28 \times 10^4$	0,9768	2,82×10 <sup>12</sup>	$6,87 \pm 0,13 \times 10^{6}$	$1,59 \pm 0,03$	0,9992	- 40,21		
	30	$2,20 \pm 0,20 \times 10^4$	0,9791	2,20×10 <sup>12</sup>	$1,80 \pm 0,28 \times 10^{6}$	$1,\!47\pm0,\!07$	0,9957	- 32,90	- 309,82	- 913,41
	38	$1,49 \pm 0,11 \times 10^{4}$	0,9874	1,49×10 <sup>12</sup>	$0,10 \pm 0,06 \times 10^{6}$	$0,\!98\pm0,\!14$	0,9704	- 25,59		

**Tabela 3**. Parâmetros de ligação e termodinâmico para a interação entre urease e os derivados da julolidina.

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

As principais interações intermoleculares envolvidas no processo de interação entre urease e os derivados de julolidina foram caracterizadas como hidrofóbicas ( $\Delta H > 0 e \Delta S > 0$ , derivados **RS11**) e forças de van der Waals e ligações de hidrogênio ( $\Delta H < 0 e \Delta S < 0$ , derivados **RS12**) (WANI *et al.*, 2017). O valor positivo de  $\Delta S$  para os sistemas com os derivados **RS11**, indica que esses sistemas estão mais desorganizados, o que é devido ao deslocamento das moléculas de água (solvente) da estrutura da proteína para fora da biomolécula, quando as interações hidrofóbicas são formadas com o ligante. Assim, o aumento da temperatura tende a favorecer esse processo de interação (K<sub>b</sub> aumenta com o aumento da temperatura) (BARAKAT & PATRA, 2013).

O valor negativo de  $\Delta$ S para os sistemas com os derivados **RS12** indica que estão mais organizados, explicando a existência das ligações de hidrogênio e de van der Waals, de forma que o aumento da temperatura desfavorece o processo de interação (K<sub>b</sub> diminui com o aumento da temperatura), uma vez que o aumento da temperatura tende a tornar o sistema mais desorganizado (BARREIRO & FRAGA, 2015).

Adicionalmente,  $\Delta G < 0$ , indicou para todos os sistemas que o processo de interação foi termodinamicamente espontâneo. Por fim, os demais ensaios foram realizados apenas com o composto **RS12-J2**, pois como os valores de K<sub>b</sub> e  $K_i$  apresentaram-se similares entre todos os compostos, segundo o estudo cinético este foi o único inibidor estritamente competitivo.

### 5.3. Avaliação de mudanças conformacionais da urease

O espectro de fluorescência tridimensional (3D) permite obter informações mais detalhadas sobre as alterações conformacionais típicas na estrutura secundária de uma proteína (SANTOS *et al.*, 2018). No espectro de fluorescência 3D para a urease livre e complexada com **RS12-J2** (Fig. 50), o pico 1 corresponde ao espalhamento da radiação (*scattering Rayleigh*) caracterizado pela reemissão da radiação ( $\lambda_{ex} = \lambda_{em}$ ) pela água (solvente), ou seja, uma pequena fração da radiação absorvida é espalhada em todas as direções em determinado comprimento de onda (QING & HONG-MEI; 2012). O pico 2 corresponde à emissão dos resíduos Trp e Tir excitados a 280 nm, e o pico 3 corresponde à excitação de estados eletrônicos mais excitados dos resíduos aromáticos presentes na proteína, informando sobre o microambiente destes, assim como o pico com excitação em 280 nm (BORTOLOTTI, *et al.*, 2016). As intensidades de fluorescência dos picos 2 e 3 foram reduzidas em 8 e 7%, respectivamente, após a adição do ligante (Tabela 4).

**Figura 50**. Os espectros de fluorescência tridimensional da: (A) urease e (B) do complexo **RS12-J2** -urease em pH 7,00. A enzima e os ligantes foram usados a 2,0 e 40 µM, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

.

 Tabela 4. Parâmetros de fluorescência tridimensional para urease livre ou na presença do composto RS12-J2.

	Urease		Urease- <b>RS12-J2</b>				
Picos	Posição	Stokes <sup>1</sup>	F	Posição	Stokes	F	
	$(\lambda_{ex} / \lambda_{em})$	$\Delta\lambda$ (nm)	(u.a)	$(\lambda_{ex} / \lambda_{em})$	$\Delta\lambda$ (nm)	(u.a)	
1	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	>1000	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	>1000	
2	280 / 332	52	525 (100%)	280 / 338	58	485 (92%)	
3	230 / 327	97	132 (100%)	230 / 329	99	123 (93%)	

<sup>1</sup>Deslocamento Stokes ( $\Delta \lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$ )

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

A redução na intensidade de fluorescência correspondente aos picos 2 e 3 indicou alterações no microambiente dos resíduos de aminoácidos Trp e Tir, indicando modificações na estrutura da proteína nativa. Além disso, esses resultados são suportados pela variação do deslocamento *Stokes* determinado para a urease nativa e o complexo inibidor-enzima (BORTOLOTTI, *et al.*, 2016).

O deslocamento de Stokes é a diferença entre as posições dos máximos da banda dos espectros de absorção e emissão da mesma transição eletrônica, podendo ser expresso em unidades de comprimento de onda (ALBANI, 2007). Como tanto a absorção quanto a emissão de energia são características de uma estrutura molecular específica, alterações nos valores do deslocamento Stokes estão associadas a alterações na estrutura do fluoróforo.

### 5.4. Estudos por fluorescência sincronizada

Por meio do emprego de fluorescência sincronizada (Fig. 51) foi possível observar as interações preferenciais e alterações na polaridade do microambiente dos principais fluoróforos (Tir e Trp) da urease (CHAKRABORTY & LEDWANI, 2016). A variação no máximo comprimento de onda de emissão ( $\Delta\lambda_{max}$ ) indica mudanças na polaridade da microrregião dos resíduos de Trp e Tir, sendo obtida a partir da subtração entre  $\Delta\lambda_{max}$ (urease/ligante) e  $\Delta\lambda_{max}$  (urease livre). Para o complexo urease-**RS12-J2** (Fig. 51A-B)  $\Delta\lambda_{\text{max}}$  foi maior para os resíduos de Tir ( $\Delta\lambda_{\text{max}} = +5$  nm) em relação aos de Trp ( $\Delta\lambda_{\text{max}} =$ + 3 nm). Além disto, a constante de Stern-Volmer (Ksv) foi utilizada como parâmetro para inferir sobre interações preferenciais, aplicando um  $\Delta \lambda = 15$  nm para monitorar os resíduos de Tir e um  $\Delta \lambda = 60$  nm para monitorar os resíduos de Trp, sendo o  $\Delta \lambda$  obtido a partir da diferença entre o comprimento de onda de emissão ( $\lambda_{em}$ ) e o comprimento de onda de excitação ( $\lambda_{ex}$ ). Dessa forma foi verificado que o valor de Ksv variou de forma mais significativa para os resíduos de Tir ( $K_{SV} = 1,04 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) comparado aos de Trp  $(K_{SV} = 0.27 \times 10^4 \text{ M}^{-1})$ . Estes dados indicam que houve aumento na polaridade do microambiente dos aminoácidos aromáticos devido à variação positiva de  $\Delta\lambda_{max}$  e, que os resíduos de Tir foram mais influenciados no processo de interação com RS12-J2 (TAN et al., 2012). Estes resultados suportam que o composto RS12-J2 é um inibidor competitivo, pois existem dois resíduos de Tir (410 e 544) próximos aos principais resíduos His (409 e 545), responsáveis pela coordenação dos cátions de Ni(II) no sítio ativo da urease, enquanto que os resíduos de Trp (495 e 648) estão distantes do sítio catalítico (BRAGA et al., 2019; LAGE et al., 2018)

**Figura 51.** Espectros de fluorescência sincronizada de urease (2,0  $\mu$ M) após adição de concentrações crescentes de **RS12-J2** em pH 7,4, monitorando (A)  $\Delta\lambda = 60$  nm (resíduos de Trp) e (B)  $\Delta\lambda = 15$  nm (resíduos de Tir).



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

### 5.5. Estudos por UV-vis

A medição de absorção no UV-vis é um método muito simples e aplicável para explorar mudanças na estrutura da proteína (CHENG *et al.*, 2011). A Fig. 52 mostra o espectro de absorção no UV-vis da urease na ausência e presença do ligante **RS12-J2**, indicando uma banda com maior intensidade, em aproximadamente 202 nm, a qual corresponde a estrutura  $\alpha$ -hélice da urease; e outra banda de menor intensidade em aproximadamente 280 nm, a qual representa as transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  referente aos aminoácidos aromáticos (WANI *et al.*, 2017). Além disso, é observado em 202 nm que à medida que a concentração do ligante aumenta, a absorvância da urease diminui, sendo adicionalmente observado um deslocamento para maiores comprimentos de onda 202 para 204 nm não sendo observado variações significativas em 280 nm. Essas evidências indicam que ocorreu interação entre urease e o derivados do **RS12-J2**, levando a mudanças conformacionais da urease, alterando sua atividade catalítica, e no caso, confirmando que este composto atua como inibidor.

**Figura 52.** Espectros de absorção no UV-vis da urease na ausência e presença do **RS12-J2**, a pH 7,4.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

5.6. Avaliação do sítio preferencial de interação

O sítio preferencial de interação do **RS12-J2** com a urease foi avaliado empregando inibidores competitivos como marcadores a partir de estudos de competição. Neste ensaio, foi usada a razão entre as constantes de ligação na presença e na ausência dos competidores ( $K_b'/K_b$ ) como parâmetro de avaliação, onde  $K_b'e K_b$  são as constantes de ligação na presença e ausência do competidor, respectivamente. A formação do complexo é favorecida quando  $K_b'/K_b > 1$ , porém quando essa razão for menor que 1, indica que houve desfavorecimento do sistema urease - **RS12-J2** (LAGE *et al.*, 2018).

Neste ensaio foi empregado um excesso de 25 vezes de cada inibidor em relação a enzima. Para tanto, obteve-se a razão  $K_b'/K_b$  igual a  $0.31 \pm 0.03$  (HU),  $0.06 \pm 0.02$ (OMP),  $0.52 \pm 0.36$  (TU),  $0.11 \pm 0.04$  (NPBT) e  $0.12 \pm 0.09$  (AA). Assim, é notório que a constante de ligação diminui na presença de todos os inibidores ( $K_b'/K_b < 1$ ), indicando que o **RS12-J2** interage no sítio ativo da urease. Portanto, estes resultados são concordantes com os estudos de cinética clássica e por fluorescência sincronizada, uma vez que HU, TU, NBPT e AA são classificados como inibidores competitivos (OLIVEIRA *et al.*, 2014) e o OMP como inibidor não competitivo, mas bloqueia o sítio ativo devido à reação com o resíduo Cys592 livre da urease de *Jack bean* (AMTUL *et al.*, 2002).

Por fim, a possibilidade de interação do **RS12-J2** no sítio ativo também foi avaliada considerando a probabilidade de formação de um complexo com cátions de Ni(II), uma vez que o sítio ativo da urease contém dois cátions de Ni(II). Esse ensaio foi realizado avaliando-se os espectros de absorção entre 200 e 300 nm para os sistemas: Ni(II) 10  $\mu$ M, **RS12-J2** 10  $\mu$ M e Ni (II): **RS12-J2** 1:1 (Fig. 53).

Dessa forma, a partir da Fig. 53 foi observado que O sistema Ni(II) + **RS12-J2** (1:1) apresentou menor absorbância do que **RS12-J2** livre e a subtração [**RS12-J2** - Ni(II) - Ni(II)] não levou à sobreposição do espectro do **RS12-J2** livre, indicando que o perfil obtido não era relativo ao efeito aditivo da lei de Beer, indicando a formação do complexo do **RS12-J2** com íons de Ni(II), o que reforça o conjunto de evidências de que este ligante atua como inibidor competitivo (SAEIDIFAR; MANSOURI-TORSHIZI; SABOURY, 2015).

**Figura 53**. Espectro de UV-vis do **RS12-J2** na presença e ausência de íons Ni(II) todos na mesma concentração  $(10 \ \mu M)$  em pH 7,4.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

5.7. Estudo de transferência de energia ressonante

Os estudos empregando FRET foram realizados para determinar a distância entre os resíduos dos aminoácidos fluorogênicos (doadores) da urease e o enantiômero **RS12**-

**J2** (receptor) no processo de transferência de energia (HOCHREITER *et al.*, 2019). A distância ( $r_0$ ) entre o doador e o receptor foi calculada a partir da equação (5):

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_0^6}$$
 equação (5)

em que, E é a fração de energia transferidas do doador para o receptor,  $r_0$  é a distância entre o ligante e o doador, e  $R_0$  é a distância crítica de Förster, quando 50% da energia de emissão do doador é transferida para o receptor (CHAKRABORTY & LEDWANI, 2016). A equação da distância crítica ( $R_0$ ) pode ser descrita como:

$$\mathbf{R}_{0}^{6} = \frac{8.79 \times 10^{-25} \times K^{2} \times \Phi \times J}{N^{4}}$$
 equação (6)

em que,  $K^2$  é fator de orientação que está diretamente relacionado com a geometria do dipolo entre o doador e o aceptor, sendo igual a 2/3, para orientação aleatória em solução, N é o índice de refração médio do meio no comprimento de onda onde a sobreposição dos espectros é significativa,  $\Phi$  é o rendimento quântico do doador para a urease, J, é a área de sobreposição do espectro de emissão de fluorescência normalizado do doador e em relação ao espectro de absorção do receptor (Fig. 54).

**Figura 54**. Sobreposição dos espectros normalizados de fluorescência da Urease (10  $\mu$ M) que atua como doador (D) de radiação e absorção molecular do **RS12-J2** (20  $\mu$ M) que atua como aceptor em pH 7,4.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Nesse caso,  $K^2 = 2/3$ , N = 1,36 e  $\Phi = 0,150$  para a urease (Wang, Zhang, Zhang, 2011). A área de sobreposição (*J*) pode ser calculada pela equação (7):

$$J = \frac{\sum F(\lambda)\varepsilon(\lambda)\lambda^{4}\Delta\lambda}{\sum F(\lambda)\Delta\lambda}$$
 equação (7)

onde,  $F(\lambda)$  é a área integrada da fluorescência do doador, e  $\varepsilon(\lambda)$  é área integrada em função do coeficiente de absorção molar do receptor, o qual pode ser obtido empregando a lei de Beer (MADRAKIANN *et al.*, 2014). Os parâmetros de FRET calculados para o sistema urease-**RS12-J2** foram  $J = 3,13 \times 10^{-15}$  cm<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>, com E = 18,3%,  $R_0 = 2,07$  nm e  $r_0 = 2,66$ nm. De acordo com os resultados, a energia transferida (E) foi inferior a 50%, implicando em  $R_0 < r_0$ . Ademais, o valor da distância de  $r_0$  foi menor que 8 nm, portanto a transferência de energia ocorreu com elevada probabilidade em decorrência do processo de interação (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Por fim, o valor de  $r_0$  foi próximo do valor obtivo por Tavares e col. (2021b, submetido) para benzoiltiourea ( $r_0 = 2,32$  nm).

#### 5.8. Avaliação do potencial de inibição da urease em amostras de solo

O uso de inibidores de urease é uma das estratégias adotadas para melhorar o desempenho da ureia na agricultura. Assim, como obteve-se resultados promissores nos estudos biofísicos *in vitro* foram realizados ensaios usando solo para avaliar o potencial dos compostos **RS2J1** e **RS2J2** em inibir a atividade das ureases. Os dois derivados foram avaliados uma vez que tanto as características físico-químicas quanto a variedade de microrganismos presentes no solo podem afetar o desempenho dos inibidores avaliados de forma a melhorar ou suprimir a eficiência do inibidor, levando a discordâncias com os resultados *in vitro* (BRITO *et al.*, 2015). Para isso foi usado como referência o inibidor clássico e dos compostos **RS2J1** e **RS2J2**, como observado (Tabela 5). A inibição (%) da atividade foi calculada de forma relativa, considerando o sistema na ausência do inibidor como 100% da atividade da urease.

Solo	Inibição (%)					
5010	NBPT	RS12-J1	RS12-J2			
S1	$33,0 \pm 2,6^{a^*}$	$6,59 \pm 0,53^{b}$	$30,0 \pm 1,1^{a}$			
S2	$29,2\pm2,8^{a}$	$7,53 \pm 0,84^{b}$	$17,8\pm0,2^{c}$			
<b>S</b> 3	$31,8 \pm 3,7^{a}$	$18,1\pm1,6^{\mathrm{b}}$	$15,1\pm0,8^{\mathrm{b}}$			
<b>S</b> 4	$28,8 \pm 1,4^{a}$	$20,0\pm1,9^{\rm b}$	$29,2\pm1,8^{\rm a}$			

**Tabela 5**. Inibição de ureases em diferentes amostras de solo na presença de 0,5 mM RS12-J1 e **RS12-J2** em comparação com NBPT.

\*Letras diferentes indicam que há diferença estatística na comparação entre linhas

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

A análise variância (ANOVA, *one-way*) foi feita para verificar o potencial dos compostos testados em comparação com o NBPT, avaliando-se separadamente cada solo. Assim, para os solos S1 e S4, o composto **RS12-J2** não difere estatisticamente do NBPT quanto a inibição das ureases do solo (p > 0,05), ao nível de 95% de confiança. Para o solo S2, ambos os compostos diferem do NBPT, sendo menos potentes, e diferem entre si, sendo o **RS12-J2** mais potente. Para os solos S3 ambos os derivados de julolidinas apresentam o mesmo potencial de inibição das ureases do solo, e são menos potentes que o NBPT.

Considerando que os valores de  $K_b$  obtidos nos estudos biofísicos estão na mesma ordem de grandeza (10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>) para os derivados **RS12-J1** e **RS12-J2**, a diferença nos valores de inibição (Table 5) estão associados a aspectos decorrentes da complexa natureza do solo quando comparada ao sistema *in vitro* e cinética clássica do inibidor. O derivado **RS12-J2** por ser um inibidor competitivo apresentou melhor performance quando comparado ao **RS12-J1**. Nesse sentido, o composto **RS12-J2** apresenta-se como alternativa promissora para aplicação como inibidor de ureases do solo com eficiência equivalente ao NBPT.

Diferenças entre resultados *in vitro* e aplicação em solos foram reportadas por Chaves-Silva *et al.* (2020), onde foi avaliada a atividade antiureolítica de cinco derivados de bases de Schiff no solo, os quais foram eficazes nos experimentos *in vitro*. Três derivados apresentaram inibição enzimática de 65 a 71 %, sendo inclusive mais potentes que o NBPT (52%), enquanto os outros derivados apresentaram inibição menor que 10%. Araújo *et al.* (2015) avaliaram a capacidade de derivados benzotiazóis (BTZs) em inibir a atividade ureolítica, sendo observado que o BZT-10 (Fig. 55A), considerado inativo em ensaios *in vitro*, apresentou-se como o inibidor mais potente nos estudos no solo (40% de inibição). De forma antagônica, o BZT-17 (Fig. 55B) o qual foi tão eficiente quanto a tioureia (inibidor de referência) nos estudos *in vitro*, sequer conseguiu inibir as ureases do solo.

Figura 55. Estrutura dos derivados benzotiazóis (A) BZT-10 e (B) BZT-17.



Fonte: Adaptado de ARAÚJO et al., 2015.

Por fim, Brito *et al.* (2015) avaliaram o potencial inibitório de derivados de benzoiltioureias (BTUs), sendo também observado que os derivados BTU-26 (Fig. 56A), BTU-32 (Fig. 56B), BTU-34 (Fig. 56C) e BTU-38 (Fig. 56D) foram considerados inativos em ensaios *in vitro*, e apresentaram eficiência comparável ao NBPT no solo. **Figura 56**. Estrutura dos derivados benzotiazóis (A) BTU-26; (B) BTU-32; (C) BTU-34; (D) BTU-38.



Fonte: Adaptado de BRITO et al., 2015.

Assim, pôde-se inferir que os ensaios *in vitro* são ferramentas importantes para avaliar o mecanismo de ação de um determinado inibidor de urease, bem como as características estruturais críticas para a formulação de inibidores mais potentes, mas não devem ser as únicas consideradas para selecionar potenciais inibidores de urease de interesse agrícola, sendo os ensaios em solo estritamente importantes.

#### 5.9. Docking molecular

O docking molecular foi realizado utilizando a conformação mais estável dos derivados de julolidinas e urease de Jack bean, cujas melhores conformações de docking foram avaliadas para caracterizar as principais interações no sítio ativo (Fig.57). Para todos os compostos, os resultados mostraram uma semelhança no mecanismo de ligação no sítio ativo, e a orientação do anel tetrahidrofurano desempenha um papel essencial na coordenação envolvendo o par de elétrons livres do átomo de oxigênio do anel de diidrofurano e os íons Ni(II). Assim, o par de elétrons livres do átomo de oxigênio parece ser responsável pela inibição da urease. Além disso, todos os derivados assumem um arranjo conformacional que facilita as interações entre o anel tetrahidrofurano fundido e os resíduos de His593 (ligação de hidrogênio e interações  $\pi$ -alquil para as séries de estereoisômeros **RS11** e **RS12**, respectivamente) e de Asp633 (interação de van der Waals para todos os compostos) (Fig. 57). Observou-se que alterando a estereoquímica dos anéis fundidos, obteve-se maior estabilidade, o que foi devido à formação de diferentes interações adicionais, exceto para interações sigma- $\pi$  envolvendo anel aromático e o resíduo Gln635. A série de estereoisômeros RS11 (Fig. 57A) mostrou ligação de hidrogênio com a cisteína modificada CME592, interação de van der Waals com os resíduos Thr522, His442, His545 e His519, bem como interações  $\pi$ -alquil com os resíduos Ala440 e His407 e o anel aromático. Por outro lado, a série de estereoisômeros RS12 (Fig. 57B) realizou interações de van der Waals com os resíduos His519 e His545, e ligação de hidrogênio entre o anel tetrahidrofurano fundido e o resíduo Ala440. Esses resultados estão de acordo com os parâmetros termodinâmicos (AH e AS) calculados experimentalmente para todos os compostos e com o ensaio de fluorescência síncrona realizado com o derivado **RS12-J2**.

Figura 57. Interações de RS11-J1 (A; ciano), RS11-J2 (A; roxo), RS12-J1 (B; laranja) e RS12-J2 (B; amarelo) com metais Ni e resíduos da urease de *Jack bean*. A conformação de ligação dos ligantes é mostrada na representação em bastão e os dois metais Ni são representados por esferas verdes.



Fonte: disponibilizado pelo Prof. Thiago Aquino (UFAL).

### 5.9.1. Simulações de Dinâmica Molecular

A fim de avaliar as propriedades dinâmicas e a estabilidade do complexo **RS12 - J2** -urease, simulações de dinâmica molecular (MD) foram realizadas usando a posição de docking como as conformações iniciais como referência. O gráfico do desvio quadrático médio (RMSD) para os átomos de C $\alpha$  da espinha dorsal da urease mostrou flutuações entre 0,1 e 0,3 nm, indicando que a presença do ligante não gera alterações significativas na estrutura da proteína (Fig. 58A) (IDRI *et al.*, 2020). Esses resultados foram apoiados pela flutuação quadrática média (RMSF), que mostrou menores flutuações dos resíduos Asp633, CME592, His407, His519 e His545 no sítio ativo (Fig. 58D) (GORHAM; RODRIGUEZ; MORIKIS, 2014). Os valores de RMSD do ligante mostrou desvios muito pequenos (entre 0,05 e 0,1 nm; Fig. 58B), indicando que os resultados de encaixe molecular eram confiáveis, e possuíam alta afinidade de ligação e estabilidade do ligante no sítio ativo após 9 ns de simulação (Fig.59) (LIU; WATANABE; KOKUBO, 2017). Além disso, é mostrado na Fig. 58C a evolução temporal do raio de giração (Rg), que mostra variações entre 3,12 e 3,18 nm, indicando integridade estrutural e compactação da proteína (IDRI *et al.*, 2020). Além disso, os gráficos SASA (350-370 e 5,5-6,0 nm<sup>2</sup> para proteína e ligante, respectivamente) indicam baixa exposição ao solvente, uma melhor acomodação do ligante em um ambiente hidrofóbico e melhor estabilização do complexo formado (Fig. 58E-F). Todos os resultados estão de acordo com ensaios cinéticos e constantes de ligação (K<sub>b</sub>) calculadas experimentalmente (ZHANG & LAZIM, 2017).

**Figura 58**. Gráficos RMSD para os átomos da cadeia principal C $\alpha$  da urease (A) e **RS12-J2** (B). Gráficos Rg do complexo urease (C). Gráficos RMSF para os átomos C $\alpha$  da cadeia principal da urease (D) com numeração do PDB. Gráficos SASA de urease sozinha (E) e **RS12-J2** (F).



Fonte: disponibilizado pelo Prof. Thiago Aquino (UFAL).

**Figura 59.** Instantâneos representativos mostrando poucas mudanças no arranjo espacial do derivado **RS12-J2** em 1 (amarelo) e 15 ns (ciano) no sítio ativo da urease.



Fonte: disponibilizado pelo Prof. Thiago Aquino (UFAL).

### 5.9.2. Cálculos MM-PBSA

Utilizando a trajetória obtida após simulações de MD, foram realizados os cálculos de  $\Delta G_{\text{ligação}}$  pelo método MM-PBSA. Foi observado que o ligante apresentou um valor de energia de ligação adequado (-42,11 kJ mol<sup>-1</sup>) (ANURADHA *et al.*, 2019) Além disso, os valores de energia de van der Waals (-53,79 kJ mol<sup>-1</sup>) indicam que essas forças atrativas dominam o processo de interação ligante-receptor em sítio ativo, quando comparados com os valores das energias eletrostática (0,017 kJ mol<sup>-1</sup>) e de solvatação polar (18,87 kJ mol<sup>-1</sup>).

## 5.10. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que apenas o derivado **RS12-J2** se mostrou um inibidor competitivo. Esse resultado corroborou os ensaios dos estudos biofísicos, nos quais foi identificado que a interação do **RS12-J2** com a urease ocorre nas proximidades do sítio ativo, sendo termodinamicamente favorável e levando a alterações conformacionais na enzima. Além disso, foi observado que o derivado **RS12-J2** apresentou melhor performance quando comparado ao **RS12-J1** nos ensaios usando solo. Nesse sentido, o composto **RS12-J2** apresenta-se como alternativa promissora para aplicação como inibidor de ureases do solo com eficiência equivalente ao NBPT.

# PARTE II. DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS

### 6. RESULTADOS

6.1. Determinação do valor IC<sub>50</sub> para os derivados de aminoácidos

Nesse estudo foram determinados os valores de  $IC_{50}$  para avaliar o potencial dos derivados de aminoácidos em inibir a atividade da urease de *Jack bean*. A partir desses valores foram realizadas a avaliação do potencial dos derivados frente os inibidores clássicos, estudou-se a influência da enantioseletividade e da matéria orgânica no processo de inibição da enzima frente aos derivados de aminoácidos. Ademais, também foram obtidos os valores de K<sub>i</sub>, a partir da equação descrita por Baici (2015).

Nesse sentido, inicialmente, verificou-se que os valores de  $IC_{50}$  (Tabela 6) dos derivados de aminoácidos, tanto na ausência quanto na presença da substância húmica

(SH), foram significativamente menores quando comparados aos inibidores clássicos HU, TU e AA, indicando que os derivados de aminoácidos são mais potentes, nas condições avaliadas. Com relação ao NBPT, foi aplicado o teste - *t* de Student simples para comparar os valores na ausência da SH, sendo observado uma diferença significativa (p < 0,05) a um nível de confiança de 95%, embora sejam valores próximos. Enquanto que na presença da SH, os valores para os derivados de aminoácidos foram significativamente menores quando comparados ao NBPT.

Para avaliar a influência da enantiosseletividade foi empregado o teste - t de Student pareado, considerando as duas condições (ausência e a presença da SH). Nesse sentido, na ausência da SH, observou-se que para os derivados **106 ac-L / D** (p = 0,357 > 0,05) e **110 ac – L / D** (p = 0,482 > 0,05), assim, não houve diferença significativa, a um nível de confiança de 95%, e com isso pôde-se inferir que para esses derivados não se observou influência da enantiosseletividade, enquanto que para os derivados **110 – L / D** (p = 0,0001 < 0,05) houve influência da enantioseletividade. Na presença da SH, foi observado que para todos os pares a enantioseletividade não foi fator de diferenciação, pois, não houve diferença significativa a um nível de confiança de 95% (**106 ac-L / D** (p = 0,800 > 0,05), **110 – L / D** (p = 0,054 > 0,05) e **110 ac – L / D** (p = 0,482 > 0,05).

Para avaliar a influência da matéria orgânica no processo de inibição, empregouse o teste - *t* de Student simples (Tabela 6) para os valores de IC<sub>50</sub> de cada composto na ausência (referência) e presença da SH, sendo observado que para os derivados de aminoácidos e para o inibidor clássico TU não há diferença significativa (p > 0,05) a um nível de confiança de 95%. Portanto, pode-se considerar que não houve influência da matéria orgânica no processo de inibição para esses compostos. Já para os demais inibidores clássicos, houve diferença significativa (p < 0,05) o que indica a influência da presença de matéria orgânica no processo de inibição. Nesse sentido, nota-se que a TU é o único inibidor clássico que não sofre influência da SH no processo de inibição (para concentração avaliada), o que provavelmente está relacionado com a maior similaridade estrutural entre esse inibidor clássico e os derivados, uma vez que, os derivados de aminoácidos avaliados possuem o núcleo da tioureia.

Commonto		IC50		a volon	
Composto	Sem SH	Sem SH Ki Com SH		Ki	p - valor
110-L	$0,\!74\pm0,\!02$	0,0264	$0{,}75\pm0{,}01$	0,0267	0,225
<b>110-D</b>	$0{,}50\pm0{,}02$	0,0178	$0{,}64 \pm 0{,}07$	0,0228	0,074
110 ac-L	$0,\!44 \pm 0,\!01$	0,0157	$0{,}45\pm0{,}04$	0,0160	0,707
110 ac-D	$0,\!43\pm0,\!02$	0,0153	$0{,}47 \pm 0{,}02$	0,0167	0,074
116	$0,\!37\pm0,\!01$	0,0132	$0{,}30\pm0{,}05$	0,0107	0,136
106 ac-L	$0,\!43 \pm 0,\!03$	0,0153	$0,\!36\pm0,\!05$	0,0128	0,136
106 ac-D	$0{,}40\pm0{,}04$	0,0142	$0,\!37\pm0,\!04$	0,0132	0,323
HU	$71,5 \pm 9,0$	2,5511	93,91 ±1,46	3,3506	0,001
TU	$147\pm28$	5,2449	$152 \pm 33$	5,4233	0,838
AA	$7,\!46\pm0,\!78$	0,2661	$18,\!17\pm0,\!83$	0,6483	0,002
NBPT	$0,\!29 \pm 0,\!03$	0,0103	>6,00	>0,2141	

**Tabela 6**. Valores de  $IC_{50}$  e de  $K_i$  dos derivados de aminoácidos e dos inibidores clássicos: Hidroxuireia (HU), Tioureia (TU), Ácido Acetohidroxâmico (AA) e NBPT.

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Considerando que os derivados de aminoácidos possuem núcleo tioureia e desta foram, certa similaridade estrutural com a TU, ao comparar os valores de  $IC_{50}$ , observase que os derivados de aminoácidos foram mais efetivos na inibição da enzima que a TU, indicando um aumento no potencial desse inibidor clássico quando associado às estruturas dos aminoácidos.

Comparando-se com a literatura, foi constatado que os derivados de aminoácidos tiveram menores valores de IC<sub>50</sub> quando comparado aos derivados de ibuprofeno hidrazida com núcleo da tioureia (Fig. 60A) sobre a urease de *Jack bean* em ensaios *in vitro* (IC<sub>50</sub> de 2,96 a 178  $\mu$ M) (SERAJ *et al.*, 2021) e foram maiores do que o derivado de aciltioureia mais ativo 1- (4-clorofenil) -3 palmitoiltioureia) (Fig. 60B) em ensaios de inibição *in vitro* (urease de *Jack bean*) (IC<sub>50</sub> = 0,017  $\mu$ M) (SAEED *et al.*, 2017).

Figura 60. (A) Derivados de ibuprofeno hidrazida e (B) derivado mais ativo de aciltioureia.



Fonte: Adaptado de SERAJ et al., 2021; SAEED et al., 2017.

O inibidor de urease mais conhecido é o ácido aceto-hidroxâmico, que foi aprovado como medicamento. Dessa forma, muitos trabalhos avaliam os valores de  $IC_{50}$  de derivados do ácido acetohidroxâmico, visando obter melhores inibidores com potencial aplicação clínica. Nesse sentido, os derivados de aminoácidos tiveram valores de  $IC_{50}$  maiores quando comparados aos derivados mais ativo de híbridos de diidropirimidina e ácido hidroxâmico (Fig. 61) sobre a enzima urease de *H. pylori*, cujos valores de  $IC_{50}$  foram de 0,082 µM para o composto 1 (2-[[4-(4-cloro fenil)-6-oxo-1,6-di-hidropirimidina-2-il]-amino]-*N*-hidroxiacetamida (com substituinte 4-cloro fenil)) e 0,014 µM para o composto 2(2-[[4-(4-hidroxi fenil)- 6-oxo-1,6-di-hidropirimidina-2-il]-amino]-*N*-hidroxi fenil)- 6-oxo-1,6-di-hidropirimidina-2-il]-

Figura 61. Derivados de diidropirimidina e ácido hidroxâmico.



Fonte: Adaptado de MAMIDALA; BHIMATHATIC; VEMA, 2021.

Considerando a aplicação na agricultura desses derivados de aminoácidos, foi possível comparar os valores de IC<sub>50</sub> calculados com os valores na literatura de derivados de aldeídos fenólicos e benzoiltioureias, que são classes de inibidores de urease bastante estudadas, visando a aplicação no solo. Dessa forma foi observado que os valores de IC<sub>50</sub> dos derivados de aminoácidos foram menores do que o valor de IC<sub>50</sub> do derivado mais ativo de aldeído fenólico: etil 4-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-6-metil-2-tioxo-3,4-di-hidro-1H-pirimidina-5-carboxilato (Fig. 62A) (IC<sub>50</sub> 50  $\mu$ M) frente a urease de *Jack bean* em ensaios *in vitro* (HORTA *et al.*, 2015) e do que o valor de IC<sub>50</sub> do derivado mais ativo de

benzoiltioureia: *N*-carbamotioilbenzamida (Fig. 62B) (IC<sub>50</sub> = 57  $\mu$ M) (TAVARES *et al.*, 2021c, no prelo).Considerando os resultados promissores foram realizados estudos biofísicos do processo de interação para um melhor entendimento do sistema em estudo. **Figura 62**. (A) 4-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-6-metil-2-tioxo-3,4-di-hidro-1H-pirimidina-5-carboxilato e (B) N-carbamotioilbenzamida.



Fonte: Adaptado de HORTA et al., 2015; TAVARES et al., 2021c, no prelo.

#### 6.2. Estudos de interação e parâmetros termodinâmicos

Os estudos de interação entre os derivados de aminoácidos e a urease foram realizados preferencialmente empregando espectroscopia de fluorescência molecular a fim de se obter um melhor entendimento do processo de inibição enzimática destes compostos. Os processos de interação para os derivados **110-L**, **110-D**, **110 ac-L**, **110 ac-D**, **116** foram avaliados a partir da titulação espectrofluorimétrica da enzima (2  $\mu$ M) frente aos ligantes, empregando medidas de fluorescência no estado estacionário. Já para os derivados **106 ac - L** e **106 ac - D**, o processo de interação foi avaliado empregando fluorescência sincronizada, usando um  $\Delta \lambda = 25$  nm ( $\lambda_{em} - \lambda_{ex}$ ). A escolha do  $\Delta \lambda$  foi realizada após a avaliação de vários valores como  $\Delta \lambda$ , sendo selecionado aquele em que a medida de fluorescência do composto puro foi nula, ou muito próxima a nulidade, e o espectro de fluorescência do complexo não foi sobreponível ao espectro da urease pura.

Os espectros de fluorescência molecular da urease na ausência e presença de quantidades crescentes de **110 ac-D** são apresentados Fig. 63A. Perfis semelhantes foram obtidos para os outros compostos (Fig. S6. 1 - Fig. S6. 20, material suplementar).

A urease apresentou uma banda de fluorescência intensa em 335 nm ( $\lambda_{ex} = 280$  nm) (Fig. 63A). A adição de concentrações crescentes do derivado **110 ac-D** levou a uma redução da intensidade de fluorescência, indicando a ocorrência de *quenching*. Além disto, um deslocamento do comprimento de onda de máxima emissão para menores

comprimentos de onda (blue-shift) de 335 para 329 nm foi observado. A redução da intensidade do sinal de fluorescência é atribuída a alterações conformacionais na estrutura da enzima induzidas pela interação com 110 ac-D e o deslocamento para o azul indica que houve uma diminuição da polaridade do microambiente dos resíduos de Trp, ou seja, quando a urease interage com o derivado 110 ac-D, há mudança em sua estrutura de forma que os resíduos de Trp ficam menos expostos ao solvente (LI et al., 2017; ALBANI, 2007). Para o enantiômero 110 ac-L também foi observado um deslocamento para menores comprimentos de onda de 335 para 331 nm (Fig. S6. 7- Fig. S6. 9). Para os derivados 116, 106 ac - L e 106 ac - D foram observados deslocamentos para maiores comprimentos de onda: de 335 para 359 nm, 302 para 309 nm e 302 para 310 nm, respectivamente, indicando um aumento da polaridade dos resíduos de Trp, pelo fato destes estarem mais expostos ao solvente após a interação com os derivados (Fig. S6. 12-Fig. S6. 20). Ademais, não foi observado mudança no máximo comprimento de onda para os derivados 110-L (Fig. S6. 1 – Fig. S6. 3) e 110-D (Fig. S6. 4 – Fig. S6. 6). Assim, para determinar o mecanismo de quenching preferencial analisou-se a variação dos valores da constante de Stern-Volmer (K<sub>SV</sub>) e de velocidade bimolecular difusional (k<sub>a</sub>) calculadas a partir da equação (1) descrita no tópico 5.2, página 83.

Figura 63. (A) Perfil espectral de emissão de urease (2  $\mu$ M) na presença de diferentes concentrações de 110 ac-D a pH 7,4 e 38 °C. (B) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (C) Curva logarítmica dupla para cálculo constante de ligação.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Shu *et al.* (2015) indicaram que valores de  $k_q > 2,0 \times 10^{10}$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> estão associados a ocorrência preferencial de *quenching* estático. Os valores de  $k_q$  obtidos neste estudo variaram de 0,25 a 6,94 ×10<sup>12</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (Tabela 7), confirmando que o processo de interação entre os ligantes e a urease ocorreu por meio de *quenching* estático, caracterizado pela formação de complexo não fluorescente no estado estacionário (SURYAWANSHI *et al.*, 2016). Para avaliar a força de interação entre a urease e os derivados de aminoácidos, foi calculada a constante de ligação (K<sub>b</sub>), de acordo com a equação (2) descrita no tópico 5.2, página 83.

Os valores da constante de ligação obtidos em diferentes temperaturas para o derivado **110-L** variaram de 7,28×10<sup>2</sup> a 6,93×10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>; para o derivado **110-D** de 3,44×10<sup>2</sup> a 8,03×10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>; para o **110 ac-L** de 3,39×10<sup>4</sup> a 1,18×10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>; para o **110 ac-D** de 5,42×10<sup>4</sup> a 2,80×10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>; para o derivado **116** de 9,41×10<sup>5</sup> a 3,01×10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>; para o **106 ac-L** de 2,05 a 9,14×10<sup>5</sup>; para o **106 ac-D** de 2,28 a 34,39×10<sup>5</sup>. Comparando os enantiômeros na temperatura próxima a do organismo humano (38 °C), observa-se que os derivados **106 ac-D** e **110-L** e **110 ac-D** apresentaram maior afinidade de ligação que seus respectivos pares (Tabela 7). Porém, de forma geral, os resultados sugerem que não houve influência da enantiosseletividade no processo de interação, uma vez os valores de K<sub>b</sub> para cada par de enantiômero foram analisados pelo teste ANOVA, one-way, sendo observado valor-*p* > 0,05 (*p* = 0,914 para o par de enantiômeros **110 L-D**), (*p* = 0,492 para o par de enantiômeros **110 ac-L-D**) (*p* = 0,442 para o par de enantiômero **106 ac-L-D**), indicando que os valores são estatisticamente similares a um nível de confiança de 95%.

O valor de *n* variou de 0,74 e 1,50 indicando que as interações entre a urease e os ligantes acontecem na razão de 1:1. Ademais, o derivado **110 ac-D** apresenta valores de K<sub>b</sub> similares ao derivado de julolidina **RS11** (1,16 - 25,9 ×10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>) e aos compostos extraídos de líquen (0,21 - 52,5 ×10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>) (LAGE *et al.*, 2018). Porém foram menores que os derivados os derivados de adultos de Biginelli (0,66 – 8,48 ×10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>) (BRAGA *et al.*, 2019) e maiores que o derivado de benzilisotiocianato natural isolado de *Moringa oleifera* (K<sub>b</sub> =1,80×10<sup>2</sup> M<sup>-1</sup>) (TAVARES *et al.*, 2021c, no prelo).

Os parâmetros termodinâmicos ( $\Delta$ H e  $\Delta$ S) associados ao processo de interação foram determinados a fim de avaliar as principais forças intermoleculares responsáveis pela estabilização do complexo urease-ligantes (Tabela 7) a partir da equação de Van't Hoff, equação (3) descrita no tópico 5.2, página 84. A energia livre de Gibbs ( $\Delta$ G), por sua vez, foi calculada de acordo com a equação (4) descrita no tópico 5.2, página 84.
			Parâmetros de ligação					Parâmetros termodinâmicos		
Compostos	T (°C)	K <sub>SV</sub>		kq	K <sub>b</sub>			ΔG	$\Delta H$	$\Delta S$
		(M <sup>-1</sup> )	1	$(\times 10^{12} \mathrm{M}^{-1} \mathrm{s}^{-1})$	(M <sup>-1</sup> )	n	1	(kJ mol <sup>-1</sup> )	(kJ mol <sup>-1</sup> )	(J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
	22	$2,51 \pm 0,11 \times 10^{3}$	0,9938	0,25	$6{,}93 \pm 0{,}30 {\times}10^4$	$1,\!39\pm0,\!07$	0,9912	- 26,44		
110 T	30	$2,71 \pm 0,11 \times 10^{3}$	0,9946	0,27	$2,19 \pm 0,12 \times 10^{3}$	$0,\!97\pm0,\!03$	0,9972	- 21,24	- 218,1	- 649,8
110 <b>-</b> L	38	$3,12 \pm 0,10 \times 10^{3}$	0,9968	0,31	$7,28 \pm 0,15 \times 10^{2}$	$0,\!82\pm0,\!04$	0,9937	- 16,05		
	22	$2,60 \pm 0,13 \times 10^{3}$	0,9909	0,26	$8{,}03\pm0{,}27{\times}10^4$	$1,\!42 \pm 0,\!07$	0,9931	- 27,57		
110 D	30	$2,68 \pm 0,12 \times 10^{3}$	0,9924	0,27	$4,18 \pm 0,29 { imes} 10^3$	$1,\!05\pm0,\!07$	0,9852	- 21,27	- 260,1	- 788,2
110-D	38	$3,02 \pm 0,13 \times 10^{3}$	0,9932	0,30	$3,44 \pm 0,34 \times 10^{2}$	$0{,}74\pm0{,}08$	0,9615	- 14,96		
	22	$2,24\pm0,10{\times}10^4$	0,9934	2,24	$1,18 \pm 0,09 \times 10^{5}$	$1{,}21\pm0{,}02$	0,9983	- 29,01		
110 ac-L	30	$2,15 \pm 0,09 { imes} 10^4$	0,9944	2,15	$9{,}56 \pm 0{,}09 {\times}10^4$	$1,\!18\pm0,\!02$	0,9983	- 28,19	- 59,1	- 102,0
	38	$2,09 \pm 0,12 \times 10^4$	0,9913	2,09	$3,39 \pm 0,12 \times 10^4$	$1,\!06\pm0,\!03$	0,9962	- 27,37		
	22	$1,69 \pm 0,05 \times 10^4$	0,9972	1,69	$2,80 \pm 0,05 { imes}10^5$	$1,\!34\pm0,\!01$	0,9996	- 30,49		
110 ac-D	30	$1{,}81 \pm 0{,}07 {\times}10^4$	0,9951	1,81	$8{,}53\pm0{,}12{\times}10^4$	$1{,}20\pm0{,}03$	0,9974	- 29,18	- 78,6	- 163,0
	38	$1,99 \pm 0,08 \times 10^4$	0,9938	1,99	$5,42 \pm 0,17 \times 10^4$	$1,14 \pm 0,04$	0,9941	- 27,88		

**Tabela 7**. Parâmetros de ligação e termodinâmico para a interação entre urease e os derivados de aminoácidos.

	22	$6,30 \pm 0,47 {\times} 10^4$	0,9858	6,30	$3,01 \pm 0,14 \times 10^{6}$	$1,\!48\pm0,\!03$	0,9977	- 36,41		
116	30	$6{,}47 \pm 0{,}44 {\times}10^4$	0,9884	6,47	$1,33 \pm 0,15 { imes} 10^{6}$	$1,\!39\pm0,\!03$	0,9970	- 35,89	- 55,6	- 65,1
	38	$6,94 \pm 0,44 { imes}10^4$	0,9899	6,94	$9,41 \pm 0,16 \times 10^5$	$1,\!34\pm0,\!03$	0,9963	- 35,37		
	22	$3,05 \pm 0,21 \times 10^4$	0,9875	3,05	$2,05 \pm 0,53 \times 10^{5}$	$1,\!19\pm0,\!11$	0,9874	-30,17		
106 ac-L	30	$3{,}59 \pm 0{,}19 {\times}10^4$	0,9924	3,59	$5,49 \pm 0,32 \times 10^{5}$	$1,\!26\pm0,\!06$	0,9945	-32,92	71,44	344,47
	38	$3,72 \pm 0,50 \times 10^4$	0,9566	3,72	$9,14 \pm 0,86 { imes}10^5$	$1,\!31\pm0,\!17$	0,9736	-35,68		
	22	$2,28 \pm 0,18 \times 10^4$	0,9868	2,28	$2,28 \pm 1,41 \times 10^5$	$1,\!23\pm0,\!28$	0,9499	-29,94		
106 ac-D	30	$2,\!45 \pm 0,\!13 \!  imes \! 10^4$	0,9911	2,45	$6,35 \pm 0,27 {\times} 10^5$	$1,\!31\pm0,\!05$	0,9901	-34,26	129,06	539,02
	38	$1,92 \pm 0,18{ imes}10^4$	0,9773	1,92	$34,39 \pm 0,67 \times 10^5$	$1,50 \pm 0,13$	0,9839	-38,57		

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

As possíveis interações intermoleculares envolvidas no processo de interação entre urease e os derivados **110-L**, **110-D**, **110 ac-L**, **110 ac-D** e **116** foram as forças de van der Waals e ligações de hidrogênio ( $\Delta H < 0 \ e \ \Delta S < 0$ ); para os derivados **106 ac-L** e **106 ac-D** foram as interações hidrofóbicas ( $\Delta H > 0 \ e \ \Delta S > 0$ ) (ALANAZI & ABDELHAMEED, 2016). Os tipos de interações intermoleculares podem ser justificados pelas estruturas moleculares dos derivados de aminoácidos, uma vez que possuem região hidrofóbica, bem como hidrogênio ligado a nitrogênio, capaz de realizar ligações de hidrogênio.

Os valores negativos de  $\Delta$ S para os derivados **110-L**, **110-D**, **110 ac-L**, **110 ac-D** e **116** indicam uma maior organização dos complexos, o que explica a existência das ligações de hidrogênio e de van der Waals. Para esses sistemas o aumento da temperatura causa uma diminuição nos valores de K<sub>b</sub>, pois o aumento da temperatura tende a tornar os sistemas mais desorganizados, desfavorecendo o processo de interação (DU *et al.*, 2016). O valor positivo de  $\Delta$ S para os sistemas com os derivados **106 ac-L** e **106 ac-D**, indica que esses sistemas estão mais desorganizados, o que é devido ao deslocamento das moléculas de água (solvente) da estrutura da proteína para fora da biomolécula, quando as interações hidrofóbicas são formadas com o ligante. Assim, o aumento da temperatura tende a favorecer esse processo de interação (K<sub>b</sub> aumenta com o aumento da temperatura) (BARAKAT & PATRA, 2013). Por fim,  $\Delta G < 0$ , indicou para todos os sistemas que o processo de interação foi termodinamicamente espontâneo.

Sabe-se que os aminoácidos valina e treonina não possuem carga nos grupos da cadeia lateral (R), uma vez que estes grupos para valina é apolar e para treonina é polar, porém sem carga (CARVALHO *et al.*, 2020). Além disto, nos aminoácidos, em pH fisiológico (aproximadamente 7,4), o grupo carboxila encontra-se dissociado, formando o íon carboxilato, carregado negativamente ( $-COO^{-}$ ), enquanto que o grupo amino estaria protonado ( $-NH_3^+$ ) (IDREE *et al.*, 2020). Porém, quase todos esses grupos carboxila e amino estão combinados nas ligações peptídicas (em proteínas) e, em geral, não estão disponíveis para reações químicas, exceto pela possibilidade de formação de ligações de hidrogênio. Contudo, foi avaliado a influência da força iônica no processo de interação, considerando que a força iônica pode influenciar na atividade, independentemente da carga do composto. A partir dos valores do log K<sub>b</sub> na presença e ausência do NaCl. Os resultados são mostrados na Figura 64 e indicam que não

houve influência da força iônica no processo de interação (p > 0,05) a um nível de confiança de 95%, com exceção de **110-L**, no qual p = 0,014 < 0,05.

**Figura 64.** Avaliação do efeito do NaCl (200 mM) no processo de interação entre urease e derivados de aminoácidos, em pH = 7,4.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

## 6.3. Avaliação de mudanças conformacionais da urease

Quando se compara o gráfico de fluorescência 3D da proteína na presença e na ausência do ligante é possível obter informações mais detalhadas sobre a alteração da conformação da proteína, pelo fato das forças intramoleculares envolvidas na manutenção da estrutura secundária serem alteradas (CHENG, LIU, JIANG, 2013).

No espectro de fluorescência 3D para a urease livre e complexada com **110 ac-D** (Fig. 65) se destacam três picos de emissão: o pico 1 que corresponde ao efeito de dispersão Rayleigh, caracterizada pela reemissão de radiação ( $\lambda_{ex} = \lambda_{em}$ ) da água (solvente) (SANTANA *et al.*, 2019); o pico 2 que corresponde à emissão dos resíduos Trp e Tir excitados a 280 nm; e o pico 3 que corresponde à excitação de estados eletrônicos mais excitados dos resíduos aromáticos presentes na proteína, informando sobre o microambiente destes (BORTOLOTTI, *et al.*, 2016).

Os espectros de fluorescência 3D para os demais derivados estão na Fig. S6. 21. As intensidades de fluorescência dos picos 2 e 3 foram reduzidas em 4 e 56% (**110-L**), 9 e 61% (**110-D**), 46 e 64% (**110 ac-L**), 42 e 63% (**110 ac-D**), e por fim, em 46 e 66% para

o derivado **116** (Tabela 8). Estes resultados indicam que houve mudanças na estrutura nativa da urease evidenciada por mudanças no microambiente dos resíduos de Trp e Tir, causadas pela interação com o ligante **110 ac-D** (GUO *et al.*, 2014)

**Figura 65.** (A) Os espectros de fluorescência tridimensional da urease; (B) Espectro do complexo **110 ac-D** - urease, em pH 7. A enzima e os ligantes foram usados a 2,0 e  $10 \mu$ M, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

	Urease			Urease-110-L			Urease- <b>110-D</b>			
Picos	Posição $(\lambda_{ex} / \lambda_{em})$	Stokes <sup>1</sup> $\Delta\lambda$ (nm)	F (u.a)	$\frac{\text{Posição}}{(\lambda_{ex}/\lambda_{em})}$	Stokes Δλ (nm)	F (u.a)	$\frac{\text{Posição}}{(\lambda_{ex} / \lambda_{em})}$	Stokes Δλ (nm)	F (u.a)	
1	$\lambda_{ex}\!=\!\lambda_{em}$	0	>1000	$\lambda_{ex} \!=\! \lambda_{em}$	0	>1000	$\lambda_{ex}{=}\lambda_{em}$	0	>1000	
2	294/336	44	504 (100%)	294/335	41	484 (96%)	294/336	42	459 (91%)	
3	241/337	96	793 (100%)	241/334	93	355 (44%)	241/333	92	317 (39%)	
	Urease			Urease-110-ac-L			Urease-110-ac-D			
Picos	Posição (λ <sub>ex</sub> / λ <sub>em</sub> )	Stokes Δλ (nm)	F (u.a)	Posição (λ <sub>ex</sub> / λ <sub>em</sub> )	Stokes Δλ (nm)	F (u.a)	Posição (λ <sub>ex</sub> / λ <sub>em</sub> )	Stokes Δλ (nm)	F (u.a)	
1	$\lambda_{ex}\!=\!\lambda_{em}$	0	>1000	$\lambda_{ex} \!=\! \lambda_{em}$	0	>1000	$\lambda_{ex}{=}\lambda_{em}$	0	>1000	
2	294/337	43	504 (100%)	283/336	53	274 (54%)	283/331	48	292 (58%)	
3	241/337	96	793 (100%)	241/334	93	287 (36%)	241/334	93	294 (37%)	
		Urease			Urease-116					
Picos	Posição $(\lambda_{ex} / \lambda_{em})$	Stokes Δλ (nm)	F (u.a)	$\frac{\text{Posição}}{(\lambda_{ex}/\lambda_{em})}$	Stokes Δλ (nm)	F (u.a)				
1	$\lambda_{ex} \!=\! \lambda_{em}$	0	>1000	$\lambda_{ex} \!=\! \lambda_{em}$	0	>1000				
2	294/337	43	504 (100%)	294/354	60	273 (54%)				
3	241/337	96	793 (100%)	241/350	109	276 (34%)				

Tabela 8. Parâmetros de fluorescência tridimensional para urease livre ou na presença dos derivados de aminoácidos.

<sup>1</sup>Deslocamento Stokes ( $\Delta \lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$ ) Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

## 6.4. Estudos de fluorescência sincronizada

A fluorescência sincronizada permite avaliar mudanças na polaridade do microambiente dos resíduos de tirosina e triptofano, e inferir sobre interações preferenciais (BOBONE; VAN DE WEERT; STELL, 2014), sendo usado como parâmetros as constantes de Stern-Volmer (K<sub>SV</sub>) para um  $\Delta\lambda = 15$  nm (Tir) e  $\Delta\lambda = 60$  nm (Trp), sendo o  $\Delta\lambda$  obtido a partir da diferença entre o comprimento de onda de emissão ( $\lambda_{em}$ ) e o comprimento de onda de excitação ( $\lambda_{ex}$ ). Outro parâmetro é a variação no máximo comprimento de onda de emissão ( $\Delta\lambda_{max}$ ) obtida a parti da subtração entre  $\Delta\lambda_{max}$ (urease/ligante) e  $\Delta\lambda_{max}$  (urease livre) (SUN *et al.*, 2010)

A variação no máximo comprimento de onda de emissão ( $\Delta\lambda_{max}$ ) indica mudanças na polaridade da microrregião dos resíduos de Trp e Tir. Para o complexo urease-**110 ac-D** (Fig. 67A-B e Tabela 8) foi observado uma variação para maiores comprimentos de onda para os resíduos de Tir ( $\Delta\lambda_{max} = +15$  nm) e para menores comprimentos de onda para os resíduos de Trp ( $\Delta\lambda_{max} = -7$  nm), indicando aumento da polaridade na microrregião dos resíduos de Tir e diminuição da polaridade para o Trp. Comportamento semelhante foi observado para o derivado **110 ac-L** (Fig, S6.24).

Para os demais derivados (**110-L**, **110-D** e **116**) foi observado uma variação para menores comprimentos de onda pra a Tir, e para maiores comprimentos de onda para o Trp, indicando que houve diminuição na polaridade do microambiente do resíduo de Tir, enquanto que para o Trp houve aumento da polaridade (Fig. S6.22; S6. 23; S6. 25).

Além disto, a constante de Stern-Volmer variou de forma mais significativa para os resíduos de Tir ( $K_{SV} = 42,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) comparado aos de Trp ( $K_{SV} = 25,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) na presença do **110 ac-D** (Tabela 9), o que também foi observado para os derivados **110 ac-**L e **116**, indicando que os mesmos interagem próximo aos resíduos de Tir. Já para os enantiômeros **110-L** e **110-D** foi observado um comportamento oposto, uma vez que as constantes de Stern-Volmer foram maiores para os resíduos de Trp, que podem estar nas posições 495 e 648, ou seja, distantes do sítio catalítico. Portanto, estes compostos interagem preferencialmente distante do sítio ativo. Esse resultado corrobora com o estudo cinético realizado por Carmago e col., 2022, no qual os equivales aos derivados **110-L** e **110-D**, foram classificados como inibidores do tipo misto.

Já os compostos **110 ac-L**, **110 ac-D** e **116** podem atuar como inibidores competitivos, uma vez que há a presença de Tir nas posições 410 e 544, próximo aos principais resíduos de His (posições 409 e 545) conhecidos por coordenar os íons Ni(II)

no sítio ativo da urease de *Jack bean*. Contudo, para esses derivados ainda são necessários estudos cinéticos para uma classificação completa quanto ao tipo de inibição (BRAGA *et al.*, 2019).

Jamil e col. (2013) relataram para os resultados de uma triagem para *N*-3, *N*-3'bis-(dissubstituído)isoftalil-bis-(tioureias) simétricas (Fig. 66), que a presença de um substituinte retirador de elétrons em cada nitrogênio terminal foi um fator crucial na determinação da atividade inibitória dos quatro compostos mais ativos. Sabendo que o grupo acetil (-COCH<sub>3</sub>) é um grupo retirador de elétrons, espera-se que a presença do mesmo possa levar a uma melhora significativa na atividade dos derivados, o que pôde ser observado nos estudos de fluorescência sincronizada, uma vez que os derivados acetilados interagem preferencialmente próximos ao sítio catalítico, enquanto que os derivados não acetilados, interagiram próximos aos resíduos de Trp e, portanto, distantes do sítio ativo, sendo também concordante com os valores das constantes de ligação (K<sub>b</sub>): para os enantiômeros acetilados (**110 ac-L** e **110 ac-D**) a constante de ligação a 38 °C foi na ordem de 10<sup>5</sup>, enquanto que para os enantiômeros não acetilados (**110-L** e **100-D**) foi na ordem de 10<sup>4</sup>.

Figura 66. N-3, N-3'-bis-(dissubstituído)isoftalil-bis-(tioureias) simétricas.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Por fim, outros derivados de tioureia já foram reportados na literatura como inibidores não competitivo ou misto. Brito e col. (2015) a partir de estudos cinéticos sugeriram que os derivados de benzoiltioureia atuavam como inibidores de tipo misto, com valores de K<sub>i</sub> entre 283,7-1776,6  $\mu$ M. (BRITO *et al.*, 2015). Kanwal e col. (2019) observaram que alguns derivados de tioureia da triptamina, atuaram como inibidores

mistos (K<sub>i</sub> =17,4- 20  $\mu$ M) ou não competitivo (K<sub>i</sub> = 11,7 - 21,7  $\mu$ M) (KANWAL *et al.*, 2019). Khan e col. (2014) observaram que a maioria dos derivados de tioureias N, N'-(di) substituídas atuaram como inibidores mistos, com valores de K<sub>i</sub> entre 15,58 - 18,48  $\mu$ M (KHAN *et al.*, 2014).

Na inibição mista, o ligante (inibidor) pode se ligar a uma região da enzima (que não o sítio ativo) sem interferir na ligação do substrato ao sítio catalítico, sendo esses inibidores conhecidos por serem capazes de se ligar à enzima livre (formando um complexo enzima-inibidor) e ao complexo enzima-substrato (formando um complexo enzima-inibidor-substrato) (BRITO *et al.*, 2015).

**Figura 67**. Espectros de fluorescência sincronizada de urease (2,0  $\mu$ M) após adição de concentrações crescentes de **110 ac-D** em pH 7,4, monitorando (A)  $\Delta\lambda = 60$  nm (resíduos de Tir) e (B)  $\Delta\lambda = 15$  nm (resíduos de Tir).



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

 Tabela 9.
 Parâmetros de fluorescência sincronizada para urease na presença dos derivados de aminoácidos.

Composto	$\Delta\lambda^1$	Constante de St	$\Delta \lambda_{max}^2$	
Composio	(nm)	$K_{SV}(10^3 M^1)$	r	(nm)
110 T	15	$1,\!70\pm0,\!15$	0,9804	- 15
110-L	60	$4,53 \pm 0,24$	0,9917	+ 8
110 D	15	$1{,}58\pm0{,}08$	0,9932	- 18
110-D	60	$4,51 \pm 0,22$	0,9938	+ 8
110 og I	15	$80,1 \pm 8,3$	0,9788	+ 14
110 aC-L	60	$32,0 \pm 2,2$	0,9862	- 7
110 og D	15	$42,6 \pm 3,9$	0,9831	+ 15
110 aC-D	60	$25,8 \pm 2,0$	0,9820	- 7
116	15	$62,4 \pm 8,2$	0,9506	- 6
110	60	$22,3 \pm 1,4$	0,9906	+ 11

 $^{1}(\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex})$ 

 $^{2}\Delta\lambda_{max}$ (urease/ligante) -  $\Delta\lambda_{max}$  (urease livre).

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

#### 6.5. Estudos por UV-vis

A espectroscopia por UV-vis foi usada para avaliar a formação do complexo urease- derivados de aminoácidos com base no monitoramento das mudanças estruturais da urease (ABEYDEERA; PERERA; PERER, 2018). A partir do espectro de absorção no UV-vis da urease na ausência e presença do **110 ac-D** (Fig. 68) é possível observar uma banda de maior intensidade, em aproximadamente 201 nm (estrutura  $\alpha$ -hélice da urease), na qual a absorvância diminui à medida que a concentração do ligante aumenta, sendo adicionalmente observado um deslocamento para maiores comprimentos de onda (201 para 205 nm), o que indica mudança na estrutura nativa da enzima (SURYAWANSHI, *et al.*, 2016; WANI et al., 2017).

Ademais, é observado outra banda de menor intensidade em aproximadamente em 280 nm (transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  dos aminoácidos aromáticos), na qual não é observado variações significativas à medida que se adiciona concentrações crescentes dos ligantes (ABEYDEERA; PERERA; PERER, 2018). Vale ressaltar que esse mesmo comportamento foi observado para os demais derivados (Fig. S6. 26). Uma vez que a formação do complexo supramolecular mostrada por UV-vis está relacionada com mudanças no estado fundamental, os resultados evidenciaram a formação do complexo entre urease e derivados de aminoácidos.

**Figura 68**.Espectros de absorção no UV-vis da urease na ausência e presença do derivado 110 ac-D, a pH 7,4.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Por fim, foi avaliada a possibilidade de os derivados de aminoácidos interagirem no sítio ativo considerando a probabilidade de formação de um complexo com cátions de Ni(II), uma vez que o sítio ativo da urease contém dois cátions de Ni(II). Na Fig. 69 temse o espectro do sistema Ni(II) + **110 ac-D**.

**Figura 69**. Espectro de UV-vis do **110 ac-D** (10  $\mu$ M) na presença e ausência de íons Ni(II) (20  $\mu$ M) em pH 7,4.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Dessa forma, foi observado que O sistema Ni(II) + **110 ac-D** (2:1) apresentou maior absorbância do que **110 ac-D** livre, o que também foi observado para os derivados **106 ac-D** (Fig. S6.27F), **110-D** (Fig. S6.27B), **110 ac-L** (Fig. S6.27C). Para os derivados **106 ac-L** (Fig. S6.27E), **110-L** (Fig. S6.27A) e **116** (Fig. S6.27D) a absorvância do espectro do complexo foi menor que a do composto livre. Ademais, a subtração [**110 ac-D**.- Ni(II) - Ni(II)] não levou à sobreposição do espectro do **110 ac-D** livre, indicando que o perfil obtido não era relativo ao efeito aditivo da lei de Beer, indicando a formação do complexo do **110 ac-D** com íons de Ni(II). O mesmo comportamento foi observado para os demais derivados (Fig. S6.27).

#### 6.6. Avaliação do sítio preferencial de interação

Para avaliação do sítio preferencial de ligação entre os derivados de aminoácidos e urease foram utilizados inibidores competitivos como marcadores (hidroxiureia, tioureia, ácido aceto hidroxâmico e NBPT). Dessa forma a avaliação foi feita a partir de uma titulação espectrofluorimétrica na presença e na ausência dos inibidores, sendo usado como parâmetro de avaliação a razão entre as constantes de ligação na presença e na ausência dos competidores ( $K_b' / K_b$ ), onde  $K_b'$  e  $K_b$  são, respectivamente, as constantes de ligação na presença e ausência do competidor. Quando a razão  $K_b' / K_b > 1$  indica que a formação do complexo entre os derivados de aminoácidos e a urease é favorecida. Por outro lado, para a razão  $K_b' / K_b < 1$  ocorre um desfavorecimento da formação do complexo devido à competição entre os ligantes e os inibidores clássicos, provavelmente, pela mesma região, neste caso, o sítio ativo da urease (SANTANA et al., 2019). Os valores da razão para cada derivado de aminoácido estão elencados na Tabela 10, sendo observado que, em geral, a constante de ligação diminuiu na presença dos inibidores ( $K_b'/$  $K_b < 1$ ), sugerindo que os derivados de aminoácidos interagem com o sítio ativo da urease. Porém, o estudo de competição é limitado e não é capaz de diferenciar inibidores competidores de inibidores mistos, sendo necessários estudos clássicos de cinética enzimática para uma melhor elucidação quando ao tipo de inibição.

Tabela 10.	Relação	das co	onstantes	de ligação	o da ure	ase na	ausência	$(\mathbf{K}_{\mathbf{b}})$	e na pr	esença	$(K_b')$	dos
inibidores of	clássicos	da urea	ase.									

Composto	Competitores $(K_b/K_b)$							
Composio	Hidroxiureia	Tioureia	Ácido acetohidroxâmico	NBPT				
110-L	$0,260 \pm 0,009$	$0,\!484 \pm 0,\!018$	$0,061 \pm 0,006$	$0,418 \pm 0,007$				
110-D	$0,065 \pm 0,009$	$0,058 \pm 0,001$	$0,312 \pm 0,001$	$0,356 \pm 0,177$				
110 ac-L	$0,719 \pm 0,073$	$0,036 \pm 0,004$	$0,658 \pm 0,049$	$0,145 \pm 0,002$				
110 ac-D	$0,\!657 \pm 0,\!036$	$0,\!682 \pm 0,\!035$	$0,812 \pm 0,037$	$0,630 \pm 0,045$				
116	$0,059 \pm 0,017$	$0,048 \pm 0,016$	$0,376 \pm 0,070$	$0,890 \pm 0,035$				
106 ac-L	$0,724 \pm 0,112$	$0,704 \pm 0,106$	$0,577 \pm 0,095$	$0,869 \pm 0,063$				
106 ac-D	$0.828 \pm 0.188$	$0.792 \pm 0.158$	$0.576 \pm 0.118$	$0.918 \pm 0.161$				

 $K_b'$  = constante de ligação na presença de 50 µM do inibidor, urease 2 µM e derivados de aminoácidos (10 - 250 µM). Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

#### 6.7. Estudo de transferência de energia ressonante (FRET)

A distância entre o fluoróforo e o ligante foi calculada pela técnica de transferência de energia por ressonância de Föster (FRET). A teoria de Förster afirma que quando o fluoróforo (doador) está perto o suficiente do ligante (receptor), há transferência de energia não radiativa entre as espécies (CAO *et al.*, 2018).

Para tanto se avaliou os seguintes parâmetros: área de sobreposição (J) dos espectros de fluorescência da urease livre e de absorção molecular dos derivados de aminoácidos (Fig 71 e S6.21) calculada pela equação (7) descrita no tópico 5.7 página 93; eficiência de transferência de energia (E), distância crítica de Föster ( $R_0$ ) em que 50%

da energia é transferida para o receptor, obtida pela equação (6) descrita no tópico 5.7 página 92 e, a distância entre o ligante e o fluoróforo ( $r_0$ ) calculada a partir da equação (5) descrita no tópico 5.7 página 92. Esses parâmetros estão apresentados na Tabela 11.

De acordo com os parâmetros da Tabela 11, para todos os derivados de aminoácidos avaliados, a energia transferida (E) foi inferior a 50%, implicando em  $R_0 < r_0$ . Ademais, o valor da distância de  $r_0$  foi menor que 8 nm, indicando que a transferência de energia ocorreu com elevada probabilidade em decorrência do processo de interação (SHU *et al.*, 2015). Os valores de  $r_0$  obtidos para os derivados de aminoácidos foram próximos dos valores obtidos por Braga e col. (2019) para os adultos de Biginelli BA5-S  $r_0 = 2,42$  nm (Fig. 70A) e BA7-S  $r_0 = 2,50$  nm (Fig. 70B).

Figura 70. (A) Derivado BA5-S e (B) BA7-S



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Por fim, analisando os valores do percentual de energia transferida, observa-se uma certa relação com os valores das constantes de ligação, uma vez que tomando uma temperatura fixa, como por exemplo a temperatura de 38 °C, os derivados **110ac L-D**, **116 e 106 ac-L-D** que apresentaram constantes na ordem de  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^5$ , respectivamente, também tiveram maiores percentuais de energia transferida, quando comparado aos derivados **110 L-D**, que apresentaram constates de ligação na ordem de  $10^2$ .

**Figura 71**. Sobreposição dos espectros normalizados de fluorescência da Urease (10  $\mu$ M) que atua como doador (D) de radiação e absorção molecular do **110 ac-D** (20  $\mu$ M) que atua como aceptor em pH 7,4.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

**Tabela 11.** Parâmetros calculados relacionados ao processo de FRET quanto a interação entre urease e derivados de aminoácidos.

Ligante	$J (10^{-15} \text{ cm}^3 \text{ L mol}^{-1})$	E (%)	$R_0(nm)$	$r_0$ (nm)
110-L	0,098	5,73	1,73	2,76
110-D	0,193	6,45	1,94	3,03
110 ac-L	2,07	17,28	2,88	3,74
110 ac-D	1,67	14,91	2,77	3,71
116	9,27	15,77	3,69	4,88
106 ac-L	2,84	14,42	2,04	2,75
106 ac-D	2,98	12,31	2,06	2,86

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

## 6.8. Avaliação do potencial de inibição da urease em amostras de solo

Tendo em vista os resultados promissores nos estudos *in vitro*, foram realizados ensaios diretamente no solo visando a aplicação desses derivados na agricultura para melhorar o desempenho da ureia como fertilizante. Estudos dessa natureza são de grande importância, uma vez que tanto as características físico-químicas quanto a variedade de microrganismos presentes no solo podem afetar o desempenho dos inibidores avaliados de forma a melhorar ou suprimir a eficiência do inibidor, levando a discordâncias com os resultados *in vitro* (BRITO *et al.*, 2015). Para isso, foi usado como parâmetro de avaliação a inibição (%) da atividade (Tabela. 12) que foi calculada de forma relativa, considerando o sistema na ausência do inibidor como 100% da atividade da urease, usando como referência o inibidor clássico NBPT.

	Inibição %						
Composto	<b>S1</b>	S2	<b>S3</b>	<b>S4</b>			
110-L	$83,93 \pm 3,63^{a}$	$83,66 \pm 0,51^{a}$	$89,\!37\pm0,\!78^{\mathrm{a}}$	$90,07 \pm 0,30^{\mathrm{a}}$			
110-D	$85,63 \pm 2,13^{a}$	$82,51 \pm 0,77^{\mathrm{a,c}}$	$89,81 \pm 0,54^{a}$	$89,\!48\pm0,\!20^{\mathrm{a,c}}$			
110 ac-L	$82,89 \pm 2,33^{a}$	$79,69 \pm 0,60^{\mathrm{a,c,d}}$	$85,65 \pm 1,12^{d}$	$87,25 \pm 0,80^{ m a,c,d}$			
110 ac-D	$82,55 \pm 2,50^{a}$	$79,63 \pm 2,59^{\mathrm{a,c,d}}$	$85,07 \pm 0,94^{d}$	$89,93 \pm 0,60^{a,c,d}$			
116	$83,13 \pm 2,47^{a}$	$81,25 \pm 2,31^{\mathrm{a,c,d}}$	$85,96 \pm 0,71^{d}$	$88,08 \pm 1,06)^{\mathrm{a,c,d}}$			
106 ac-L	$69,09 \pm 4,12^{\circ}$	$78,42 \pm 1,21^{c,d}$	$88,\!36\pm0,\!39^{\mathrm{a}}$	$85,\!79\pm0,\!76^{\mathrm{c},\mathrm{d}}$			
106 ac-D	$78,15 \pm 4,14^{a}$	$77,33 \pm 1,47^{d}$	$77,\!30\pm0,\!80^{\rm c}$	$84{,}69\pm0{,}56^{\rm d}$			
NBPT	$23,\!48 \pm 2,\!12^{\mathrm{b}}$	27,43 ±1,61 <sup>b</sup>	$28,91 \pm 0,40^{ m b}$	$39{,}81\pm4{,}35^{\mathrm{b}}$			

**Tabela 12**. Inibição da urease em diferentes amostras de solo na presença de 0,5 mM dos derivados de aminoácidos em comparação com o NBPT.

\*Letras diferentes indicam que há diferença estatística na comparação entre colunas

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

A análise variância (ANOVA, *one-way*) foi feita para verificar o potencial dos compostos testados em comparação com o NBPT, avaliando-se separadamente cada solo. Assim, observa-se que para todos os solos, os derivados diferem estatisticamente do NBPT quanto a inibição das ureases do solo (p < 0,05), ao nível de 95% de confiança, sendo mais potentes quando comparado ao NBPT.

Em se tratando das diferenças estatísticas entre os compostos, observa-se que para o solo S1, todos os derivados, com exceção do **106 ac-L**, apresentaram o mesmo potencial de inibição, uma vez que não diferem entre si (p > 0,05) ao nível de 95 %. Para os solos S2 e S4, os derivados **110-L**, **110-D**, **110 ac-L**, **110 ac-D** e **116**, não diferente entre si, porém o derivado **110-L** difere dos derivados **106 ac-L** e **106 ac-D**, e o derivado **110-D**, difere do derivado **106 ac-D**. Para o solo S3, os derivados **106 ac-L**, **110-L** e **110-D**, não diferem entre si, mas diferem dos demais; o derivado **106ac-D** difere de todos os demais inibidores; os derivados **110 ac-L**, **110 ac-D** e **116** não diferem entre si ao nível de confiança de 95%, mas difere dos demais derivados.

Considerando que os valores de IC<sub>50</sub> para todos os derivados foram próximo e que os valores  $K_b$  obtidos nos estudos biofísicos estão na mesma ordem de grandeza (10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>) para os derivados **110 ac-D**, **106 ac-L** e **106 ac-D**, as diferenças nos valores de inibição estão associadas a aspectos decorrentes da complexa natureza do solo quando comparada ao sistema *in vitro* e cinética clássica do inibidor.

## 6.9. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que os derivados de aminoácidos apresentaram potencial inibição *in vitro* da atividade da urease com valores de IC<sub>50</sub> promissores, não sendo observado de forma geral a influência da matéria orgânica nesse processo. Esse estudo corroborou os estudos biofísicos, uma vez que foi identificado que a interação ocorre próximo ao sítio catalítico, com constantes de ligação que indicaram alta afinidade entre a macromolécula e os ligantes pois, de forma geral,  $K_b \ge 10^5$ , sendo também observado que os derivados apresentam potencial aplicação no solo, uma vez que foram mais potentes que o inibidor clássico NBPT em todos os solos avaliados.

## 7. CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que os compostos analisados (derivados de julolidinas e derivados de aminoácidos) apresentaram inibição da atividade da urease *in vitro*, e em estudos no solo, sendo possíveis inibidores potentes de urease. Ademais não foi observada a influência da enantiosseletividade e da matéria orgânica na atividade dos derivados de aminoácidos.

## 8. PERSPECTIVAS

As principais perspectivas deste trabalho são a realização dos estudos clássicos de inibição cinética para os demais derivados de aminoácidos, para se ter uma melhor elucidação quanto ao tipo de inibição, bem como, aplicar esses derivados em sistemas com *H. pylori*. Além de realizar estudos de modelagem molecular para os derivados de aminoácidos, e de aplicar todos os compostos avaliados em sistemas mais complexos (solo + planta) visando desenvolver um produto.

# REFERÊNCIAS

ABDULWAHAB, H. G *et al.* Novel thiobarbiturates as potent urease inhibitors with potential antibacterial activity: Design, synthesis, radiolabeling and biodistribution study. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 28, 2020.

ABEYDEERA, N.; PERERA, I. C.; PERERA, T. Synthesis, Characterization, and BSA-Binding Studies of Novel Sulfonated Zinc-Triazine Complexes. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, v. 2018, p. 7, 2018.

ABRANCHES, P. A. da S. *et al.* Calix[n]arene-Catalyzed Three-Component Povarov Reaction: Microwave-Assisted Synthesis of Julolidines and Mechanistic Insights. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 83, n.4, p. 1761-1771, jan. 2018.

ALAM, M. A. Methods for Hydroxamic Acid Synthesis. Current organic chemistry, v. 23, p. 978–993, jun. 2019.

ALANAZI, A. M; ABDELHAMEED, A. S. A. A Spectroscopic Approach to Investigate the Molecular Interactions between the Newly Approved Irreversible ErbB blocker "Afatinib" and Bovine Serum Albumin, **PLoS ONE**, v. 11, 2016.

ALBANI, J. R. Principles and applications of fluorescence spectroscopy; Wiley-Blackwell: Oxord, 2007.

AMAN, H. *et al.* Synthesis, density functional theory (DFT) studies and urease inhibition activity of chiral benzimidazoles. **Heliyon**, v. 6, p. e05187, out. 2020.

AMTUL, Z. *et al*. Chemistry and Mechanism of Urease Inhibition. **Curr. Med. Chem.**, v. 9, p. 1323 -1348, 2002.

ANURADHA; PATEL, S.; PATLE, R.; PARAMESWARAN, P.; JAIN, A.; SHARD, A. Design, Computational Studies, Synthesis and Biological Evaluation of Thiazole-Based Molecules as Anticancer Agents. Eur. J. Pharm. Sci., 2019, 134, 20–30.

ARAUJO, D. P. *et al.* Efficient sodium bisulfite-catalyzed synthesis of benzothiazoles and their potential as ureases inhibitors. **RSC Adv.**, v. 5, p. 28814-28821, mar. 2015.

ARIYAEIFAR, M. *et al.* Chiral halogenated Schiff base compounds: green synthesis, anticancer activity and DNA-binding study. **Journal of Molecular Structure**, v. 1161, p. 497-511, jun. 2018.

AVNIR, D. Critical review of chirality indicators of extraterrestrial life. **New Astronomy Reviews**, v. 92, p. 101596, jun. 2021.

AZREENA, K.; SHEVIN, B.; FEROZ, R. A critical view on the analysis of fluorescence quenching data for determining ligand–protein binding affinity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 223, p. 117337, dez. 2019.

BAICI, A. Kinetics of Enzyme-Modifier Interactions – Selected Topics in the Theory and Diagnosis of Inhibition and Activation Mechanisms. Springer, Vienna, 2015. https://www.enzyme-modifier.ch and/or the book

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

BANO, B. *et al.* Synthesis, in vitro urease inhibitory activity, and molecular docking studies of thiourea and urea derivatives. **Bioorganic Chemistry**, v. 80, p. 129–144, out. 2018.

BARAKAT, C.; PATRA, D. Combining time-resolved fluorescence with synchronous fluorescence spectroscopy to study bovine serum albumin-curcumin complex during unfolding and refolding processes. **Luminescence**, v. 28, p. 149-155, 2013.

BARANAUSKIENĖ, L. *et al.* Titration Calorimetry Standards and the Precision of Isothermal Titration Calorimetry Data. **Int J Mol Sci**;v. 10, n.6, p. 2752–2762, jun. 2009.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, A. M. Aspectos gerais da ação dos fármacos. Química medicinal : as bases moleculares da ação dos fármacos. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015, p. 5–13.

BARTH, G. *et al.* Conversion of ammonium to nitrate and abundance of ammoniumoxidizing-microorganism in Tropical soils with nitrification inhibitor. **Soils and Plant Nutrition**, v. 77, n. 4, p. e20180370, jan. 2020.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Enzymes Can Be Inhibited by Specific Molecules. Biochemistry. 5th edition. New York: W H Freeman; 2002. Section 8.5.

BOBONE, S.; VAN DE WEERT, M.; STELL, L. A reassessment of synchronous fluorescence in the separation of Trp and Tyr contributions in protein emission and in the determination of conformational changes. **J. Mol. Struct.**, v. 1077, p. 68-76, 2014.

BOBROWSKI, A. B. *et al.* Reduction of ammonia emissions by using a urease inhibitor in a mechanically ventilated dairy housing system. **Biosystems Engineering**, v. 204, p. 115-129, abr. 2021.

BORKAR, R. M. *et al.* Plasma protein binding, pharmacokinetics, tissue distribution and CYP450 biotransformation studies of fidarestat by ultra high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 102, p. 386-399, jan. 2015.

BORTOLOTTI, A. *et al.* On the purported "backbone fluorescence" in protein threedimensional fluorescence spectra, RSC Adv., v. 6, p.112870-112876, 2016.

BRAGA, T. C. *et al.* Ionic Liquid-assisted Synthesis of Dihydropyrimidin(thi)ones Biginelli Adducts and Investigation of their Mechanism of Urease Inhibition. **New J. Chem.**, v. 43, p. 15187-15200, out. 2019. BREMNER, J. M.; DOUGLAS, L. A. Effects of Some Urease Inhibitors on Urea Hydrolysis in Soils1. **Division S-3—Soil Microbiology And Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 225-226, mar.- abr. 1973.

BRITO, T. O. *et al.* Design, syntheses and evaluation of benzoylthioureas as urease inhibitors of agricultural interest. **RSC Adv**, v.5, n. 55, p. 44507-44515, mai.2015.

CALDAS, L. Q. de A. **Intoxicações exógenas agudas por carbamatos, organofosforados, compostos bipiridílicos e piretróides**. Niterói: Centro de Controle de Intoxicações de Niterói, 2000, 43p.

CALLAHAN, B. P.; YUAN, Y.; WOLFENDEN, R. The burden borne by urease. Journal of the American Chemical Society, v. 127, n. 31, p. 10828–10829, jul. 2005.

CANTARELLA, H. *et al.* Agronomic efficiency of NBPT as a urease inhibitor: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 13, p. 19–27, set. 2018.

CARRARO, M. L. *et al.* Synthesis of New Chiral Derivatives of Xanthones with Enantioselective Effect on Tumor Cell Growth and DNA Crosslinking. **Chemistry Select**, v. 5, n. 33, p. 10285-10291, set. 2020.

CAVA, F. *et al.* Emerging knowledge of regulatory roles of D-Amino acids in Bacteria. Cell. **Mol. Life Sci.**, v. 68, p. 817–831, dez. 2010.

CHAKRABORTY, T.; LEDWANI, L. Research methodology in chemical sciences: experimental and theorical approach Oakville: apple academic press, 2016.

CHAVES-SILVA, S. *et al.* Do schiff bases-based urease inhibitors improve plant growth and affect the activity of soil arginase? **Industrial Crops and Products**, v. 145, p. 111995, mar. 2020.

CHEN, G. *et al.* Advances in MS Based Strategies for Probing Ligand-Target Interactions: Focus on Soft Ionization Mass Spectrometric Techniques. **Front. Chem.**, v. 7, p. 703, out. 2019.

CHEN, H. *et al.* 2.08 - Fragment-Based Drug Design: Strategic Advances and Lessons Learned. Comprehensive Medicinal Chemistry III, p. 212-232, 2017.

CHENG, H. *et al.* Studies on the interaction between docetaxel and human hemoglobin by spectroscopic analysis and molecular docking. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 105, p. 126–132, nov. 2011.

CHENG, Z.; LIU, R.; JIANG, X. Spectroscopic studies on the interaction between tetrandrine and two serum albumins by chemometrics methods. **Spectrochimica Acta Part A:Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 115, p. 92–105, Jun., 2013.

CHOI, H. *et al.* Synthesis of new julolidine dyes having bithiophene derivatives for solar cell. **Tetrahedron**, v. 63, n. 7, p. 1553-1559, fev. 2007.

CHOWDHRY, B. Z.; HARDING, S. E. Protein-Ligand Interactions: hydrodynamics and calorimetry. Oxford University Press, EUA: Practical Approach, 2001.

COELHO, M. M. *et al.* Enantioselectivity in Drug Pharmacokinetics and Toxicity: Pharmacological Relevance and Analytical Methods. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 3113, mai. 2021.

COOPER, G. M. **The Central Role of Enzymes as Biological Catalysts**. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.

CORDERO, I.; SNELL, H.; BARDGETT, R. D. High throughput method for measuring urease activity in soil Soil Biol. **Biochem**., v. 34, p. 72-77, jul. 2019.

DA SILVA, A. P. B. *et al.* **Influência do Tipo de Manejo (Orgânico e Convencional) na Matéria Orgânica de Solos Cultivados com Citros.** Paraná: Atena editora, 2019. E-book. 54 p. DOI: 10.22533/at.ed.126190509. Disponível em: <u>https://www.atenaeditora.com.br/wp-content/uploads/2019/09/E-book-Influencia-do-</u> <u>tipo-de-Manejo-Organico-e-Convencional-na-Materia-Organica-de-Solos-Cultivados-</u> <u>com-Citros.pdf</u>.

DANTAS, M. D. A. *et al.*, Interactions of tetracyclines with ovalbumin, the main allergen protein from egg white: Spectroscopic and electrophoretic studies. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 102, p. 505-514, 2017.

DE PAIVA, W. F. *et al.* Microwave-assisted multicomponent synthesis of julolidines using silica-supported calix[4]arene as heterogeneous catalyst. **Tetrahedron**, v. 75, n. 27, p. 3740-3750, jul. 2019.

DE SOUZA, T. L. *et al.* Ammonia and carbon dioxide emissions by stabilized conventional nitrogen fertilizers and controlled release in corn crop. **Agricultural Science**, v. 41, n. 5, p. 494-510, set. - out. 2017.

DRAG, M.; PAWELCZAK, M.; KAFARSK, P. Stereoselective Synthesis of 1-Aminoalkanephosphonic Acids With Two ChiralCenters and Their Activity TowardsLeucine Aminopeptidase. **Chirality**, v. 15, p. S104–S107, 2003.

DU, X. et al. Insights into protein–ligand interactions: mechanisms, models, and methods. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, p. 144, 2016.

FAN, X. *et al.* The contrasting effects of N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (NBPT) on N<sub>2</sub>O emissions in arable soils differing in pH are underlain by complex microbial mechanisms. **Science of The Total Environment**, v. 642, n. 15, p. 155-167, nov. 2018.

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The future of food and agriculture** – Alternative pathways to 2050, Rome: FAO, 2018, 224p.

FISHBEIN, W. N.; CARBONE, P. P.; HOCHSTEIN, H. D. Acetohydroxamate: Bacterial Urease Inhibitor With Therapeutic Pontential in Hyperammonaemic States. **Nature**, v. 208, n. 5005, p. 46-48, out.1965. FU, Y.; ZHAO, J.; CHEN, Z. Insights into the Molecular Mechanisms of Protein-Ligand Interactions by Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation: A Case of Oligopeptide Binding Protein. **Comput Math Methods Med.**, dez. 2018.

GETAHUN, D. *et al.* Urea Metabolism and Recycling in Ruminants. **Biomed. J. Sci. & Tech. Res.**, v. 20, p. 14790- 14797, mai-jul. 2019.

GHISAIDOOBE, A. B. T.; CHUNGS, S. J. Intrinsic tryptophan fluorescence in the Detection and Analysis of proteins: a focus on forster resonance anergy transfer techniques. **Int. J. Mol. Sci**, v. 15, p. 22518-22538, 2014.

GIL, D.; SUH, B.; KIM, C. A New Reversible Colorimetric Chemosensor Based on Julolidine Moiety for Detecting F–. **Journal of Fluorescence**, ago. 2021.

GORHAM, R.D.; RODRIGUEZ, W.; MORIKIS, D. Molecular Analysis of the Interaction between Staphylococcal Virulence Factor Sbi-IV and Complement C3d. Biophys. J., 2014, 106, 1164–1173.

GOULD, S. E. Urease: an anti-microbial target in bacteria and fungi. *In*: Scientific American. **Lab Rat**, 20 jul. 2014. Disponível em: https://blogs.scientificamerican.com/lab-rat/urease-an-anti-microbial-target-in-bacteria-and-fungi/.

GRAZIANO, G. Inhibiting the inhibitor. **Nature Reviews Chemistry**, v. 3, p. 671, out. 2019.

GUO, X., et al. A spectroscopic study on the interaction between p-nitrophenol and bovine serum albumin. **Journal of luminescence**, v.149, p.353–360, mai. 2014.

GUO, W-B. *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of ligustrazine - betulin amino-acid/dipeptide derivatives as anti-tumor agentes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, p. 111839, jan. 2020.

HASNAIN, S. S.; PIGGOTT, B. An EXAFS study of jack bean urease, a nickel metalloenzyme. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 112, n. 1, p. 279–283, abr. 1983.

HOCHREITER, B. *et al.* Advanced FRET normalization allows quantitative analysis of protein interactions including stoichiometries and relative affinities in living cells. **Sci. Rep.**, v. 9, p. 8233, 2019.

HORTA, L. P. *et al.* Urease Inhibitors of Agricultural Interest Inspired by Structures of Plant Phenolic Aldehydes. J. Braz. Chem. Soc., v. 27, p. 1512-1519, ago. 2016.

IDREE, M. *et al.* Multimodal Role of Amino Acids in Microbial Control and Drug Development. **Antibiotics** v. 9, n. 6, p. 23, jun. 2020.

IDRIS, M.O.; YEKEEN, A.A.; ALAKANSE, O.S.; DUROJAYE, O.A. Computer-Aided Screening for Potential TMPRSS2 Inhibitors: A Combination of Pharmacophore Modeling, Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation Approaches. J. Biomol. Struct. Dyn., 2020, 1–19.

ISHII, K.; NODA, M.; UCHIYAMA, S. Mass spectrometric analysis of protein–ligand interactions. **Biophys Physicobiol**, v. 13, p. 87-95, jul. 2016.

JAMIL, M. M. *et al.* Synthesis, characterization, antibacterial and urease inhibition studies of some novel symmetrical N3, N3-bis-(disubstituted)isophthalyl-bis-(thioureas). **Asian. J. Chem.**, v. 25, n. 10, p. 5328-5332, abr. 2013.

JI. Y.; DAI, F.; ZHOU, B. Developing a julolidine-fluorescein-based hybrid as a highly sensitive fluorescent probe for sensing and bioimaging cysteine in living cells. **Talanta**, v. 197, p. 631-637, mai. 2019.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R.; J. Mol. Biol. 1997, 267, 727

JUAREZ, G. E.; MATEYCA, C.; GALVAN, E. M. Proteus mirabilis outcompetes Klebsiella pneumoniae in artificial urine medium through secretion of ammonia and other volatile compounds. **Heliyon**, v. 6, n. 2, p. e03361, fev. 2020.

KAFARSKI, P.; TALMA, M. Recent advances in design of new urease inhibitors: A review. Journal of Advanced Research, v. 13, p. 101–112, set. 2018.

KANG, K. Y. *et al.* Genotoxicity and acute toxicity evaluation of the three amino acid additives with Corynebacterium glutamicum biomass. **Toxicology Reports**, v. 7, p. 241-253, jan. 2020.

KANWAY, *et al.* Syntheses, in vitro urease inhibitory activities of urea and thiourea derivatives of tryptamine, their molecular docking and cytotoxic studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 83, p. 595-610, mar. 2019.

KAPPAUN, K. *et al.* Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – A review. Journal of Advanced Research, v. 13, n. 28, p. 3–17, mai. 2018.

KHAN, K. M. *et al.* Synthesis and in vitro urease inhibitory activity of N,N'disubstituted thioureas. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 74, n. 3, p. 314-323, mar. 2013.

KOBASHI, K. *et al.* Inhibition of Urease Activity by Hydroxamic Acid Derivatives of Amino Acids. **The Journal of Biochemistry**, v. 77, n. 4, p. 837–843 abr. 1975.saee

KONIECZNA, I. *et al.* Bacterial Urease and its Role in Long-Lasting Human Diseases. **Current Protein & Peptide Science**, v. 13, n. 8, p. 789–806, dez. 2012.

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

KROL, D. J. *et al.* Nitrogen fertilisers with urease inhibitors reduce nitrous oxide and ammonia losses, while retaining yield in temperate grassland. **Science of the Total Environment**, v. 725, n. 10, p. 138329, jul. 2020.

KUDDUS, M. Chapter 1 - Introduction to Food Enzymes. Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects, 2019, 18p.

KUMARI, R.; KUMAR, R.; LYNN, A. G\_mmpbsa — A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations. J. Chem. Inf. Model., 2014, 54, 1951–1962.

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

LASKOWSKI, R.A.; MACARTHUR, M.W.; MOSS, D.S.; THORNTON, J.M. PROCHECK: A Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. J. Appl. Crystallogr., 1993, 26, 283–291

LEE, J.A. *et al.* MIFlowCyt: the minimum information about a Flow Cytometry Experiment. **Cytometry Part A**. v. 73A, p. 926-930, out. 2008.

LI, T.; CHENG, Z.; CAO, L.; JIANG, X. Comparison of interactions between three food colorants and BSA. **Food Chem.**, v. 194, p. 740 – 748, 2016.

LI, W. *et al.* A comparison of the efficiency of different urease inhibitors and their effects on soil prokaryotic community in a short-term incubation experiment. **Geoderma**, v. 354, p. 113877, nov. 2019.

LI, W.Y. *et al.* N-monoarylacetothioureas as potent urease inhibitors: synthesis, SAR, and biological evaluation. Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry, v. 35, n. 1, p. 404–413, dez. 2020.

LIU, Q. *et al*. Arylamino containing hydroxamic acids as potent urease inhibitors for the treatment of Helicobacter pylori infection. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 156, n. 5, p. 126-136, ago. 2018.

LIU, K.; WATANABE, E.; KOKUBO, H. Exploring the Stability of Ligand Binding Modes to Proteins by Molecular Dynamics Simulations. J. Comput. Aided. Mol. Des., 2017, 31, 201–211.

MABEKU, L. K. B.; NGAMGA, M. N. L.; LEUNDJI, H. Potential risk factors and prevalence of Helicobacter pylori infection among adult patients with dyspepsia symptoms in Cameroon. **BMC Infect. Dis**., v.18, p. 278, jun. 2018.

MADRAKIANN, T. *et al.* Spectroscopic and molecular docking techniques study of the interaction between oxymetholone and human serum albumin. **J. Lumin**. v. 155, p. 218–22, 2014.

MAMIDALA, R.; BHIMATHATIC, S. R. S.; VEMA, A. Discovery of Novel Dihydropyrimidine and hydroxamic acid hybrids as potent Helicobacter pylori Urease inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 114, p. 105010, set. 2021.

MARQUES, P. R. B. DE O.; YAMANAKA, H. Biosensors based on the enzymatic inhibition process. **Quím. Nova**, v. 31, set. 2008.

MarvinSketch, version 20.3; ChemAxon Ltd., United States, 2020.

MATHIALAGAN, R. *et al.* Evaluation of Allicin as Soil Urease Inhibitor. **Procedia Engineering**, v. 184, p. 449 – 459, nov. 2017.

(a) MARTÍNEZ-GÓMEZ, M. A. *et al.* Enantiomeric quality control of antihistamines in pharmaceuticals by affinity electrokinetic chromatography with human serum albumin as chiral selector. **Analytica Chimica Acta**., v. 592, n. 2, p. 202-209, jun. 2007.

(b)MARTÍNEZ-GÓMEZ, M. A. *et al*.Evaluation of enantioselective binding of antihistamines to human serum albumin by ACE. Electrophoresis, v. 28, p. 2635–2643, mar. 2007.

MAZZEI, L; MUSIANI, F.; CIURLI, S. The structure-based reaction mechanism of urease, a nickel dependent enzyme: tale of a long debate. **JBIC**, v. 25:829–845, 2020

MEHRANFAR, F. *et al.* Spectrofluoremetric and molecular docking study on the interaction of bisdemethoxycurcumin with bovine  $\beta$ -casein nanoparticles. **J. Lumin.** v. 143, p. 687–692, 2013.

MINEI, P. *et al.* Molecular Rotors with Aggregation-Induced Emission (AIE) as Fluorescent Probes for the Control of Polyurethane Synthesis. **Chemosensors**, v. 9, n. 1, 2021.

MITRA, P. *et al.* Identification of modes of interactions between 9-aminoacridine hydrochloride hydrate and serum proteins by low and high resolution spectroscopy and molecular modeling. **RSC Adv.**, v. 6, p. 53454-53468, mai. 2016.

MOBLEY, H. L.T.; MENDZ, G. L.; HAZELL, S. L. Helicobacter pylori: Physiology and Genetics. Washington (DC): ASM Press; 2001. Part IV, Physiology and Molecular Biology.

MODOLO, L. V. *et al.* A minireview on what we have learned about urease inhibitors of agricultural interest since mid-2000s. **Journal of Advanced Research**, v. 13, p. 29–37, set. 2018.

MODOLO, L. V. *et al.* An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 1, p. 35–44, jan. 2015.

NEESE, F. The ORCA Program System. WIREs Comput. Mol. Sci., 2012, 2, 73-78.

NGUYEN, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Chiral Drugs: An Overview. **Int J Biomed Sci.**, v. 2, n. 2 p. 85-100, jun. 2006.

OLIVEIRA, F. M. *et al.* Synthesis, Molecular properties and DFT studies of new phosphoramidates as potential urease inhibitors. **Med. Chem. Res.**,v. 23, p. 5174 -5187, 2014.

OLOFSSON, G.; LOH, W. On the use of titration calorimetry to study the association of surfactants in aqueous solutions. J. Braz. Chem. Soc., v. 20, n. 4, 2009.

PAGONI, A. *et al.* Covalent Inhibition of Bacterial Urease by Bifunctional Catechol-Based Phosphonates and Phosphinates. **J. Med. Chem.**, v. 64, n. 1, 404–416, dez. 2021.

PANDYA, N. *et al.* DNA Binding, Antioxidant Activity, and DNA Damage Protection of Chiral Macrocyclic Mn(III) Salen Complexes. **Chirality**, v. 4, n. 12, p. 1063-1073, dez. 2012.

PAPATHEODOROU, E. M.; MARGARITI, C.; VOKOU, D. Effects of the two carvone enantiomers on soil enzymes involved in the C, P, and N cycles. Journal of **Biological Research-Thessaloniki**, v. 21, n. 7, mai. 2014.

PATZOLD, R.; BRUCKNER, H. Chiral separation of amino acids by gas chromatography. Journal of Chromatography Library, v. 70, p. 98–118, 2005.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; J. Comput. Chem. 2004, 25, 1605.

PILOTO, A. M. *et al.* Photoinduced Release of Neurotransmitter Amino Acids from Coumarin-Fused Julolidine Ester Cages. **Eur. J. Org. Chem.**, v. 2013, n. 34, p. 7715-7723, dez. 2013.

PRIETO-MARTÍNEZ, F. D.; ARCINIEGA, M.; MEDINA-FRANCO, J. L. Molecular docking: current advances and challenges. **Revista especializada en ciencias químico-biológicas**, v. 28, n. 1, mai. 2018.

QIAN, N.; KOACH, I. M. Febs Lett, v. 336, p. 215-228, 1993

RAFIQ, K. *et al.* New amino acid clubbed Schiff bases inhibit carbonic anhydrase II,  $\alpha$ -glucosidase, and urease enzymes: in silico and in vitro. **Medicinal Chemistry Research**, v. 30, p.712–728, jan. 2021.

RAMSAY, R. R.; TIPTON, K. F. Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase Inhibitory **Drugs. Molecules**, v. 7, p. 1192, jul. 2017.

REGO, Y. F. *et al.* A review on the development of urease inhibitors as antimicrobial agents against pathogenic bacteria. **Journal of Advanced Research**, v. 13, p. 69-100, set. 2018.

REZAEI, E. B. *et al.* Design, synthesis, and evaluation of metronidazole-1,2,3-triazole derivatives as potent urease inhibitors. **Chemical Papers**, v. 75, p. 4217–4226, 2021.

RUTHROF, K. X. *et al.* Transitioning from phosphate mining to agriculture: Responses to urea and slow-release fertilizers for Sorghum bicolor. **Science of The Total Environment**, v. 625, n. 1, p. 1–7, jun. 2018.

SABOURY, A. A. A Review on the Ligand Binding Studies by Isothermal Titration Calorimetry. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 3, n. 1, p. 1-21, mar.2006.

SAEED, A. *et al.* Iminothiazoline-Sulfonamide Hybrids as Jack Bean Urease Inhibitors; Synthesis, Kinetic Mechanism and Computational Molecular Modeling. **Chem. Biol. Drug. Des.**, v. 87, p. 434–443, mar. 2016.

SAEED, A. *et al.* Jack Bean Urease Inhibitors, and Antioxidant Activity Based on Palmitic acid Derived 1-acyl-3- Arylthioureas: Synthesis, Kinetic Mechanism and Molecular Docking Studies. **Drug Research**, v. 67, n. 10, p. 596-605, jul. 2017.

SAEED, A. *et al.* Synthesis, molecular docking studies, and in vitro screening of sulfanilamide-thiourea hybrids as antimicrobial and urease inhibitors. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, p.3653–3662, 2013.

SAEIDIFAR, M.; MANSOURI-TORSHIZI, H.; SABOURY, A.A. Biophysical study on the interaction between two palladium (II) complexes and human serum albumin by Multispectroscopic methods. **Journal of Luminescence**, v. 167, p. 391-398, Jul., 2015.

SALAR, U. *et al.* Biology-oriented drug synthesis (BIODS): In vitro b-glucuronidase inhibitory and in silico studies on 2-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)ethyl aryl carboxylate derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 125, p. 1289-1299, jan. 2017.

SALIH, B. A. Helicobacter pylori Infection in Developing Countries: The Burden for How Long?. **Saudi J Gastroenterol**, v. 3, n. 3, p. 201–207, jul. 2009.

SALMASO, V.; MORO, S. Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. **Front. Pharmacol.**, v. 9, p. 923, aug. 2018.

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

SANTOS, J. C. N. *et al.*, Thimerosal changes protein conformation and increase the rate of fibrillation in physiological conditions: Spectroscopic studies using bovine serum albumin (BSA), **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 113, p. 1032-1040, 2018.

SARMA, H.; MATTAPARTHI, V.S.K. Structure-Based Virtual Screening of High-Affinity ATP-Competitive Inhibitors Against Human Lemur Tyrosine Kinase-3 (LMTK3) Domain: A Novel Therapeutic Target for Breast Cancer. Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci., 2019, 11, 527–541 SERAJ, F. *et al.* Biology-oriented drug synthesis (BIODS), in vitro urease inhibitory activity, and in silico studies on ibuprofen derivatives. Molecular Diversity, v. 25, p. 143–157, 2021.

SERWAR, M. *et al.* Synthesis, urease inhibition and antimicrobial activities of some chiral 5-aryl-4-(1-phenylpropyl)-2H-1,2,4-triazole-3(4H)-thiones. Arkivoc, p 210-221, 2009.

SHAW, W. H. R. *et al.* The Inhibition of Urease by Various Metal Ions. J. Am. Chem. Soc., v. 76, n.8, p. 2160-2163, abr. 1954.

SHI. J-H.*et al.* Characterization of interaction between isoliquiritigenin and bovine serum albumin: spectroscopic and molecular docking methods. **J Lumin**, v. 145, p. 643–650, 2014.

SHU, Y. *et al.* Interaction of erucic acid with bovine serum albumin using a multispectroscopic method and molecular docking technique. **Food Chem**. v.173, p.31–37, 2015.

SICAK, Y. *et al.* Synthesis, characterization, urease inhibitory and tyrosinase inhibitory activities of some chiral pyrazolo derivatives. **J. Ong. Chem. Res.**, v. 3, n. 1, p. 32-49, dez. 2017.

SILVA, A. P. B. Influência do tipo de manejo (orgânico e convencional) na matéria orgânica de solos cultivados com citros [recurso eletrônico] / Amanda Paulina Bezerra da Silva... [et al.]. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019. ISBN 978-85-7247-612-6. DOI 10.22533/at.ed.126190509

SILVA, B. *et al.* Chiral Resolution and Enantioselectivity of Synthetic Cathinones: A Brief Review. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 42, n. 1, p. 17-24, jan. 2018.

SILVA, M. M. *et al.* Interaction between bioactive compound11a-N-tosyl-5-deoxipterocarpan (LQB-223) and Calf thymus DNA:Spectroscopic approach, electrophoresis and theoretical studies. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 96, p. 223–233, 2017.

SKINNER, A. L.; LAURENCE, J. S. High-Field Solution NMR Spectroscopy as a Tool for Assessing Protein Interactions with Small Molecule Ligands. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 11, nov. 2008,

SURYAWANSHI, V. D. *et al.* Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. **J. Pharm. Anal.**, v.6, p. 56-63, 2016.

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

TAN, M. *et al.*, Fluorescence Spectroscopy Study on the Interaction between Evodiamine and Bovine Serum Albumin, J. Chem., v. 2013, 2012

TAVARES, M. C. *et al.* Paper-based analytical device with colorimetric detection for urease activity determination in soils and evaluation of potential inhibitors. **Talanta**, v. 230, p. 122301, ago. 2021a.

TAVARES, M. C. *et al.* The influence of N-alkyl chain in benzoylthioureas in the urease inhibition: exploring biophysical, theoretical and soil studies in the mechanism evaluation, 2021b.

TAVARES, M. C. *et al.* Interaction and inhibition mechanism of urease in vitro and soil system by a natural benzylisothiocyanate isolated from Moringa oleífera, 2021c.

TEGONI, M. *et al.* Succinylhydroxamic derivatives of  $\alpha$ -amino acids as MMP inhibitors. Study of complex-formation equilibria with Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, v. 98, n. 2, p. 209-218, fev. 2004.

TIAN, Z. *et al.* Spectroscopic study on the interaction between mononaphthalimide spermidine (MINS) and bovine serum albumin (BSA). J. Photoch. Photobio. B., v. 142, p. 103-109, Jan, 2015.

TRNKOVÁ, L. *et al.* Study on the interaction of catechins with human serum albumin using spectroscopic and electrophoretic techniques. **Journal of Molecular Structure**, v. 985, p. 243-250, jan. 2011.

TURNER P. J.; XMGRACE, version 5.1.19; Center for Coastal and Land-Margin Research, Oregon Graduate Institute of Science and Technology, Beaverton, OR, USA, 2005.

UTEMBE, W. Chirality, a neglected physico-chemical property of nanomaterials? A mini-review on the occurrence and importance of chirality on their toxicity. **Toxicology Letters**, v. 311, p. 58-65, set. 2019.

VALE, N. *et al.* Amino Acids in the Development of Prodrugs. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2318, set. 2018.

VAREJÃO, J. O. S.; VAREJÃO, E. V. V.; FERNANDES S. A. Synthesis and Derivatization of Julolidine: A Powerful Heterocyclic Structure. Eur. J. Org. Chem., v. 2019, n. 27, p., 4273–4310, jul. 2019.

VIANNA, J. S. *et al.* Drug Resistance In Helicobacter Pylori. **Arq. Gastroenterol**, v. 53, n. 4, out-dez. 2016.

WAHID, S. *et al*. Atenolol thiourea hybrid as potent urease inhibitors: Design, biologyoriented drug synthesis, inhibitory activity screening, and molecular docking studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 94, jan. 2020.

WANG, Y.; ZHANG, G.; ZHANG, H. Study on the Interaction of Pentachlorophenol with Urease in Aqueous Solution by Multiple Spectroscopic Techniques. J. Solution Chem., v. 40, p. 458-469, 2011.

WANI, T. A. *et al.* Study of binding interaction of rivaroxaban with bovine serum albumin using multi-spectroscopic and molecular docking approach. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 134, p. 11-134, dec. 2017.

XIA, Z. *et al.* A julolidine-fused anthracene derivative: synthesis, photophysical properties, and oxidative dimerization. **RSC Adv**., v. 8, p. 13588–13591, abr. 2018.

YAMASAKI, K.; CHUANG, V. T. G.; MARUYAMA, T.; OTAGIRI, M. Albumin-drug interaction and its clinical implication. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1830, n. 12, p. 5435-54433, dez. 2013.

ZHANG, D.; LAZIM, R. Application of Conventional Molecular Dynamics Simulation in Evaluating the Stability of Apomyoglobin in Urea Solution. Sci. Rep., 2017, 7, 44651

ZHANG, J. *et al.* Biochemical characterization of an enantioselective esterase from Brevundimonas sp. LY-2. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 112, jun. 2017.

ZHANG, P. *et al.* Multispectroscopic and molecular modeling approach to investigate the interaction of diclofop-methyl enantiomers with human serum albumin. **J. Lumin**., v. 155, p. 231-237, nov. 2014.

ZHANG, Y. B. *et al.* Matrine-Type Alkaloids from the Roots of Sophora flavescens and Their Antiviral Activities against the Hepatitis B Virus. **Nat. Prod.**, v. 81, n. 10, p. 2259–2265, out. 2018.

ZHU, B. *et al.* Enantioselective separation of eight antihistamines with  $\alpha_1$ -acid glycoprotein-based chiral stationary phase by HPLC: Development and validation for the enantiomeric quality control. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 176, p. 112803, nov. 2019.

ZINN, N. *et al.* Mass spectrometry approaches to monitor protein-drug interactions. **Methods**, v. 4, p. 430-40, aug. 2012.

# APÊNDICES

**Figura S5 1**. (D1) Perfil espectral de emissão de urease (2 μM) na presença de diferentes concentrações de **RS11-J1** a pH 7,4 e 22 °C. (D2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (D3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação



**Figura S5 2.** (E1) Perfil espectral de emissão de urease (2  $\mu$ M) na presença de diferentes concentrações de **RS11-J1** a pH 7,4 e 30 °C. (E2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (E3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.







**Figura S5 4**. (G1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de **RS11-J2** a pH 7,4 e 22 °C. (G2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (G3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.









**Figura S5 6**. (I1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de **RS11-J2** a pH 7,4 38 °C. (I2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (I3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.






**Figura S5 8**. (K1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de **RS12-J1** a pH 7,4 30 °C. (K2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (K3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.











**Figura S5 11**. (N1) Perfil espectral de emissão de urease (2  $\mu$ M) na presença de diferentes concentrações de **RS12-J2** a pH 7,4 30 °C. (N2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (N3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.

3 S4
4 14
6.03
38 38
3 21
3
63
) 12
4

Tabela S4 1. Características fisicoquímicas das amostras de solo usadas (S1, S2, S3, S4).

Fonte: Tavares et al., 2021



**Figura S6. 1**.( D1) Perfil espectral de emissão de urease (2  $\mu$ M) na presença de diferentes concentrações de **110-L** a pH 7,4 e 22 °C. (D2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (D3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.

Figura S6 1



**Figura S6 2**. (E1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de **110-L** a pH 7,4 e 30 °C. (E2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (E3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.



**Figura S6 3**. (F1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de **110-L** a pH 7,4 e 38 °C. (F2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (F3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação



**Figura S6 4**. (G1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de **110-D** a pH 7,4 e 22 °C. (G2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (G3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.



**Figura S6 5**. (H1) Perfil espectral de emissão de urease (2  $\mu$ M) na presença de diferentes concentrações de 110-D a pH 7,4 e 30 °C. (H2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (H3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.

**Figura S6 6**. (I1) Perfil espectral de emissão de urease (2  $\mu$ M) na presença de diferentes concentrações de 110-D a pH 7,4 e 38 °C. (I2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (I3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.



**Figura S67**. (J1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de **110 ac-L** a pH 7,4 e 22 °C. (J2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (J3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.



**Figura S6 8**. (K1) Perfil espectral de emissão de urease (2 µM) na presença de diferentes concentrações de **110 ac-L** a pH 7,4 e 30 °C. (K2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (K3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.



**Figura S6 9**. (L1) Perfil espectral de emissão de urease (2  $\mu$ M) na presença de diferentes concentrações de 110 ac-L a pH 7,4 e 38 °C. (L2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (L3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.



Figura S6 10. (M1) Perfil espectral de emissão de urease (2  $\mu$ M) na presença de diferentes concentrações de 110 ac-D a pH 7,4 e 22 °C. (M2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (M3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.



**Figura S6 11**. (N1) Perfil espectral de emissão de urease (2  $\mu$ M) na presença de diferentes concentrações de **110 ac-D** a pH 7,4 e 30 °C. (N2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (N3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.





**Figura S6 12**. (O1) Perfil espectral de emissão de urease (2  $\mu$ M) na presença de diferentes concentrações de **116** a pH 7,4 e 22 °C. (O2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (O3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.



**Figura S6 13**. (P1) Perfil espectral de emissão de urease (2  $\mu$ M) na presença de diferentes concentrações de **116** a pH 7,4 e 30 °C. (P2) Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (P3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.

Figura S6 14. (Q1) Perfil espectral de emissão de urease (2  $\mu$ M) na presença de diferentes concentrações de 116 a pH 7,4 e 38 °C. (Q2). Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (Q3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.



Figura S6 15. (R1) Perfil espectral de emissão de urease (2  $\mu$ M) na presença de diferentes concentrações de 106 ac-L a pH 7,4 e 38 °C. (R2). Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (R3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.



Figura S6 16. (S1) Perfil espectral de emissão de urease (2  $\mu$ M) na presença de diferentes concentrações de 106 ac-L a pH 7,4 e 38 °C. (S2). Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (S3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.



Figura S6 17. (T1) Perfil espectral de emissão de urease (2  $\mu$ M) na presença de diferentes concentrações de 106 ac-L a pH 7,4 e 38 °C. (T2). Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (T3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.



Figura S6 18. (U1) Perfil espectral de emissão de urease (2  $\mu$ M) na presença de diferentes concentrações de 106 ac-D a pH 7,4 e 38 °C. (U2). Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (U3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.



Figura S6 19. (V1) Perfil espectral de emissão de urease (2  $\mu$ M) na presença de diferentes concentrações de 106 ac-D a pH 7,4 e 38 °C. (V2). Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (V3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.



Figura S6 20. (X1) Perfil espectral de emissão de urease (2  $\mu$ M) na presença de diferentes concentrações de 106 ac-D a pH 7,4 e 38 °C. (X2). Gráfico de supressão de Stern-Volmer. (X3) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação.



**Figura S6 21**. Os espectros de fluorescência tridimensional da urease na presença do: (C) **110-L**); (D) **110-D**; (E) **110 ac-L**; (F) **116**) em pH 7,4. A enzima e os ligantes foram usados a 2,0 e  $10 \mu$ M, respectivamente.



**Figura S6 22**. Espectros de fluorescência sincronizada de urease (2,0  $\mu$ M) após adição de concentrações crescentes de **110- L** em pH 7,4, monitorando (C)  $\Delta\lambda$  igual a 60 nm (resíduos de Tir) e (D)  $\Delta\lambda$  igual a 15 nm (resíduos de Tir).



**Figura S6 23**. Espectros de fluorescência sincronizada de urease (2,0  $\mu$ M) após adição de concentrações crescentes de **110- D** em pH 7,4, monitorando (E)  $\Delta\lambda$  igual a 60 nm (resíduos de Tir) e (F)  $\Delta\lambda$  igual a 15 nm (resíduos de Tir).



**Figura S6 24.** Espectros de fluorescência sincronizada de urease (2,0  $\mu$ M) após adição de concentrações crescentes de **110 ac-L** em pH 7,4, monitorando (G)  $\Delta\lambda$  igual a 60 nm (resíduos de Tir) e (H)  $\Delta\lambda$  igual a 15 nm (resíduos de Tir).

•



**Figura S6 25**. Espectros de fluorescência sincronizada de urease (2,0  $\mu$ M) após adição de concentrações crescentes de **116** em pH 7,4, monitorando (I)  $\Delta\lambda$  igual a 60 nm (resíduos de Tir) e (J)  $\Delta\lambda$  igual a 15 nm (resíduos de Tir).



**Figura S6 26**. Espectros de absorção no UV-vis da urease na ausência e presença do (A) **110-L**; (B) **110-D**; (C) **110 ac-L**; (D) **116**; (E) **106 ac-L**; (F) **106 ac-D**, a pH 7,4



Figura S6 27. Espectros de UV-vis do (A) 110-L; (B) 110-D; (C) 110 ac-L; (D) 116; (E) 106 ac-L; (D) 106 ac-D. Os compostos 110-L, 110-D, 110 ac-L e 116 estavam na concentração de 10  $\mu$ M na presença e ausência de íons Ni(II) a 20  $\mu$ M, em pH 7,4. Os compostos 106 ac-L e 106 ac-D estavam na concentração de 10  $\mu$ M na presença e ausência de íons Ni(II) a 10  $\mu$ M, em pH 7,4.



**Figura S6 28**. Sobreposição dos espectros normalizados de fluorescência da Urease (10  $\mu$ M) que atua como doador (D) de radiação e absorção molecular do: (A) **110-L** (40  $\mu$ M); (B) **110-D** (40  $\mu$ M); (C) **110 ac-L** (20  $\mu$ M); (D) 116 (20  $\mu$ M) que atua como aceptor em pH 7,4.

