



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

PRISCILA GOES CAMARGO DE CARVALHO

**HIDANTOÍNAS E TIOIDANTOÍNAS:  
SÍNTESE, AVALIAÇÃO ANTIUREOLÍTICA E ESTUDO DE  
INTERAÇÕES POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR E  
DOCKING MOLECULAR**

---

Londrina  
2021

PRISCILA GOES CAMARGO DE CARVALHO

**HIDANTOÍNAS E TIOIDANTOÍNAS:  
SÍNTESE, AVALIAÇÃO ANTIUREOLÍTICA E ESTUDO DE  
INTERAÇÕES POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR E  
DOCKING MOLECULAR**

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

Orientador: Prof. Dr. Fernando Cesar de Macedo Jr.  
Coorientadora: Profa. Dra. Marcelle de Lima Ferreira Bispo.

Londrina  
2021

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

C331h de Carvalho, Priscila Goes Camargo .  
Hidantoínas e Tioidantóinas: Síntese, Avaliação Antiureolítica e Estudos de Interações por Ressonância Magnética Nuclear e Docking Molecular / Priscila Goes Camargo de Carvalho. - Londrina, 2021.  
131 f. : il.

Orientador: Fernando Cesar de Macedo Jr.  
Coorientador: Marcelle de Lima Ferreira Bispo .  
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2021.  
Inclui bibliografia.

1. Ureases - Tese. 2. RMN - Tese. 3. Inibidores - Tese. 4. Docking molecular - Tese. I. de Macedo Jr, Fernando Cesar. II. , Marcelle de Lima Ferreira Bispo. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU 54

PRISCILA GOES CAMARGO DE CARVALHO

**HIDANTOÍNAS E TIOIDANTOÍNAS:**  
SÍNTESE, AVALIAÇÃO ANTIUREOLÍTICA E ESTUDO DE  
INTERAÇÕES POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR E  
DOCKING MOLECULAR

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Coorientadora: Profa. Dra. Marcelle de Lima  
Ferreira Bispo  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Anna Paola Butera  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Camilo Henrique da Silva Lima  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

---

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

---

Prof. Dr. Renato Márcio Ribeiro Viana  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –  
UTFPR

Londrina, 06 de julho de 2021.

Dedico este trabalho a todos(as) pesquisadores(as) de nosso país que mesmo diante de percalços dedicam suas vidas a agregar conhecimento científico e de qualidade para a sociedade.

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe Marina, ao seu carinho e seu amor que sempre motivou todos os atos realizados em minha vida sendo base de minha esperança em nunca desistir. Ao meu esposo Rodrigo, pelo seu amor, companheirismo, paciência e dedicação que me ajudou a atravessar por cada obstáculo durante esta caminhada onde a perseverança sempre salientou nossos sonhos. Aos meus cunhados e cunhadas Dayana, Ricardo, Rogério e Vanessa, meus sogros Dorival e Josefa, aos meus irmãos Amanda, Emmanuel e Guilherme, e minha madrinha Silvia pelo apoio incondicional e compreensão.

Ao Professor Dr. Adriano Lopes Romero, por ter incentivado a minha curiosidade e interesse pela Química Orgânica guiando e instigando o início do meu caminho na busca pelo conhecimento.

Ao meu orientador Fernando Macedo, quem me acolheu e conduziu pelos caminhos da pesquisa com paciência e maestria, pelos seus ensinamentos, dedicação, confiança e exemplo de ética. A minha coorientadora Marcelle Bispo, por suas palavras sinceras e de conforto, disponibilidade em embarcar e atravessar novos desafios, conhecimento transmitido, incentivo e por acreditar em meu potencial. Estes citados, responsáveis pelo meu carinho para com a realização deste trabalho, pois sem eles nada disso seria possível.

Agradeço a paciência dos meus melhores amigos Bruno Simões e Lucas Camargo, e de todos os que partilharam de meus momentos de desespero e descontração, Felipe Mulari, Juliana Zambonato, Maiara Mendes, Manoela Gonçalves e Natalia Caputo, que foram os alicerces para a superação de todas as dificuldades encontradas durante esta caminhada, compartilhando dos medos e frustrações, mas também das alegrias e das vitórias alcançadas.

A todos os integrantes do LAPSSO e do LasMMed, em especial a Camila Bernardes e Jéseka Schirmann por toda gentileza, paciência, ensinamentos e palavras de conforto. Giovana Ramos, à sutil e agradável surpresa de uma amizade sincera. Paula Rivero, Tiago Brito, Henrique Esteves, Victor Kemmer e João Zimmerman, por me proporcionarem o sentimento de constituição de uma família científica tão amável e memorável. Kaio Maciel e Marciele Fabris por toda parceria nos experimentos e compartilhamento de aprendizado e amizade.

À REDNIU e ao Professor Dr. Ângelo de Fátima por toda a colaboração com este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

*“Se você quer se tornar um cientista para tentar trazer algo importante para a sociedade, importante para os outros, vá em frente. Porque no final da sua carreira você vai se sentir bem”*

(Françoise Barré-Sinoussi)

CARVALHO, Priscila Goes Camargo. **Hidantoínas e Tioidantoínas: Síntese, avaliação antiureolítica e estudo de interações por ressonância magnética nuclear e docking molecular.** 2021. 130 f. Tese de Doutorado Tese (Doutorado Associado em Química UEL-UEPG-Unicentro) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## RESUMO

As ureases são metaloenzimas produzidas por plantas, fungos e bactérias, com a função catalítica da hidrólise da ureia em amônia e carbamato. Bem reconhecidas como fator de virulência de microrganismos ureolíticos, devido à produção de amônia que favorece a colonização, as ureases receberam considerável atenção devido a seus impactos na saúde dos organismos vivos. No contexto agroindustrial, as ureases exercem efeitos inseticidas e estão relacionadas à perda de nitrogênio disponível no solo devido à hidrólise da ureia, seu substrato natural e o fertilizante mais utilizado atualmente. Desta maneira o desenvolvimento de inibidores de urease se torna necessário. Nesse contexto, hidantoínas e tioidantoínas possuem uma diversidade de propriedades biológicas, mas no presente momento não são relatadas na literatura como inibidores de ureases. Além disso, essas substâncias apresentam semelhança estrutural à ureia e à tioureia, substrato natural e inibidor dessa enzima, respectivamente. Portanto, neste trabalho, descrevemos a síntese e avaliação de hidantoínas e tioidantoínas derivadas de *L* e *D*-aminoácidos e a avaliação do seu potencial inibitório *in vitro* contra a enzima urease de *Canavalia ensiformis* (UCE). Descrevemos também a avaliação das interações ligante-enzima de compostos selecionados na triagem da atividade *in vitro* através da técnica de STD (*Saturation Transfer Difference*). As hidantoínas ou tioidantoína foram facilmente obtidas em rendimentos que variaram de 30 a 81%, através da reação de condensação da tioureia/ureia e um aminoácido sem a necessidade de procedimentos complexos de purificação. As reações de *L*-aminoácidos com cianato de sódio em solução aquosa, com posterior ciclização em meio ácido, forneceram hidantoínas em rendimentos variando de 13 a 94%. O ensaio *in vitro* contra urease de UCE revelou que as tioidantoínas apresentaram maior potencial inibitório do que hidantoínas, além de serem duas vezes mais potentes do que o inibidor de referência tioureia, provando que a classe é promissora para desenvolvimento de inibidores de ureases. Estudos de cinética enzimática demonstraram um perfil de inibição misto e incompetitivo para os compostos avaliados e foram determinadas as suas constantes de inibição (0,42 a 1,13 mM). Esses valores indicaram que a tioidantoína derivada do aminoácido *L*-valina é o inibidor mais promissor da série. A técnica de STD forneceu o mapeamento de epítomos dos inibidores, além de dados quantitativos de constante de dissociação para o complexo com a urease. Os resultados obtidos indicaram que a STD pode ser explorada como uma ferramenta poderosa, para a obtenção de parâmetros cinéticos e estudos de interação entre urease e os derivados aqui testados. Os resultados da docagem molecular indicam que os compostos possuem afinidade tanto pelo sítio ativo quanto para sítio alostérico da enzima UCE, sendo que a tioidantoína derivada da *L*-valina (**2b**) e a hidantoína derivada da *L*-metionina (**1d**) apresentam similaridade no modo de ligação quanto à conformação e orientação adotada. Além disso os anéis tioidantoínico e hidantoínico podem atuar como um grupo farmacofórico devido à sua afinidade de ligação por interações de ligação de hidrogênio com resíduos de aminoácidos importantes no sítio ativo e/ou alostérico da enzima.

**Palavras-chave:** ureases; inibidores; tioidantoínas; hidantoínas; RMN; STD; *canavalia ensiformis*.

CARVALHO, Priscila Goes Camargo. **Hydantoins and Thiohydantoins: Synthesis, antiureolytic evaluation and interactions studies by nuclear magnetic resonance and molecular docking.** 2021. 130 p. Thesis (Associate Doctorate in Chemistry UEL-UEPG-Unicentro) - State University of Londrina, Londrina, 2021.

## ABSTRACT

Ureases are metalloenzymes produced by plants, fungi and bacteria which catalyzes the urea into ammonium and carbamate. Ureases have been received considerable attention due to its impacts on the health of living organism since they were recognized as a virulence factor of ureolytic microorganisms related on the production of ammonia that supports their colonization. In the agro-industrial context, ureases have insecticidal effects, and are also related to loss of available nitrogen to the plants due to the hydrolysis of urea, its natural substrate, and currently the most widely used fertilizer. In this way, the development of urease inhibitors is necessary. In this context, hydantoins and thiohydantoins have a diversity of biological properties, but in the present moment does not report in the literature by inhibitory effect against ureases. In addition, these substances have a structural similarity to urea and thiourea, a natural substrate and inhibitor of this enzyme, respectively. Therefore, in this work, we describe the synthesis and evaluation of hydantoins and thiohydantoins derived from *L* and *D*-amino acids and the evaluation of their inhibitory potential *in vitro* against the *Canavalia ensiformis* urease (CEU). We also describe the evaluation of the ligand-enzyme interactions of the selected compounds in the screening using the STD (Saturation Transfer difference) technique. The hydantoins or thiohydantoin were easily obtained in yields ranging from 30 to 81%, through the condensation reaction of thiourea or urea and an amino acid without complex purification procedures. The reactions of amino acids with sodium cyanate in aqueous solution, with subsequent cyclization in the acidic medium, provided hydantoins in yields ranging from 13 to 94%. The *in vitro* assay against urease revealed that thiohydantoins were more active than hydantoins as inhibitors, in addition, the former showed a potential approximately twice as high as the reference thiourea inhibitor, proving that this class of compounds has great potential for the development of urease inhibitors. Enzymatic kinetics studies demonstrated a mixed inhibition and uncompetitive profile for the evaluated compounds and their inhibition constants (0,42 to 1,13 mM) were determined. These data indicated that the thiohydantoin derived from *L*-valine amino acid is the most promising inhibitor in the series. The use of the STD technique provided the mapping of epitopes of the inhibitors and quantitative dissociation constant data for the complex between the tested inhibitors and the urease. The results indicated that the STD is a powerful tool to study binding of urease and the tittle derivatives. The results of the molecular docking indicate that the compounds have affinity both for the active site and for the allosteric site of the UCE enzyme, which the thiohydantoin derived from *L*-valine (**2b**) and the hydantoin derived from *L*-methionine (**1d**) showed similarity in the binding mode concerning to the conformation and orientation adopted. Furthermore, thiohydantoin and hydantoin rings can act as a pharmacophoric group due to their binding affinity by hydrogen bonding interactions with important amino acid residues in the active and/or allosteric site of the enzyme.

**Key-words:** ureases; inhibitors; thiohydantoins; hydantoins; NMR; STD; *canavalia ensiformis*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura cristalográfica das ureases de *K. aerogenes* e *H. pylori*. Estruturas disponíveis em: Protein Data Bank - PDB (<http://www.rcsb.org/>). Códigos: 2KAU (KAU) e 1E9Z (HPU)..... 21
- Figura 2 (A)** -Estrutura cristalográfica da urease de *C. ensiformis* e **(B)** Representação tridimensional de seu sítio ativo. Estrutura disponível em: Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>). Código: 4H9M (UCE) ..... 22
- Figura 3** - Alinhamento das sequências primárias das ureases de *C. ensiformis* (4H9M) e *H. pylori* (1E9Z). Os resíduos idênticos entre as sequências recebem um fundo preto e os que são semelhantes entre as sequências recebem um fundo cinza. Alinhamento realizado pelo servidor T-coffee (<http://tcoffee.crg.cat>) e cálculo de identidade e similaridade pelo servidor Bioinformatics ([https://www.bioinformatics.org/sms2/ident\\_sim.html](https://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html))..... 23
- Figura 4** - Mecanismo proposto para a reação de hidrólise enzimática da ureia pela urease (representação esquemática com o sítio ativo da urease UCE, código PDB: 4H9M). Adaptado de BENINI *et al.*, 1999 ..... 24
- Figura 5** - Esquema proposto para ciclo do nitrogênio na presença de ureia e fertilizante em culturas agrônômicas ..... 25
- Figura 6** - Estrutura química dos fármacos amoxicilina, claritromicina e omeprazol recomendados para o tratamento de infecção por *H. pylori* .... 27
- Figura 7** - Estruturas químicas do tiofosfato de *N*-(*n*-butil)triamida (NBPT) e do fosfato de *N*-(*n*-butil)triamida (NBPTO), com destaque em azul para os grupos (tio)fosforamidatos..... 28
- Figura 8** - Estruturas químicas das fosfordiamidas (IV-VI, em azul) como inibidores de urease. Adaptado de (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2008) ..... 28
- Figura 9** - Estruturas químicas do ácido barbitúrico (VII, em azul) e de seu derivado (VIII) como inibidores de urease. Adaptado de (KHAN *et al.*, 2011) ..... 29
- Figura 10** - Derivado do ácido barbitúrico (IX, em azul) Derivado do ácido tiobarbitúrico (X, em azul), como inibidores de urease UCE. Adaptado de (RAUF *et al.*, 2011) ..... 29
- Figura 11** - Derivados contendo os heterociclos benzotiazol (XI, em azul) e

	piridopirimidina ( <b>XII</b> , em azul) como inibidores de urease UCE. Adaptado de (PEREIRA ARAUJO <i>et al.</i> , 2015; RAUF <i>et al.</i> , 2012) .....	30
<b>Figura 12</b> -	Estrutura do complexo de cobre com um derivado triazólico ( <b>XIII</b> , em azul) como inibidor de urease. Adaptado de (HANIF <i>et al.</i> , 2019) .....	30
<b>Figura 13</b> -	Estruturas químicas da ureia ( <b>I</b> ), tioureia ( <b>XIV</b> ), e ácido acetoidroxâmico ( <b>XV</b> ), como inibidores de urease.....	31
<b>Figura 14</b> -	Derivados de tioureia (em azul) como inibidores de urease de UCE. Adaptado de (KHAN <i>et al.</i> , 2014).....	32
<b>Figura 15</b> -	Benzoiltioureias ( <b>XIX</b> e <b>XX</b> , tioureia em azul) como inibidores de ureases presentes em solo e UCE. Adaptado de (BRITO <i>et al.</i> , 2015) .....	32
<b>Figura 16</b> -	Estrutura geral para tioidantoína ( <b>XXI</b> ) e hidantoína ( <b>XXII</b> ) (em destaque, a substituição do enxofre, em vermelho, por oxigênio, em azul) .....	33
<b>Figura 17</b> -	Principais métodos de síntese para a obtenção de tioidantoínas ou hidantoínas .....	35
<b>Figura 18</b> -	Exemplificação do efeito NOE pela irradiação do H3 (azul) que exerce aumento (NOE positivo) ou diminuição (NOE negativo) sobre as intensidades observadas para os sinais de seus H vizinhos. Considerando-se que H1 (verde) está próximo espacialmente de H3, e H2 (vermelho) distante espacialmente de H3 .....	43
<b>Figura 19</b> -	Diagrama do nível de energia para um sistema de rotação homonuclear I e S, mostrando probabilidades de transição e estados de rotação. (A) Condição em equilíbrio e (B) condição após saturação de S.....	44
<b>Figura 20</b> -	NOE obtido (linha sólida) em função de $\tau_c$ . O NOE é de até 0,38 para moléculas muito pequenas e -1,0 para moléculas grandes. Adaptado de (WILLIAMSON, 2009) .....	46
<b>Figura 21</b> -	Diagrama da sequência de pulsos do experimento de STD (stddiffesgp.3). <i>n</i> : número de repetições; <b>d1</b> : tempo de espera para iniciar a aquisição; <b>d20</b> : tempo de saturação; <b>CW</b> : trava de <i>spins</i> . Adaptado de (BRITO <i>et al.</i> , 2018; PARELLA, 2006) .....	48
<b>Figura 22</b> -	Esquema representativo do experimento de STD, sinais representados pelas cores verde e vermelha são dos prótons do ligante que receberam a transferência de saturação da proteína .....	49
<b>Figura 23</b> -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400,13 MHz) de <b>1h</b> em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	59

<b>Figura 24</b> -	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100,13 MHz) para <b>1h</b> (A) e <b>2a</b> (B) em DMSO- $d_6$ .....	60
<b>Figura 25</b> -	Curva de calibração da concentração de amônia gerada a partir do cloreto de amônio e a absorbância observada.....	61
<b>Figura 26</b> -	Gráfico de Michaelis-Menten de cinética enzimática para UCE.....	62
<b>Figura 27</b> -	Modo de inibição da urease a partir das plotagens de Lineweaver-Burk da recíproca da velocidade de reação vs. a recíproca do substrato (ureia) na ausência (*) e na presença de 2,00 mM (■) e 1,00 mM (●) dos compostos <b>2a</b> (A), <b>2b</b> (B), <b>2o</b> (C) e <b>1d</b> (D). Exemplificação do comportamento de Michaelis-Menten da catálise enzimática da urease para <b>2b</b> (E) .....	66
<b>Figura 28</b> -	Espectros do experimento de STD com atribuição dos sinais de $^1\text{H}$ do ligante <b>2b</b> com a urease de UCE. Espectro de referência ( <i>off-resonance</i> ) (A) e espectro de STD (B). Parâmetros: [UCE] = 0,02 mM; [ <b>2b</b> ] = 2,00 mM; tampão fosfato (em D $_2$ O), pH 7,4; STD: Tsat= 1,5 s; Gauss1.1000 = 10 ms; Sinc1.1000 = 2 ms; nº scans: 64 .....	69
<b>Figura 29</b> -	Fator de amplificação do STD em função do tempo de saturação (s) .....	70
<b>Figura 30</b> -	Espectros do experimento de STD com atribuição dos sinais de $^1\text{H}$ do ligante <b>2a</b> com a urease de UCE. Espectro de referência ( <i>off-resonance</i> ) (A) e espectro de STD (B). Parâmetros: [UCE] = 0,02 mM; [ <b>2a</b> ] = 2,00 mM; tampão fosfato (em D $_2$ O), pH 7,4; STD: Tsat= 1,5 s; Gauss1.1000 = 10 ms; Sinc1.1000 = 2 ms; nº scans: 64 .....	71
<b>Figura 31</b> -	Espectros do experimento de STD com atribuição dos sinais de $^1\text{H}$ do ligante <b>2o</b> com a urease de UCE. Espectro de referência ( <i>off-resonance</i> ) (A) e espectro de STD (B). Parâmetros: [UCE] = 0,02 mM; [ <b>2o</b> ] = 2,00 mM; tampão fosfato (em D $_2$ O), pH 7,4; STD: Tsat= 1,5 s; Gauss1.1000 = 10 ms; Sinc1.1000 = 2 ms; nº scans: 64 .....	72
<b>Figura 32</b> -	Espectros do experimento de STD com atribuição dos sinais de $^1\text{H}$ do ligante <b>1d</b> com a urease de UCE. Espectro de referência ( <i>off-resonance</i> ) (A) e espectro de STD (B). Parâmetros: [UCE] = 0,02 mM; [ <b>2o</b> ] = 2,00 mM; tampão fosfato (em D $_2$ O), pH 7,4; STD: Tsat= 1,5 s; Gauss1.1000 = 10 ms; Sinc1.1000 = 2 ms; nº scans: 64 .....	73
<b>Figura 33</b> -	Espectros dos experimentos de STD com atribuição dos sinais de $^1\text{H}$ do ligante <b>2b</b> nas diferentes razões $L_E/P$ de 10 a 70, na presença da urease	

	de UCE. Parâmetros: [UCE] = 0,02 mM; [2b] = 0,20 a 1,40 mM; tampão fosfato (em D <sub>2</sub> O), pH 7,4; STD: Tsat= 1,5 s; Gauss1.1000= 10 ms; Sinc1.1000= 2 ms; n° scans: 64.....	75
<b>Figura 34 -</b>	Fator de amplificação do STD observado para os prótons, <b>H1</b> , <b>H2</b> , <b>H3</b> e <b>H4</b> dos compostos <b>2a</b> , <b>2b</b> , <b>2o</b> e <b>1d</b> em função da concentração do ligante.....	75
<b>Figura 35 -</b>	Plotagens de Lineweaver-Burk representativas e suas respectivas equações das retas para as metilas <b>H1</b> e <b>H4</b> dos compostos <b>2a</b> , <b>2b</b> , <b>2o</b> e <b>1d</b> utilizadas para os cálculos do $\alpha_{STD}$ e $K_D$ .....	76
<b>Figura 36 -</b>	Comparação entre os arranjos tridimensionais e do sítio ativo das estruturas cristalográficas da urease de UCE: 3LA4 (azul) e 4H9M (rosa) .....	79
<b>Figura 37 -</b>	Diagramas de interação das poses consensuais das tioidantoínas <b>2b</b> (A), <b>2a</b> (B) e <b>2o</b> (C) no sítio ativo de UCE. Resíduos de interação são representados por bastão nas cores azul e amarela em referência aos resíduos participantes da atividade catalítica. As linhas em cor magenta tracejadas representam as interações de ligações de hidrogênio com resíduos e as de cor cinza a coordenação com o metal .....	82
<b>Figura 38 -</b>	Representação tridimensional dos domínios do monômero da urease de UCE (PDB: 3LA4), e os possíveis sítios de interação calculados pelo FTMap. Esfera vermelha representa o sítio alostérico, e a esfera verde o sítio ativo.....	83
<b>Figura 39 -</b>	Gráficos das porcentagens de interação de (A) ligações de hidrogênio e (B) interação hidrofóbicas com os resíduos da enzima UCE .....	84
<b>Figura 40 -</b>	Diagramas de interação das poses consensuais das tioidantoínas <b>2b</b> (A), <b>2a</b> (B), <b>2o</b> (C) e a hidantoína <b>1d</b> (D) no sítio alostérico de UCE. Resíduos de interação são representados por bastão nas cores azul. As linhas em cor magenta tracejadas representam as interações de ligações de hidrogênio .....	86
<b>Figura 41 -</b>	Modos de interação das poses consensuais das tioidantoínas (A e B) <b>2b</b> , <b>2a</b> , <b>2o</b> e a hidantoína <b>1d</b> no sítio alostérico de UCE; (C) Sobreposição entre as poses consensuais de <b>2b</b> e <b>1d</b> no sítio alostérico. Compostos estão representados na forma de bastão nas cores azul ( <b>2a</b> ), magenta ( <b>2b</b> ), amarelo ( <b>2o</b> ) e verde ( <b>1d</b> ) .....	87

<b>Figura A1</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400,13 MHz) e $^{13}\text{C}$ (100,13 MHz) para <b>1b</b> em DMSO- $\text{d}_6$ .....	117
<b>Figura A2</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400,13 MHz) e $^{13}\text{C}$ (100,13 MHz) para <b>1c</b> em DMSO- $\text{d}_6$ .....	118
<b>Figura A3</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400,13 MHz) e $^{13}\text{C}$ (100,13 MHz) para <b>1d</b> em DMSO- $\text{d}_6$ .....	119
<b>Figura A4</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400,13 MHz) e $^{13}\text{C}$ (100,13 MHz) para <b>1e</b> em DMSO- $\text{d}_6$ .....	120
<b>Figura A5</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400,13 MHz) e $^{13}\text{C}$ (100,13 MHz) para <b>1f</b> em DMSO- $\text{d}_6$ .....	121
<b>Figura A6</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400,13 MHz) e $^{13}\text{C}$ (100,13 MHz) para <b>1g</b> em DMSO- $\text{d}_6$ .....	122
<b>Figura A7</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400,13 MHz) e $^{13}\text{C}$ (100,13 MHz) para <b>1h</b> em DMSO- $\text{d}_6$ .....	123
<b>Figura A8</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400,13 MHz) e $^{13}\text{C}$ (100,13 MHz) para <b>1i</b> em DMSO- $\text{d}_6$ .....	124
<b>Figura A9</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400,13 MHz) e $^{13}\text{C}$ (100,13 MHz) para <b>1j</b> em DMSO- $\text{d}_6$ .....	125
<b>Figura A10</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400,13 MHz) e $^{13}\text{C}$ (100,13 MHz) para <b>1k</b> em DMSO- $\text{d}_6$ .....	126
<b>Figura A11</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400,13 MHz) e $^{13}\text{C}$ (100,13 MHz) para <b>1l</b> em DMSO- $\text{d}_6$ .....	127
<b>Figura A12</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400,13 MHz) e $^{13}\text{C}$ (100,13 MHz) para <b>1m</b> em DMSO- $\text{d}_6$ .....	128
<b>Figura A13</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400,13 MHz) e $^{13}\text{C}$ (100,13 MHz) para <b>1n</b> em $\text{D}_2\text{O}$ .....	129
<b>Figura A14</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400,13 MHz) e $^{13}\text{C}$ (100,13 MHz) para <b>2a</b> em DMSO- $\text{d}_6$ .....	130

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b> - Reação de hidrólise da ureia pela urease .....	20
<b>Esquema 2</b> - Síntese de hidantoína (XXIV) a partir do aminoácido alanina e cianato de potássio. Adaptado de (URECH, 1873) .....	36
<b>Esquema 3</b> - Síntese da tioidantoína (XXI) a partir da reação do cloridrato 2-aminoacetato de etila com tiocianato de potássio. Adaptado de (DE OLIVEIRA et al., 2008) .....	36
<b>Esquema 4</b> - Obtenção de 1-acetil-2-tioidantoína (XXVIII) a partir da reação da glicina com (a) tiocianato de potássio ou (b) tiocianato de amônio. Seguida da obtenção da 2-tioidantoína (XXI) a partir da reação com HCl (c). Adaptado de ( DE OLIVEIRA et al., 2008; REYES; BURGESS, 2006) .....	37
<b>Esquema 5</b> - Síntese de hidantoínas (XXII) a partir de compostos carbonilados (XXIX), cianeto de potássio e carbonato de amônio. Adaptado de (BUCHERER; LIEB, 1934) .....	37
<b>Esquema 6</b> - Síntese de Biltz da hidantoína (XXXI) a partir de compostos benzílicos (XXX) e ureia. Adaptado de (KONNERT et al., 2017) .....	38
<b>Esquema 7</b> - Síntese da hidantoína (XXII) a partir da glicina (XXVII) e cianato de potássio. Adaptado de (SCHÖRGHUBER et al., 2015) .....	38
<b>Esquema 8</b> - Síntese de tioidantoínas a partir de amino ácidos e (A) tiourea e (B) ureia. Adaptado de (WANG; SHEIKH; ZHANG, 2006). .....	39
<b>Esquema 9</b> - Sequência reacional proposta para a reação de indofenol com amônia. Adaptado de (MACIEL, 2019) .....	41
<b>Esquema 10</b> - Síntese de hidantoínas e tioidantoínas derivadas de aminoácidos .....	55
<b>Esquema 11</b> - Mecanismo proposto para a síntese de tioidantoína ou hidantoínas em reação de condensação direta de ureia com aminoácidos. Adaptado de (WANG; SHEIKH; ZHANG, 2006) .....	56
<b>Esquema 12</b> - Mecanismo proposto para a síntese de hidantoínas a partir da reação de aminoácidos com cianato de sódio. Adaptado de (DECLAS; LE VAILLANT; WASER, 2019; WANG, 2010) .....	57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> -	Rendimentos para a síntese das hidantoínas ( <b>1b-n</b> ) e da tioidantoína ( <b>2a</b> ) derivadas de aminoácidos.....	58
<b>Tabela 2</b> -	Atividade inibitória das tioidantoínas e hidantoínas e tiourea (0,050 mM) frente à urease de UCE (0,0035 mM) em reações contendo ureia como substrato (10 mM) .....	64
<b>Tabela 3</b> -	Efeito das tioidantoínas <b>2a</b> , <b>2b</b> , <b>2o</b> e <b>1d</b> nos parâmetros cinéticos de UCE.....	68
<b>Tabela 4</b> -	Valores de $A_{STD}$ para todos os prótons que apresentaram efeito STD, para os compostos <b>2a</b> , <b>2b</b> e <b>2o</b> avaliados .....	72
<b>Tabela 5</b> -	Valores de $\alpha_{STD}$ , $K_D$ e $K_D$ médio para todos os prótons que apresentaram efeito STD dos compostos <b>2a</b> , <b>2b</b> , <b>2o</b> e <b>1d</b> avaliados.....	77
<b>Tabela 6</b> -	Comparação entre as constantes $K_i$ e $K_D$ , através do coeficiente de correlação de Pearson dos compostos <b>2a</b> , <b>2b</b> e <b>2o</b> avaliados.....	78
<b>Tabela 7</b> -	RMSD entre as poses resultantes das funções de pontuação empregadas no programa GOLD para o sítio ativo de UCE. Em negrito, a pose consensual selecionada a partir do menor valor de RMSD .....	81
<b>Tabela 8</b> -	RMSD entre as poses resultantes das funções de pontuação empregadas no programa GOLD para o sítio alostérico de UCE. Em negrito pose consensual selecionada a partir do menor valor de RMSD .....	85
<b>Tabela A1</b> -	Rendimentos para a síntese de tioidantoínas <b>2b-o</b> derivadas de aminoácidos, sintetizadas em trabalho anterior (CARVALHO, 2017) ..	116
<b>Tabela A2</b> -	Valores de $A_{STD}$ para todos os prótons que apresentaram efeito STD, nos experimentos com diferentes concentrações (0,20 a 2,00 mM) dos compostos <b>2a</b> , <b>2b</b> e <b>2o</b> avaliados .....	116

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%I	Porcentagem de inibição
A	alfa
$\alpha_{STD}$	Fator de amplificação máximo
$\delta$	Deslocamento químico
$\mu\text{M}$	Micromolar
[L]	Concentração do ligante
[S]	Concentração de substrato
Abs	Absorbância
Abs a	Absorbância da amostra
Abs c	Absorbância do controle
$A_{STD}$	Fator de amplificação
br	Broad (do inglês “broad”)
CW	Trava de spins
d	Dupleto
d1	Tempo de espera para aquisição
d20	Tempo de saturação
D-aa	D-aminoácido
dd	Duplo-dupleto
ddd	Duplo-duplodupleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
$f_i \{S\}$	Mudança fracionária na intensidade do sinal após irradiação
FT	Transformada de Fourier
Gz	Campo pulsado no eixo z
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Do inglês, Human Immunodeficiency Virus
HPU	Helicobacter pylori
Hz	Hertz
I	Intensidade do sinal com irradiação
$I_0$	Intensidade do sinal sem irradiação
IC <sub>50</sub>	Metade da concentração inibitória máxima
I <sub>STD</sub>	Intensidade do sinal observada pelo efeito STD

J	Constante de acoplamento
$K_D$	Constante de dissociação
$K_i$	constante de inibição
$K_m$	constante de Michaelis Menten
$k_{off}$	taxas de dissociação
$k_{on}$	taxas de associação
<i>L</i> -aa	<i>L</i> -aminoácido
$L_E$	Ligante em excesso
M	Molar
m	Multiplete
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
NBPT	N-( <i>n</i> -butil)triamida
NBPTO	fosfato de N-( <i>n</i> -butil)triamide
nm	Nanômetros
NOE	Do inglês, <i>Nuclear Overhouse Effect</i>
P	Proteína
PDB	Protein Data Bank
Pf	Ponto de fusão
ppm	partes por milhão
q	Quarteto
RF	Rádio frequência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
S	Rotação (ou giro, do inglês <i>spin</i> ) saturada
s	Simpleto
STD	Do Inglês, <i>Saturation Transfer Difference</i>
t	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
Tsat	Tempo de saturação
U	Atividade enzimática
UCE	Do inglês, <i>Jack Bean Urease</i>
UV-visível	Ultra Violeta-visível

$V_0$                     velocidade inicial da reação

$V_{\max}$                 velocidade máxima

vs                        versus

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1	UREASES: BREVE HISTÓRICO, CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E CATALÍTICAS.....	20
1.2	IMPORTÂNCIA DO DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES DE UREASES .....	25
1.2.1	Aciltioureias ou Acilureias Cíclicas – Tioidantoínas e Hidantoínas.....	33
1.3	TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIUREOLÍTICA. ....	39
1.3.1	Determinação da Atividade Inibitória por Método Colorimétrico (Reação de Indofenol). ....	40
1.3.2	Estudo de Interação Ligante-Proteína em Nível Molecular .....	41
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	54
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	54
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	55
3.1	SÍNTESE DE HIDANTOÍNAS E TIOIDANTOÍNAS DERIVADAS DE AMINOÁCIDOS .....	55
3.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DE TIOIDANTOÍNAS E HIDANTOÍNAS FRENTE À URE\ASE.....	60
3.2.1	Obtenção dos Parâmetros para o Ensaio Enzimático .....	60
3.2.2	Efeito Inibitório das Tioidantoínas e Hidantoínas na Atividade da Urease .....	63
3.2.3	Estudo do Mecanismo Cinético de Inibição da Urease por Hidantoínas e Tioidantoínas. ....	65
3.2.4	Estudo das Interações Ligante-Proteína entre Tioidantoínas e Urease por STD .....	68
3.2.5	Estudos Cinéticos por RMN: Determinação da Constante de Dissociação por STD .....	74
3.2.6	Estudos por Docagem Molecular .....	78
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	89
<b>5</b>	<b>PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS</b> .....	91
5.1	MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO.....	91

5.2	SÍNTESE DAS HIDANTOÍNAS DERIVADAS DE AMINOÁCIDOS.....	91
5.2.1	Síntese de Hidantoínas e Tioidantoína a Partir da Condensação Direta de L ou D-aa com Ureia (Adaptado de WANG; SHEIKH; ZHANG, 2006).....	91
5.2.2	Síntese de Hidantoínas a Partir da Reação de L-aa com Cianato de Sódio (Adaptado de SCHÖRGHUBER et al., 2015). .....	93
5.3	ENSAIO DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA COM A UREASE C. ENSIFORMIS.....	95
5.3.1	Ensaio de Atividade Inibitória Direta.....	95
5.3.2	Ensaio da Cinética Enzimática .....	96
5.4	ESTUDO DE INTERAÇÃO LIGANTE-PROTEÍNA POR STD.....	97
5.4.1	Preparação das Amostras.....	97
5.4.2	Detalhes e Configurações Gerais para os Experimentos de STD .....	97
5.4.3	Otimização do Tempo de Saturação para Experimentos de Mapeamento de Epítomos.....	98
5.4.4	Estudos Cinéticos para Determinação do KD por RMN-STD.....	99
5.5	PROCEDIMENTOS PARA OS ESTUDOS DE DOCAGEM MOLECULAR .....	99
5.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	100
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>102</b>
	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>116</b>
	APÊNDICE A .....	116
	APÊNDICE B.....	117

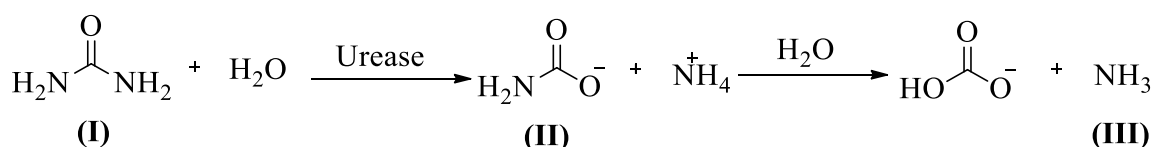
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 UREASES: BREVE HISTÓRICO, CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E CATALÍTICAS

As ureases (EC 3.5.1.5) são um grupo de metaloenzimas pertencente à família das amidoidrolases e fosfotriestrases. Entre outras metaloidrolases binucleares, as ureases são as únicas a possuírem íons  $\text{Ni}^{2+}$  no sítio ativo (KRAJEWSKA, 2009).

São amplamente difundidas entre plantas, algas, fungos, bactérias, mas não são encontradas em animais. Independente do organismo, as ureases exercem como função principal a hidrólise da ureia (I), que fornece como produto carbamato (II) e amônia (III), sendo capaz de acelerar a taxa dessa reação por um fator de pelo menos  $10^{14}$  quando comparada à decomposição da ureia por reação de eliminação (LIPPARD, 1995) (**Esquema 1**).

**Esquema 1** - Reação de hidrólise da ureia pela urease.



A urease é historicamente importante pelo seu protagonismo em alguns dos grandes eventos na comunidade científica e para o avanço na Bioquímica. Essa história tem início em 1864, quando Philippe Edouard Léon van Tieghem isolou o primeiro microrganismo com atividade ureolítica, o *Micrococcus ureae*. Dez anos depois, Frédéric Alphonse Musculus isolou a primeira enzima com atividade ureolítica de uma amostra de urina pútrida (KAPPAUN *et al.*, 2018). Pierre Miquel, que dedicou seus estudos a descrever e reconhecer microrganismos capazes de decompor a ureia, foi o responsável em sugerir o nome de urease em 1890 (FEARON, 1923). A descoberta de Yuchi Takeuchi da urease vegetal extraída da soja (*Glycine max*) em 1909, permitiu intenso avanço nas investigações do tema por proporcionar maior fonte de obtenção da enzima para estudos (KAY, 1923).

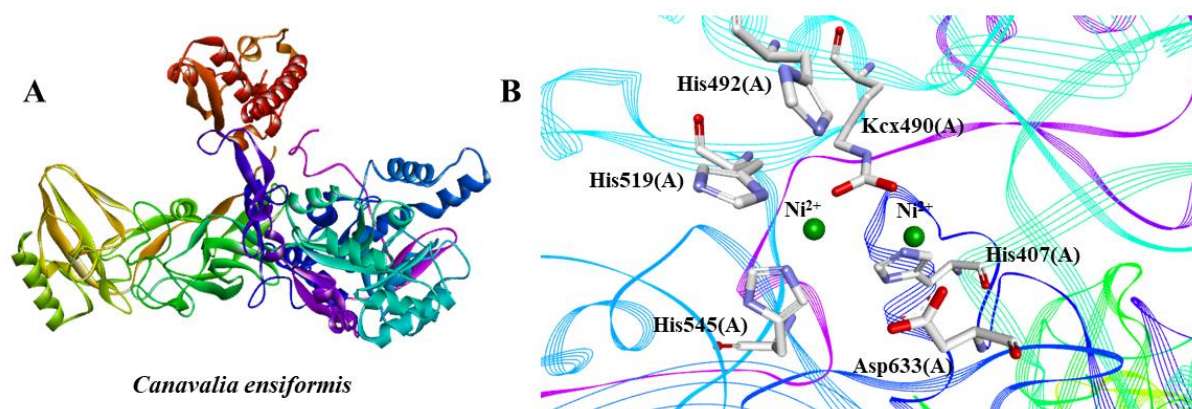
Cerca de cinquenta anos depois da descoberta da primeira urease, em 1926, a urease de *Canavalia ensiformis* (UCE ou *Jack Bean Urease*) foi isolada de sementes de feijão de porco, sendo a primeira enzima a ser cristalizada. Essa descoberta realizada por James B. Sumner, demonstrou a natureza proteica das enzimas, prova incontestável de que estas foram bem definidas como compostos químicos, o que lhe laureou com o Prêmio Nobel de Química em 1946 (SUMNER, 1926).



1 propriedades físico-químicas desta proteína demonstrando que a Canatoxina é uma isoforma  
2 variante da urease vegetal (FOLLMER *et al.*, 2001).

3 Apesar da urease de *Canavalia ensiformis* ter sido a primeira enzima a ser cristalizada,  
4 a determinação de sua estrutura cristalina (**Figura 2A**) foi alcançada apenas em 2010 por  
5 Anuradha Balasubramanian & Karthe Ponnuraj, devido à dificuldade em se obter grandes  
6 quantidades desta enzima com um bom grau de pureza para estudos refinados  
7 (BALASUBRAMANIAN; PONNURAJ, 2010). A urease de UCE apresenta dois íons  $\text{Ni}^{2+}$  em  
8 seu sítio ativo (**Figura 2B**), sendo ambos coordenados por uma lisina carbamoilada e dois  
9 resíduos de histidinas cada, e ainda para um dos íons níquel, um resíduo de aspartato terminal  
10 (JABRI *et al.*, 1995; NORDLANDER; CARLSSON, 2010).

11  
12 **Figura 2.** (A) Estrutura cristalográfica da urease de *C. ensiformis* e (B) Representação  
13 tridimensional de seu sítio ativo. Estrutura disponível em: Protein Data Bank  
14 (<http://www.rcsb.org/>). Código: 4H9M (UCE).



15  
16 **Fonte:** Autoria própria.

17  
18 As ureases vegetais, assim como as fúngicas, são constituídas por subunidades  
19 idênticas de aproximadamente 90 kDa organizadas em trímeros ou hexâmetros. A enzima de  
20 UCE, por exemplo, é composta por 840 aminoácidos, sendo sua forma nativa um hexâmero de  
21 aproximadamente 540 kDa (RIDDLES *et al.*, 1991). Já ureases bacterianas, são compostas por  
22 três subunidades diferentes, com massa molar entre 190 a 300 kDa (KAPPAUN *et al.*, 2018).

23 Mesmo com essas características distintas, estudos apontam um mesmo ancestral  
24 comum para ureases fúngicas, vegetais e bacterianas (BALASUBRAMANIAN; PONNURAJ,  
25 2010). Por exemplo, o alinhamento entre as ureases de UCE e *Helicobacter pylori* apresentam  
26 um alto grau de identidade, cerca de 39,8% em sua sequência de aminoácidos e similaridade de  
27 48,3% (cabeia B) (**Figura 3**).

1 **Figura 3.** Alinhamento das seqüências primárias das ureases de *C. ensiformis* (4H9M) e *H.*  
 2 *pylori* (1E9Z). Os resíduos idênticos entre as seqüências recebem um fundo preto e os que são  
 3 semelhantes entre as seqüências recebem um fundo cinza. Alinhamento realizado pelo servidor  
 4 T-coffee (<http://tcoffee.crg.cat>) e cálculo de identidade e similaridade pelo servidor  
 5 Bioinformatics ([https://www.bioinformatics.org/sms2/ident\\_sim.html](https://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html)).

```

1E9Z_2|Chain B|UREAS ----- 0
4H9M_1|Chain A|Ureas MKLSPREVEKLGHLNAGYLAQKRLARGVRLNYTEAVALIASQIMEYARDGEKTVAQLMCLGQHLGRRQVLPVAVPHLLNA 80

1E9Z_2|Chain B|UREAS ----- 0
4H9M_1|Chain A|Ureas VQVEATFPDGTKLVTVDHDFISRENGELQEALFGSLLFPVSLDKFAETKEDNRIPEGELCEDECLTLNIGRKAIVLKVTSK 160

1E9Z_2|Chain B|UREAS ----- 0
4H9M_1|Chain A|Ureas GDRPIQVGSYHYFIEVNPYLTPDRRKAYGMRLNIAAGTAVRFEPGDCCKSVTLVSIENKVKIRGGNAIADGFPVNETNLEAA 240

1E9Z_2|Chain B|UREAS -----MKRISRKEYVSMYGPTTGDKVRLGDTDLIAEVEHDYIYGGPELRFGGGKT 50
4H9M_1|Chain A|Ureas MHAVRSKGFGHEEEKDASEGFTKEDPNCFFNTHIRKEYANRYGPTTGDKIRLGDITNLLAEIEKDYALYGDCEVFGGGRV 320

1E9Z_2|Chain B|UREAS IREGMSQSNPNS-KEELDLITNALIVDYTGIRKADIGIKDGRFAGIGKGGKRMQDQGVKNNLSVGPATEALAGEGLIVT 129
4H9M_1|Chain A|Ureas IIRDGMSQSCGHFFPAISLDQVITNAVIDDYTGIRKADIGIKDGRFASIGKAGNEDIMNGVFSNMIIGANTEVIAGEGLIVT 400

1E9Z_2|Chain B|UREAS AGGIDTHLHFTSPOCTPFAFGVTTMIGGGTGPAGTNTATTFGRRNLKRWMLRAAEYYSMNNGFLAKGNASNDASTLD 209
4H9M_1|Chain A|Ureas AGAIDCHVHYTQPOLVYPAISSGITTLVGGGTGPAGTRATTCPPSFTQMRMLMQSTDDLFLNPGFTGKGSSTKPFDELRE 480

1E9Z_2|Chain B|UREAS QIEAGALCFKTHEDWGTTPSAINHPLDVADKVDVQVLIHTDTLNEAGCVEDTMAAIAIGRTMHTFHTEGAGGGHAPDIIKV 289
4H9M_1|Chain A|Ureas IIRKAGMGLKTHEDWGSTPRAIDNCEIIEAHFDIQNLIHTDTLNEAGFVEHSAAFKGRTEHTVHSEGAGGGHAPDIIKV 560

1E9Z_2|Chain B|UREAS AGEHNILPASTNPTREFFVNTTEAHHMDMLMVCHHLDKSRREDVCFAPSRIRPQTIAAEDTLDHMGASSTSSDSQAMGRV 369
4H9M_1|Chain A|Ureas CGIKRNVLPASTNPTRELLSNTIDHEHMDMLMVCHHLDREIPEDLAFAPSRIRKKTIAAEDVLDNDGASSTSSDSQAMGRV 640

1E9Z_2|Chain B|UREAS GEVIRRTWQTADKNNKKEEGRLKEKSGDNDNFRIKRYLSKYTINPAIANGHSEYVGSVEVGKVDLVLWSEAFFGKPKPMI 449
4H9M_1|Chain A|Ureas GEVISRTWQTADKMRKQEGFLKCSDDNDNFRIIRYLAKYTINPAIANGHSEYVGSVEVGKLDLVLWSEAFFGKPKPMV 720

1E9Z_2|Chain B|UREAS IKGGEIALSOMGDANASITPPQPVYVREMPAHHGKAKYDANITFVSSAAADKGLKEELGLERQVLPVENCORNVTRKDMQF 529
4H9M_1|Chain A|Ureas IKGGMVANAIGDPNASITPPEFVKMRPMYGTIGKAGGASITFVSSAAADQRYNVLYGLNKRVEAVSNVRRITKLDML 800

1E9Z_2|Chain B|UREAS NNTTAHTEVNPETYHVEVDGKEVTSKPAKVSIAQLSSTF 569
4H9M_1|Chain A|Ureas NDALPEIEVDPEYHVKADGKLCVSEATTVEISRNYFLF 840

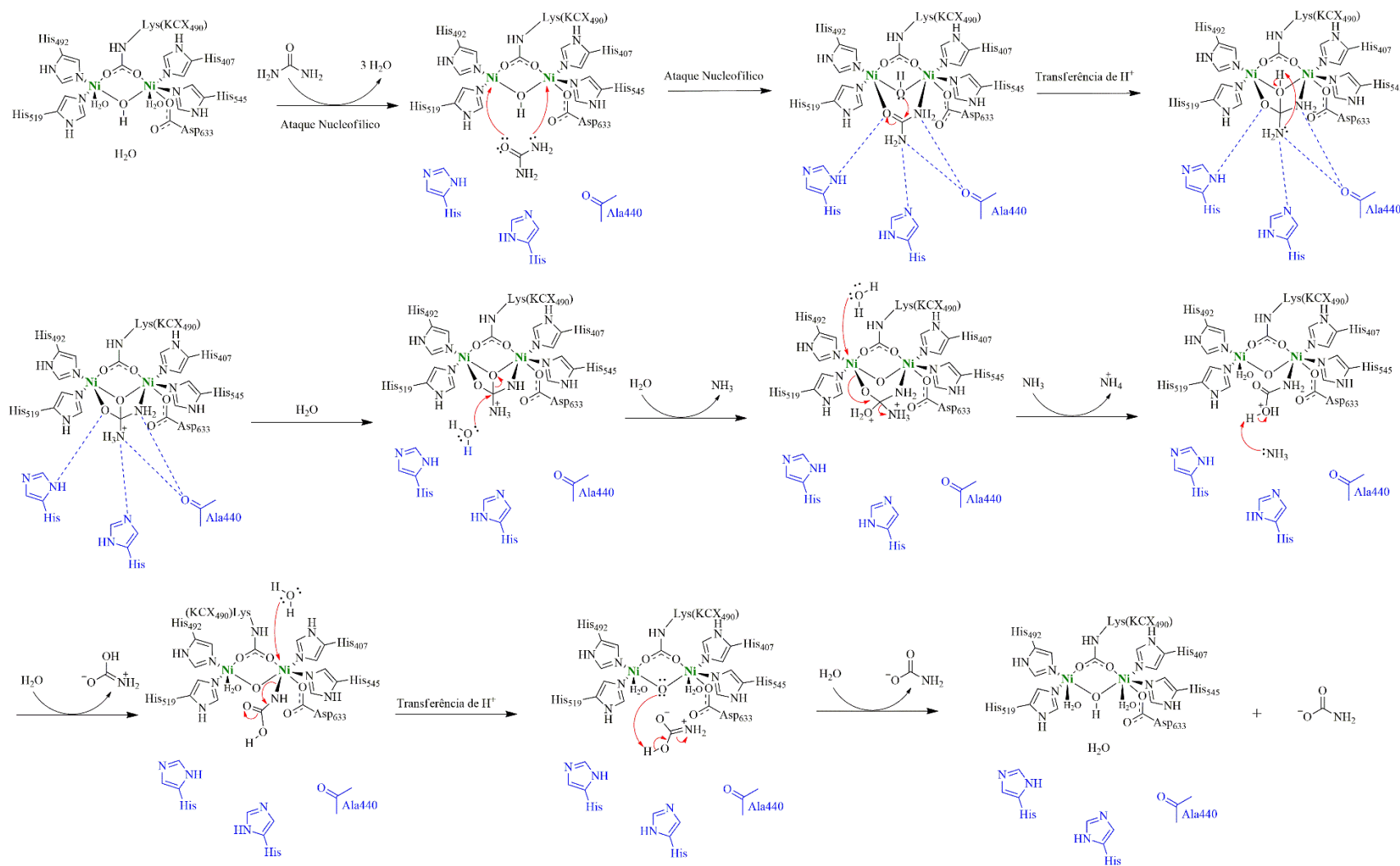
```

6  
 7 **Fonte:** Autoria própria.

8  
 9 O mecanismo da ação catalítica das ureases é amplamente discutido na comunidade  
 10 científica. Em modo geral, as propostas sugerem que o processo se inicia com o  
 11 deslocamento de moléculas de água pela presença da ureia no sítio ativo, que permite o ataque  
 12 nucleofílico através do oxigênio carbonílico e do grupo amida da ureia com os íons  $Ni^{2+}$ ,  
 13 formando uma coordenação do tipo bidentada com a urease. Posteriormente, ocorre o ataque  
 14 nucleofílico pela hidroxila ligada em ponte entre os íons  $Ni^{2+}$ , no carbono carbonílico da ureia,  
 15 resultando em intermediário tetraédrico, do qual após diversas etapas de transferência de próton  
 16 intermoleculares e reações com moléculas de água presente no meio, amônia e carbamato são  
 17 liberados (**Figura 4**) (BENINI *et al.*, 1999).

18

**Figura 4.** Mecanismo proposto para a reação de hidrólise enzimática da ureia pela urease (representação esquemática com o sítio ativo da urease UCE, código PDB: 4H9M). Adaptado de BENINI *et al.*, 1999.



Fonte: Autoria própria.

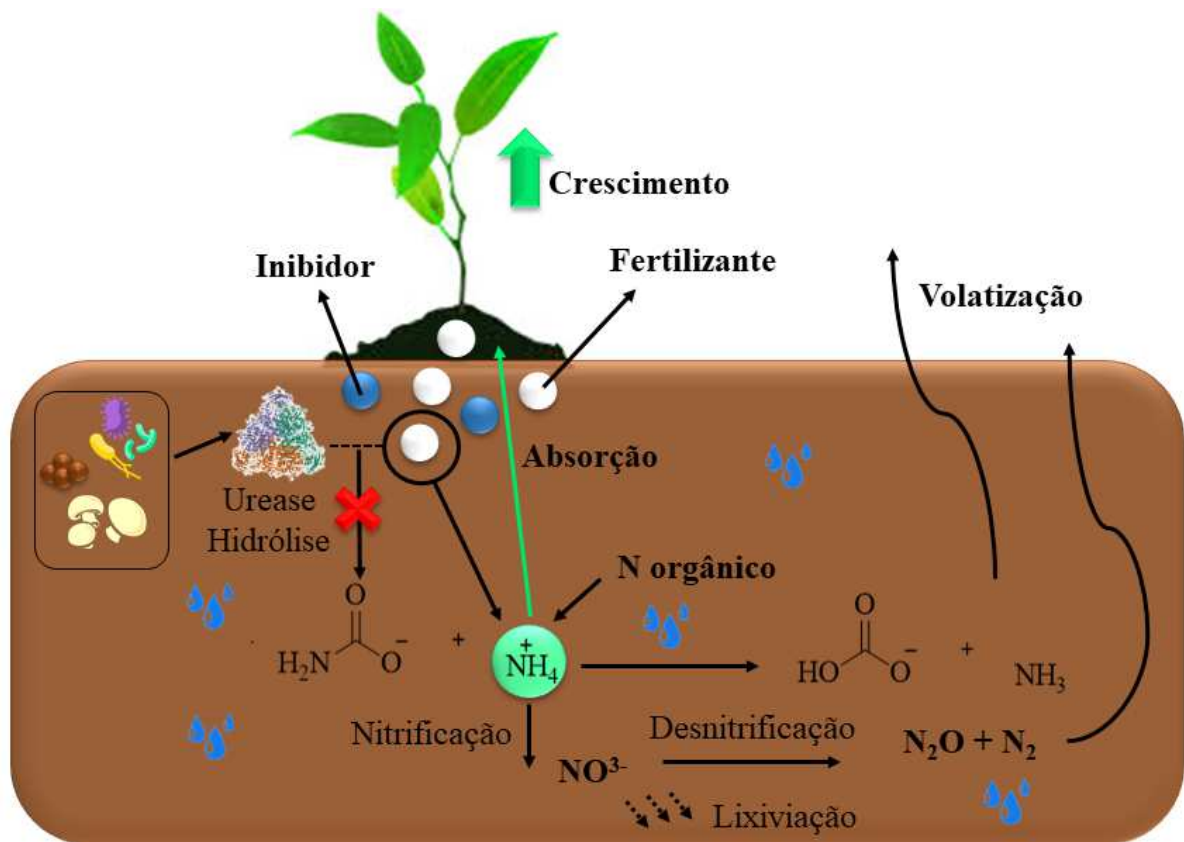
## 1 1.2 IMPORTÂNCIA DO DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES DE UREASES

2  
3 Desde sua descoberta, a urease tem sido objeto de extensa pesquisa que inclui sua  
4 ocorrência e funções na natureza. Seu principal papel ambiental é permitir que o organismo use  
5 a ureia (substrato natural) como fonte de nitrogênio, e além disto, participar efetivamente nas  
6 vias sistêmicas de transporte de nitrogênio, atuar como toxina proteica para defesa das plantas,  
7 e, em mamíferos, neutralizar o ambiente gástrico que sofreu colonização bacteriana, por  
8 exemplo (POLACCO; HOLLAND, 1993). Portanto, a aplicabilidade da urease na ciência é  
9 vasta, mas principalmente estudada por suas especificidades nas áreas da agricultura e  
10 medicina.

11 Ureases cataliticamente ativas, podem ser encontradas nas camadas do solo a cerca de  
12 0 a 10 cm (MANEJO *et al.*, 2009), proveniente da síntese de bactérias, fungos ou, ainda,  
13 originada de restos vegetais (LANNA *et al.*, 2010). A maior parte do nitrogênio disponível na  
14 agricultura é proveniente da atmosfera, já que no solo esse nutriente está sujeito à perdas por  
15 lixiviação, desnitrificação e principalmente por volatilização (**Figura 5**) (CABEZAS;  
16 KORNDORFER; MOTTA, 1997). Uma alternativa para se aumentar a quantidade de N  
17 disponível para as plantas, é o uso de fertilizantes à base de ureia (substrato natural da enzima  
18 urease), que é o mais utilizado no mundo, com cerca de 200 milhões de toneladas em uso  
19 contínuo (BEIG *et al.*, 2020). Por outro lado, a eficácia do uso da ureia como fertilizante é  
20 prejudicada devido ao processo de hidrólise acarretado pela atividade catalítica da urease  
21 presente no solo, que resulta na emissão de amônia cuja volatilização contribui também para a  
22 poluição e degradação de ecossistemas próximos aos locais de aplicação (**Figura 5**)  
23 (CANTARELLA *et al.*, 2008).

24 Desta maneira, inibidores de urease são necessários, para auxiliar no aumento da  
25 eficiência do uso de nitrogênio da ureia, retardando o processo de hidrólise pela  
26 inativação/perturbação da atividade enzimática, combatendo o excesso de enzima urease  
27 cataliticamente ativa presente no solo, permitindo então o maior tempo para a incorporação do  
28 nitrogênio para o cultivo (JUNEJO *et al.*, 2011).

- 1 **Figura 5.** Esquema proposto para ciclo do nitrogênio na presença de ureia e fertilizante em  
 2 culturas agrônômicas.



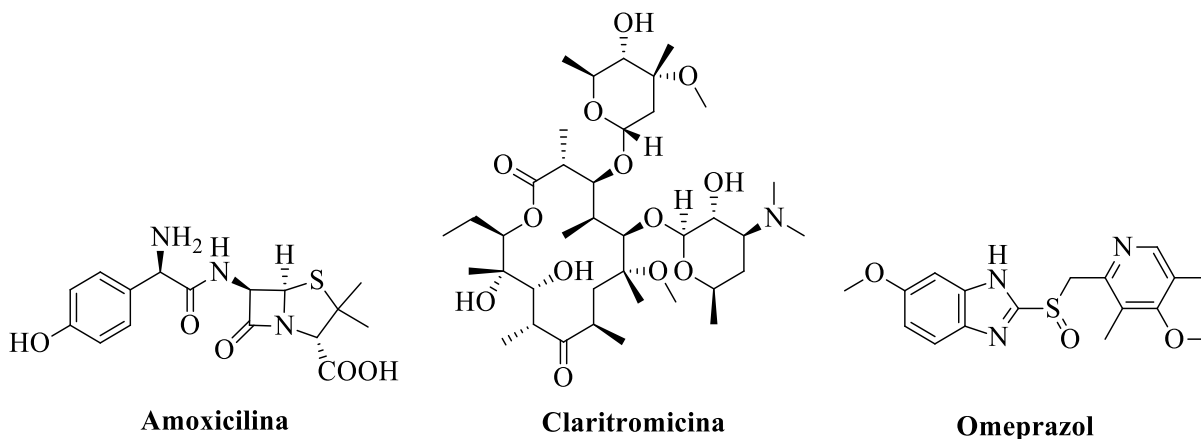
3  
 4 **Fonte:** Autoria própria.

5  
 6 No contexto medicinal, as infecções por bactérias ureolíticas, como o *Helicobacter*  
 7 *pylori*, que infecta cerca de 50% da população global, causam complicações à saúde devido a  
 8 ocorrência de inflamação gástrica, desenvolvimento de úlceras duodenais e gástricas,  
 9 adenocarcinoma e linfoma gástricos (MARONEY; CIURLI, 2014). Esta espécie bacteriana  
 10 Gram-negativa é capaz de sobreviver em um ambiente ácido, como o estômago (pH 1-2),  
 11 utilizando-se da urease como mecanismo de defesa, uma vez que, o aumento do pH local  
 12 causado pelo acúmulo de  $\text{NH}_3$  resultante da hidrólise da ureia permite um microambiente  
 13 favorável ao microrganismo para sobreviver e se colonizar nessas condições extremas (REGO  
 14 *et al.*, 2018b).

15 De acordo com o 4º Consenso Brasileiro sobre a infecção pelo *H. pylori* (SOUSA;  
 16 ALMEIDA; BASTOS, 2017), o tratamento de primeira escolha recomendado consiste no uso  
 17 de antibióticos como amoxicilina e claritromicina associados a um inibidor de bomba de  
 18 prótons (IBP), tais como omeprazol, pantoprazol ou esomeprazol. Esses fármacos inativam as  
 19 bombas de prótons das células parietais, reduzindo assim, a produção de ácido pelo estômago

em até 95%, atuando como adjuvantes no tratamento (PAULA *et al.*, 2013) (**Figura 6**). Esse esquema terapêutico pode durar de 7 a 14 dias, e pode exigir doses mais altas de IBP, para manter o bloqueio ácido adequado (HOLTMANN *et al.*, 2002). Além disso, estudos apontam a resistência da bactéria aos antibióticos em questão, o que torna opções menos eficazes, além de apresentarem efeitos adversos importantes, tais como náuseas, diarreia, dores estomacais, perda do paladar e glossite (FOLLMER, 2010; MÉGRAUD, 2012; NAGAHARA *et al.*, 2000). Tendo em vista, esses problemas associados ao tratamento da infecção por *H. pylori*, faz-se necessária a descoberta e desenvolvimento de novas opções terapêuticas mais eficazes e menos tóxicas para combater esse micro-organismo.

**Figura 6.** Estrutura química dos fármacos amoxicilina, claritromicina e omeprazol recomendados para o tratamento de infecção por *H. pylori*.



**Amoxicilina**

**Clarithromicina**

**Omeprazol**

Fonte: Autoria própria.

Logo, tanto no contexto agroindustrial ou medicinal, alternativas no desenvolvimento de inibidores de urease que visam a mitigação da perda de nitrogênio são de grande relevância. O desenvolvimento de inibidores enzimáticos baseados na estrutura do substrato natural, é uma abordagem comumente usada no planejamento racional de fármacos. Vários inibidores de urease, particularmente nos últimos 10 anos, foram projetados com base na estrutura da ureia. Cinco principais classes de inibidores de ureases são relatadas: fosforamidatos, análogos barbitúricos, heterociclos de cinco ou seis membros e derivados de tioureia (REGO *et al.*, 2018b).

Os fosforamidatos representam uma das classes mais ativas de compostos que funcionam como inibidores de urease, entre eles, o mais utilizado na agricultura é o tiofosfato de *N*-(*n*-butil)triamida (NBPT) (**Figura 7**). Esse inibidor se destaca por originar um produto de biotransformação por microrganismos do solo, o fosfato de *N*-(*n*-butil)triamida (NBPTO), que

funciona em baixas concentrações (**Figura 7**), sendo observados valores de  $IC_{50}$  de até 100 nM (FONT *et al.*, 2008). No Brasil, é vendido com o nome comercial Agrotain®. Por ser um produto importado, desenvolvido e distribuído pela Koch Agronomic Services, com sede no Estados Unidos da América, o custo de sua utilização é elevado. Além disso, sua eficácia é variável dependendo das condições ambientais e características físico-químicas do solo que resultem no seu produto de biotransformação (WHITEHURST; WHITEHURST, 2014).

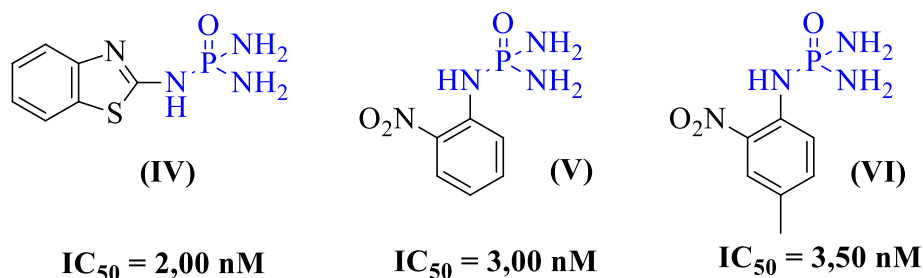
**Figura 7.** Estruturas químicas do tiofosfato de *N*-(*n*-butil)triamida (NBPT) e do fosfato de *N*-(*n*-butil)triamida (NBPTO), com destaque em azul para os grupos tiofosforamida e fosforamida.



**Fonte:** Autoria própria.

Derivados de fosforamidas também são descritos como potenciais inibidores de urease. Domingues e colaboradores relatam a síntese de derivados *N*-alquil substituídos, que obtiveram valores de  $IC_{50}$  de 2,00 a 3,50 nM para os compostos mais ativos da série avaliada (**IV-VI, Figura 8**) (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2008).

**Figura 8.** Estruturas químicas das fosforamidas (**IV-VI**, grupo fosforamida em azul) como inibidores de urease. Adaptado de (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2008).



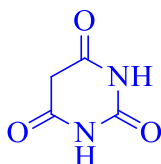
**Fonte:** Autoria própria.

O ácido barbitúrico (**VII, Figura 9**) e seus derivados exibem uma ampla gama de atividades biológicas e são comumente usados como precursores para a síntese de moléculas bioativas. Deste modo Khan *et al.* avaliaram a atividade antiureolítica de vários derivados do ácido barbitúrico (KHAN *et al.*, 2011). O melhor resultado observado foi para o composto com

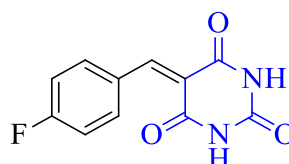
1 o flúor em posição *para* no anel fenila, que influenciou positivamente na inibição da urease  
 2 (VIII, Figura 9), apresentando valor de IC<sub>50</sub> de 13,0 μM.

3

4 **Figura 9.** Estruturas químicas do ácido barbitúrico (VII, em azul) e de seu derivado (VIII)  
 5 como inibidores de urease. Adaptado de (KHAN *et al.*, 2011).



6 **Ácido barbitúrico**  
 7 **(VII)**



8 **IC<sub>50</sub> = 13,0 μM**  
 9 **(VIII)**

6

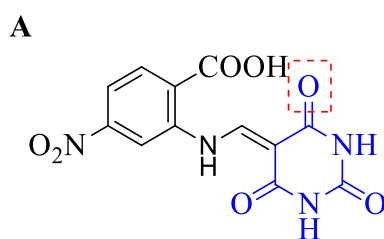
7 **Fonte:** Autoria própria.

8

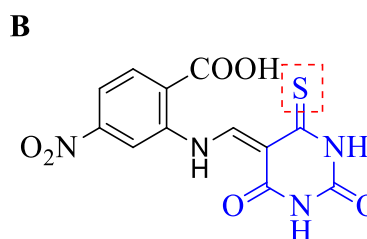
9 Rauf *et al.* fizeram uma avaliação comparativa da ação inibitória entre derivados do  
 10 ácido barbitúrico (IX, Figura 10A) e do tiobarbitúrico (X, Figura 10B), onde os derivados do  
 11 ácido tiobarbitúrico apresentaram maior inibição do que os seus análogos oxigenados  
 12 correspondentes, com melhor valor de IC<sub>50</sub> observado de 8,53 μM.

13

14 **Figura 10.** Estrutura dos derivados do ácido barbitúrico (IX, em azul) e do ácido tiobarbitúrico  
 15 (X, em azul), como inibidores de urease UCE. Adaptado de (RAUF *et al.*, 2011).



16 **Sem atividade**  
 17 **(IX)**



18 **IC<sub>50</sub> = 8,53 μM**  
 19 **(X)**

16

17 **Fonte:** Autoria própria.

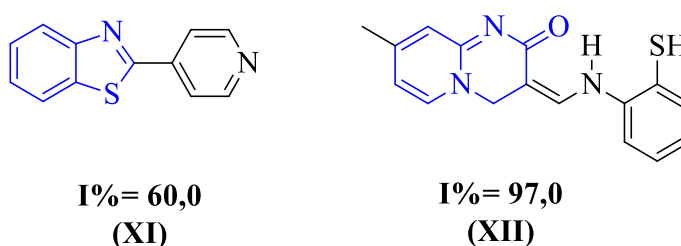
18

19 A química de compostos heterocíclicos tem sido um campo atrativo para uma  
 20 variedade de estudos de atividade biológicas devido à sua vasta característica estrutural. Alguns  
 21 pesquisadores têm explorado o uso de heterociclos sulfurados como inibidores de ureases,  
 22 principalmente benzotiazóis. Araujo e colaboradores, sintetizaram 2-arylbenzotiazóis (XI,  
 23 **Figura 11**) e obtiveram resultados de inibição enzimática de UCE de até 60% comparada ao

1 padrão hidroxioureia utilizado (PEREIRA ARAUJO *et al.*, 2015). Heterociclos de 6 membros  
 2 como piridinonas, piridopirimidina, também são estudados como inibidores. Por exemplo, Rauf  
 3 *et al.*, avaliaram o potencial de piridopirimidinas (**XII**, **Figura 11**), relataram que a presença do  
 4 grupo S-H é determinante para a atividade inibitória da urease, apresentando valores de %I =  
 5 97% na maior concentração testada (100  $\mu$ M).

6

7 **Figura 11.** Derivados contendo os heterociclos benzotiazol (**XI**, em azul) e piridopirimidina  
 8 (**XII**, em azul) como inibidores de urease UCE. Adaptado de (PEREIRA ARAUJO *et al.*,  
 9 2015; RAUF *et al.*, 2012).



10

11 **Fonte:** Autoria própria.

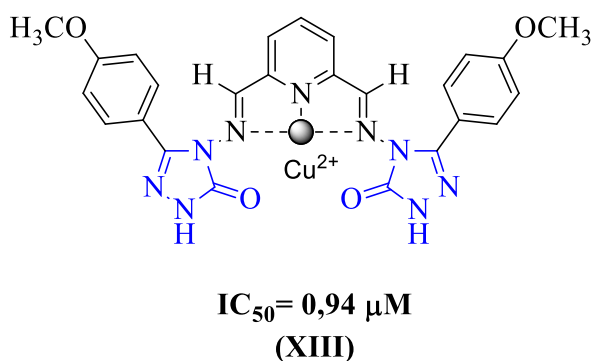
12

13 Um estudo desenvolvido por Hanif e colaboradores (2019) relata a interessante síntese  
 14 de um derivado contendo dois anéis triazólicos, complexados com cobre, níquel ou paládio. Os  
 15 resultados da triagem indicam que essas moléculas podem atuar como inibidores da urease UCE  
 16 apresentando atividade inibitória comparável à da tioureia usada como referência,  
 17 especialmente o complexo de cobre (**XIII**, **Figura 12**), cujo valor de  $IC_{50}$  foi de 0,94  $\mu$ M  
 18 (HANIF *et al.*, 2019).

19

20 **Figura 12.** Estrutura do complexo de cobre com um derivado triazólico (**XIII**, em azul) como  
 21 inibidor de urease. Adaptado de (HANIF *et al.*, 2019).

22



23

24 **Fonte:** Autoria própria.

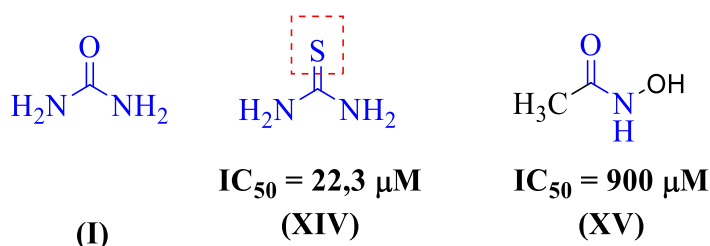
1

2 Como dito anteriormente, derivados de ureia (**I**, **Figura 13**), substrato natural da  
 3 enzima urease são promissores devido à sua semelhança estrutural. Assim como derivados de  
 4 tioureia (**XIV**, **Figura 13**), relatada por apresentar atividade inibitória contra ureases  
 5 apresentando valores de  $IC_{50} = 22,3 \mu M$  (HANIF *et al.*, 2012; KISTIAKOWSKY; SHAW,  
 6 1953).

7 Os derivados de ácido hidroxâmico são reconhecidos como inibidores de urease desde  
 8 a década de 1960. Dentre eles, destaca-se o ácido acetohidroxâmico (**XV**, **Figura 13**), muito  
 9 semelhante estruturalmente à ureia, e que tem como característica atuar como um inibidor  
 10 competitivo pelo sítio ativo da enzima apresentando valores de  $IC_{50}$  e  $K_i$  de  $900 \mu M$  e  $0,05 mM$   
 11 respectivamente (KUMAR; KAYASTHA, 2010).

12

13 **Figura 13.** Estruturas químicas da ureia (**I**), tioureia (**XIV**), e ácido acetohidroxâmico (**XV**),  
 14 como inibidores de urease.



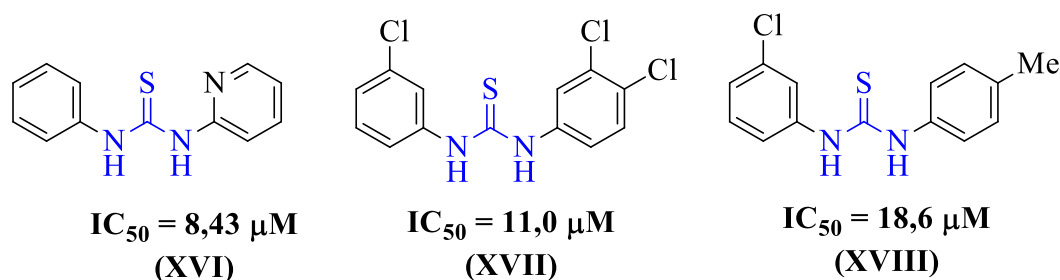
15

16 **Fonte:** Autoria própria.

17

18 Mais recentemente, muitas investigações examinando inibidores da urease a base de  
 19 tioureia, indicam maior potência inibitória destes derivados, do que seus análogos de ureia.  
 20 Deste modo, Khan *et al.*, relatam a síntese de uma variedade de tioureias substituídas (**XVI**-  
 21 **XVII**, **Figura 14**), verificando que substituições com grupos funcionais ligados ao anel fenila  
 22 ou heterocíclico ao redor do núcleo de tioureia e/ou com substituintes halogenados exercem um  
 23 efeito significativo na atividade inibitória da urease de UCE, podendo acarretar valores de  $IC_{50}$   
 24 de até  $8,43 \mu M$  (HANIF *et al.*, 2019; KHAN *et al.*, 2014).

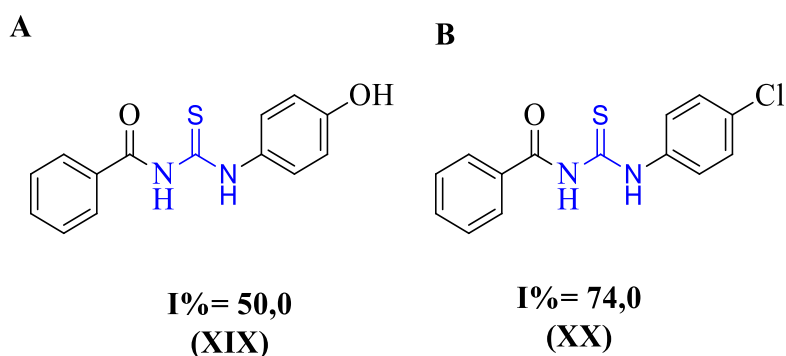
1 **Figura 14.** Derivados de tiourea (em azul) como inibidores de urease de UCE. Adaptado de  
 2 (KHAN *et al.*, 2014).



3  
 4 **Fonte:** Autoria própria.

5  
 6 Nosso grupo de pesquisa, tem desenvolvido estudos sobre a capacidade inibitória de  
 7 benzoiltioureas contra ureases. Em 2015, Brito *et al.*, revelaram que benzoiltioureas atuam  
 8 como inibidores de ureases presente em solo, apresentando valores de porcentagem de inibição  
 9 (%I) de até 50,0% para o melhor composto (XIX, **Figura 15A**) e também em avaliação *in*  
 10 *vitro* para urease de UCE, apresentando %I = 74,0% (XX, **Figura 15B**), apresentando melhor  
 11 perfil inibitório do que os inibidores de referência, tiourea (23,0%), hidroxitiourea (73,0%) e  
 12 NBPT (40,0%) (BRITO *et al.*, 2015).

13  
 14 **Figura 15.** Benzoiltioureas (XIX e XX, tiourea em azul) como inibidores de ureases presentes  
 15 em solo e UCE. Adaptado de (BRITO *et al.*, 2015).



16  
 17 **Fonte:** Autoria própria.

18  
 19 Os resultados promissores do nosso grupo de pesquisa na avaliação da atividade  
 20 inibitória da urease de UCE por benzoiltioureas, além do vasto conhecimento disposto nos  
 21 estudos relatados na literatura no desenvolvimento de inibidores, exemplificados aqui  
 22 brevemente, instigaram a nossa curiosidade quanto uma classe de compostos heterocíclicos, do  
 23 tipo aciltioureas ou acilureias cíclicas, comumente denominadas hidantoínas (imidazolidin-

1 2,4-diona) e tioidantoínas (2-tioxo-imidazolidin-4-ona), que iremos discutir a seguir.

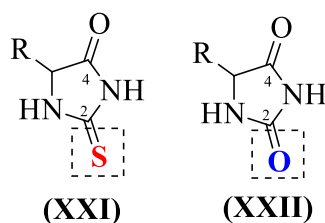
2 1.2.1 Aciltioureas ou Acilureias Cíclicas – Tioidantoínas e Hidantoínas

3

4 As 2-tioxo-imidazolidin-4-onas (**XXI, Figura 16**) também conhecidas como  
5 tioidantoínas (ou 2-tioidantoínas), são compostos heterocíclicos de cinco membros, derivados  
6 sulfurados das hidantoínas (imidazolidin-2,4-diona) (**XXII, Figura 16**), contendo dois átomos  
7 de nitrogênio nas posições 1-3, um grupo tioxo na posição C-2 e um grupo carbonílico na  
8 posição C-4.

9

10 **Figura 16.** Estrutura geral para tioidantoína (**XXI**) e hidantoína (**XXII**) (em destaque, a  
11 substituição do enxofre, em vermelho, por oxigênio, em azul).



12

13 **Fonte:** Autoria própria.

14

15 Tioidantoínas são sutilmente mais ácidas (pKa 8,5) que hidantoínas (pKa 9,12)  
16 (WARE, 1950). Seu caráter ácido está associado à dissociação do próton ligado ao átomo N-3,  
17 e ao efeito de dispersão da carga negativa devido ao volume do átomo de enxofre. Os autores  
18 ainda relatam que os compostos tiocarbonilados e seus derivados são mais facilmente  
19 sintetizados, isolados e reativos do que os compostos carbonilados (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008;  
20 WARE, 1950).

21

22 Tioidantoínas e hidantoínas tem sido extensivamente investigadas devido a sua versátil  
23 aplicação biológica, atuando muitas vezes como um grupamento farmacofórico no  
24 planejamento e síntese de derivados bioativos. Esses compostos fornecem quatro posições  
25 facilmente suscetíveis a derivatizações possibilitando a introdução de grupos capazes de atuar  
26 como doadores/aceptores de ligações de hidrogênio ou grupos hidrofóbicos, visando favorecer  
27 interações com seus alvos moleculares. Artigos de revisão relatam as importantes atividades  
28 biológicas de tioidantoínas e hidantoínas, dentre elas: anticâncer, anti-inflamatória,  
29 antidiabética, anticonvulsivante, antiagregante plaquetária, anti-HIV (do inglês, *Human  
30 Immunodeficiency Virus*), antifibrilítica, contra doenças metabólicas, atividade relacionada ao  
sistema nervoso central, antitussígena, citoprotetora e contra disfunção erétil (CHO; KIM;

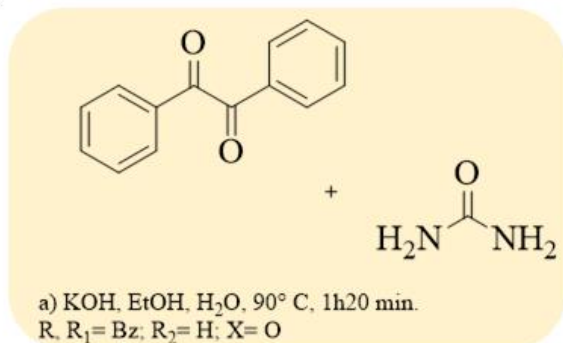
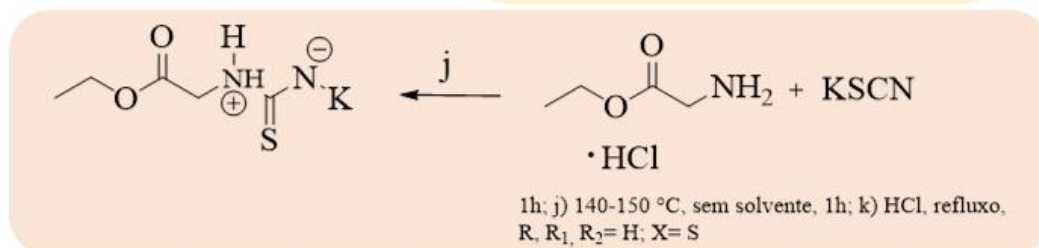
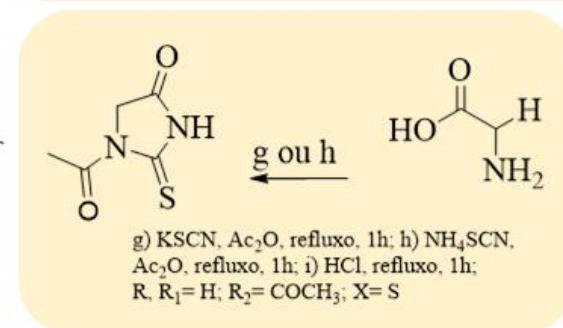
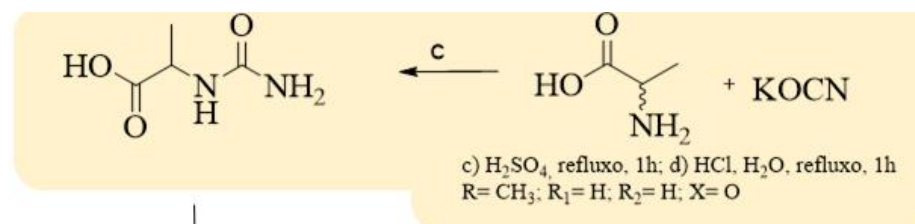
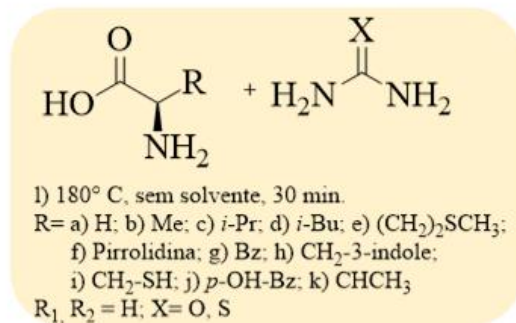
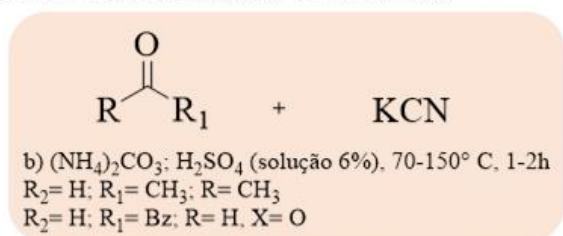
1 SHIN, 2019).

2           Adicionalmente, nosso grupo de pesquisa, relatou recentemente a atividade  
3 antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas por tioidantoínas (DE  
4 CARVALHO *et al.*, 2018). Cabe ressaltar, que até o presente momento as tioidantoínas e  
5 hidantoínas não são relatadas como possíveis inibidores de urease, o que encorajou nossos  
6 estudos nesta área.

7

#### 8 1.2.1.1 Síntese de tioidantoínas e hidantoínas

9           Vários métodos sintéticos foram desenvolvidos para preparação de tioidantoínas e  
10 hidantoínas. Os mais comumente usados são o tratamento de  $\alpha$ -amino ácidos na presença de  
11 anidrido acético seguido de reação com tiocianato de amônio ou reações de condensação direta  
12 com ureia e tioureia, além de reações com compostos benzílicos como, por exemplo, difenil-  
13 etanodiona (**Figura 17**). A seguir, citaremos algumas das metodologias mais usuais para  
14 obtenção destes compostos (KONNERT *et al.*, 2017).

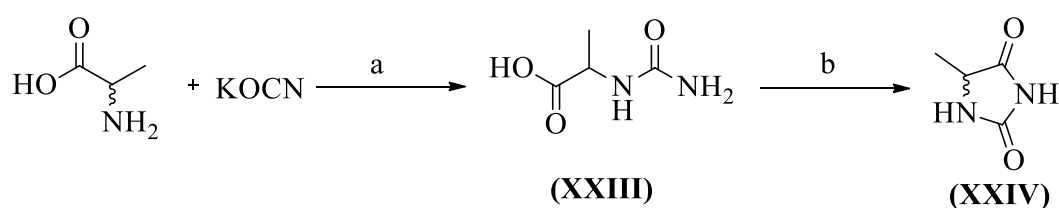
1 **Figura 17.** Principais métodos de síntese para a obtenção de tioidantoínas ou hidantoínas.*Compostos benzílicos e ureia**Compostos carbonílicos e cianetos*

2

3 **Fonte:** Autoria própria.

O anel hidantoínico foi primeiramente descoberto por Baeyer em 1861 durante a realização de suas pesquisas com ácido úrico (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008). No entanto, a primeira rota sintética para hidantoínas foi descrita em 1873 por Urech envolvendo a reação da alanina com cianato de potássio na presença de ácido sulfúrico, passando pelo intermediário **XXIII**, que foi submetido a ciclização na presença de HCl (ácido clorídrico), obtendo-se assim a metil-hidantoína (**XXIV**, **Esquema 2**) (URECH, 1873).

**Esquema 2.** Síntese de metil-hidantoína (**XXIV**) a partir do aminoácido alanina e cianato de potássio. Adaptado de (URECH, 1873).

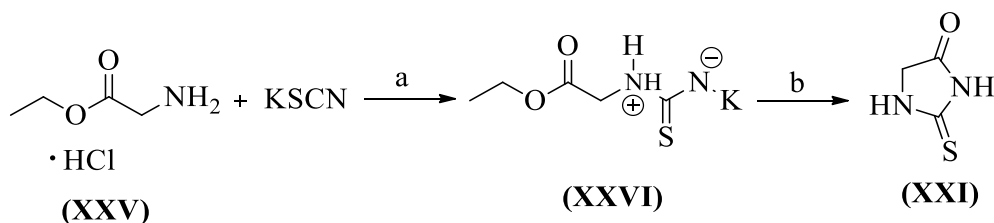


**Reagentes e condições:** a)  $H_2SO_4$ , refluxo, 1h; b)  $HCl$ ,  $H_2O$ , refluxo, 1h.

**Fonte:** Autoria própria.

Já a primeira síntese de tioidantoínas foi proposta por Klason em 1890, onde o autor relata a reação do cloridrato 2-aminoacetato de etila (**XXV**, **Esquema 3**) com tiocianato de potássio, aquecidos juntos, na ausência de solvente, passando pelo intermediário **XXVI** (**Esquema 3**), que foi submetido a posterior ciclização com ácido clorídrico (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008).

**Esquema 3.** Síntese da tioidantoína (**XXI**) a partir da reação do cloridrato 2-aminoacetato de etila com tiocianato de potássio. Adaptado de (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008)



**Reagentes e condições:** a) 140-150 °C, sem solvente, 1h; b)  $HCl$ , refluxo, 1h.

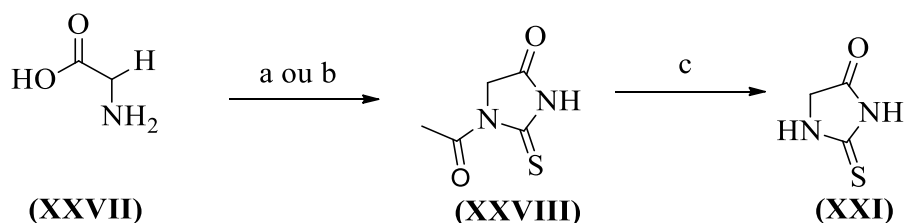
**Fonte:** Autoria própria.

Posteriormente em 1911, Komatsu sintetizou a tioidantoína a partir da reação entre tiocianato de sódio e glicina (**XXVII**, **Esquema 4**). Ele observou que a glicina reagiu com o

1 tiocianato de potássio (condição **a**) ou de amônio (condição **b**) (REYES; BURGESS, 2006) na  
 2 presença de anidrido acético, resultando em uma tioidantoína acetilada (1-acetil-2-tioidantoína)  
 3 (**XXVIII**, **Esquema 4**). Posteriormente, essa substância pode ser convertida em uma  
 4 tioidantoína através da reação de hidrólise com um ácido forte como o ácido clorídrico  
 5 (**Esquema 4c**). (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008)

6

7 **Esquema 4.** Obtenção de 1-acetil-2-tioidantoína (**XXVIII**) a partir da reação da glicina com  
 8 (**a**) tiocianato de potássio ou (**b**) tiocianato de amônio. Seguida da obtenção da 2-tioidantoína  
 9 (**XXI**) a partir da reação com HCl (**c**). Adaptado de ( DE OLIVEIRA *et al.*, 2008; REYES;  
 10 BURGESS, 2006).



11

12 **Reagentes e condições:** a)  $KSCN$ ,  $Ac_2O$ , refluxo, 1h; b) a)  $NH_4SCN$ ,  $Ac_2O$ , refluxo, 1h c)  $HCl$ ,  
 13 refluxo, 1h.

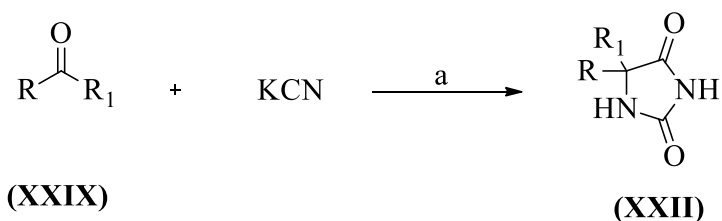
14 **Fonte:** Autoria própria.

15

16 Bucherer e Lieb propuseram uma rota simples para obtenção de hidantoínas a partir  
 17 de compostos carbonilados (**XXIX**, **Esquema 5**) com cianeto de potássio e carbonato de  
 18 amônio (BUCHERER; LIEB, 1934).

19

20 **Esquema 5.** Síntese de hidantoínas (**XXII**) a partir de compostos carbonilados (**XXIX**), cianeto  
 21 de potássio e carbonato de amônio. Adaptado de (BUCHERER; LIEB, 1934).



a)  $R_1 = CH_3$ ;  $R = CH_3$

b)  $R_1 = CH_3$ ;  $R = CH_2-COO-CH_2CH_3$

c)  $R_1 = CH_2CH_3$ ;  $R = CH_3$

d)  $R_1 = Bz$ ;  $R = H$

e)  $R_1 = Bz$ ;  $R = CH_3$

f)  $R_1 = Bz$ ;  $R = CH_2CH_3$

g)  $R_1 = CH_2-Bz$ ;  $R = H$

h)  $R_1 = CH_2-Bz$ ;  $R = CH_3$

i)  $R_1 = CH_2-Bz$ ;  $R = CH_2-Bz$

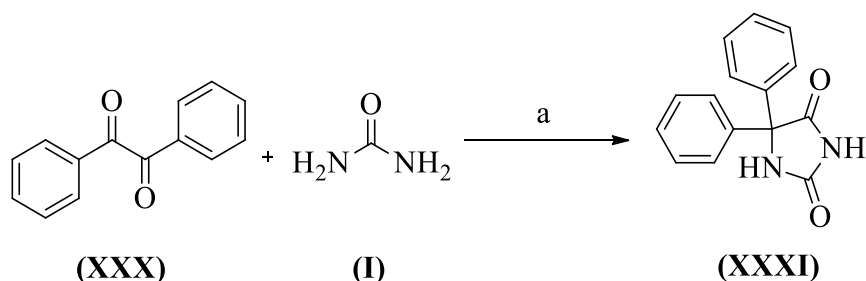
22

23 **Reagentes e condições:** a)  $(NH_4)_2CO_3$ ;  $H_2SO_4$  (solução 6%), 70-150° C, 1-2h.

24 **Fonte:** Autoria própria.

1  
2 A fenitoína (**XXXI**), um antiepilético, introduzido para uso clínico em 1938, foi  
3 desenvolvido pela síntese de Biltz, relatada pela primeira vez em 1908 (HESSELINK, 2018).  
4 A síntese consiste na dupla condensação da ureia (**I**) e compostos benzílicos (**XXX**) em  
5 condições básicas ou fortemente ácidas (**Esquema 6**). Recentemente, alguns avanços são  
6 descritos, como o uso de catálise heterogênea, irradiação por micro-ondas ou ultrassom  
7 (KONNERT *et al.*, 2017).

8  
9 **Esquema 6.** Síntese de Biltz da hidantoína (**XXXI**) a partir de compostos benzílicos (**XXX**) e  
10 ureia. Adaptado de (KONNERT *et al.*, 2017).

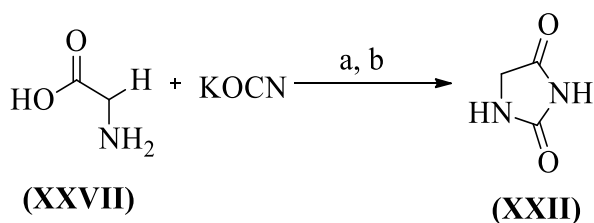


11  
12 **Reagentes e condições:** a) KOH, EtOH, H<sub>2</sub>O, 90° C, 1h20min.

13 **Fonte:** Autoria própria.

14  
15 A obtenção de hidantoínas também é relatada pela síntese a partir de aminoácidos,  
16 como a glicina (**XXVII**), com cianato de sódio ou potássio, em solução aquosa, com posterior  
17 ciclização na presença de HCl (**Esquema 7**) (SCHÖRGHUBER *et al.*, 2015).

18  
19 **Esquema 7.** Síntese da hidantoína (**XXII**) a partir da glicina (**XXVII**) e cianato de potássio.  
20 Adaptado de (SCHÖRGHUBER *et al.*, 2015).



21  
22 **Reagentes e condições:** a) H<sub>2</sub>O, 100° C, 3h; b) HCl, 120° C, 4h.

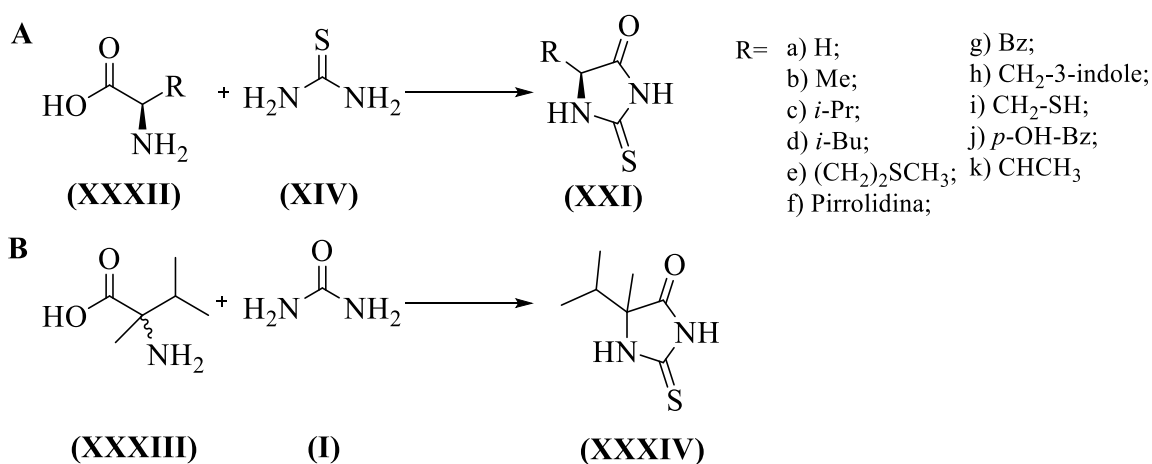
23 **Fonte:** Autoria própria.

24  
25 Ainda, obtidas por reações com aminoácidos, Wang *et al.*, relataram em 2006, um  
26 método simples para a preparação de derivados tioidantoinicos a partir da condensação direta

1 de *L*-aminoácidos (XXXII) com a tioureia (XIV), que utiliza um princípio da química verde,  
 2 por não utilizar solventes (Esquema 8A) (WANG; SHEIKH; ZHANG, 2006). Ichitani *et al.*,  
 3 relataram a síntese da hidantoína (XXXIV) derivada de  $\alpha$ -metil-*DL*-valina (XXXIII), baseados  
 4 na mesma metodologia (Esquema 8B) (ICHITANI *et al.*, 2014).

5

6 **Esquema 8.** Síntese de tioidantoínas a partir de amino ácidos e (A) tioureia e (B) ureia.  
 7 Adaptado de (WANG; SHEIKH; ZHANG, 2006).



8

9 **Reagentes e condições:** (A-B) 180° C, sem solvente, 30 min.

10 **Fonte:** Autoria própria.

11

12 De fato, desde 1873, muitas metodologias foram aprimoradas, e avanços em novas  
 13 condições como tecnologias modernas como ultrassom (KONNERT *et al.*, 2017), irradiação  
 14 por micro-ondas (KONRATH; PIEDADE; EIFLER-LIMA, 2012) ou reações livre de solventes  
 15 (WANG; SHEIKH; ZHANG, 2006) foram empregadas para a síntese de tioidantoínas e  
 16 hidantoínas, que indicam rotas sintéticas simples e com versatilidade, o que oferece ao químico  
 17 medicinal uma gama completa de novos derivados.

18

### 19 1.3 TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIUREOLÍTICA.

20

21 A avaliação da atividade antiureolítica pode ser realizada por diversas técnicas  
 22 instrumentais como espectroscopia no UV-visível e de fluorescência, espectrometria de massas,  
 23 até as mais modernas como ressonância magnética nuclear (RMN) e cromatografia de  
 24 afinidade, ou ainda computacionais, como a modelagem molecular (MACIEL, 2019).

25

26 *in vitro* da urease de UCE por tioidantoínas e hidantoínas. A primeira, envolve o método

1 colorimétrico da reação de indofenol (ou reação de Berthelot), sendo uma análise da absorção  
2 no UV-visível e a segunda, a metodologia de STD (do inglês, *Saturation Transfer Difference*)  
3 por RMN. Relatamos também a avaliação das interações ligante-proteína com o uso da técnica  
4 computacional de modelagem molecular, ambas descritas a seguir.

5

### 6 1.3.1 Determinação da Atividade Inibitória por Método Colorimétrico (Reação de Indofenol).

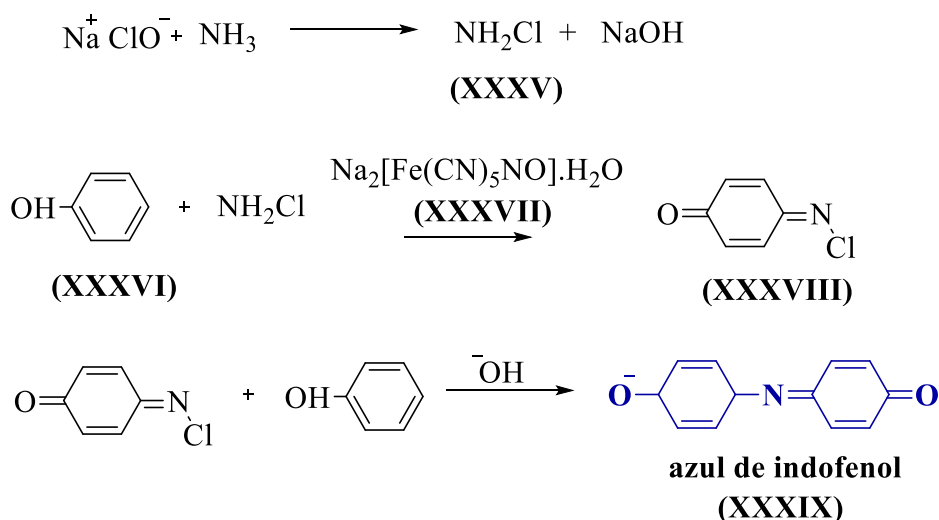
7

8 A reação de indofenol foi descrita para a determinação colorimétrica de amônia, em  
9 1967 por Weatherburn (WEATHERBURN, 1967), e é mundialmente utilizada para  
10 determinação em amostras biológicas. O experimento consiste na reação entre a amônia, fenol  
11 e hipoclorito de sódio na presença de um catalisador, o nitroprussiato de sódio, que aumenta a  
12 velocidade de formação do composto azul (**XXXIX**) (SEARCY *et al.*, 1965). A sequência  
13 reacional, é mostrada no **Esquema 9** (DEEPA; BALASUBRAMANIAN; NAGARAJA, 2003).

14

15

1 **Esquema 9.** Sequência reacional proposta para a reação de indofenol com amônia. Adaptado  
 2 de (MACIEL, 2019).



3

4 **Fonte:** Autoria própria.

5

6 Em um primeiro momento, a amônia reage com o hipoclorito de sódio para a formação  
 7 de uma monocloramina (XXXV), que posteriormente reage com o fenol (XXXVI) na presença  
 8 do catalisador, nitroprussiato de sódio (XXXVII), para a formação do produto intermediário  
 9 benzoquinonaclorimina (XXXVIII). Esse intermediário reage com uma molécula adicional de  
 10 fenol, formando o composto denominado azul de indofenol (XXXIX), tornando a coloração do  
 11 meio azulada, com aumento na sua intensidade conforme o aumento da quantidade de amônia  
 12 no meio reacional (DEEPA; BALASUBRAMANIAN; NAGARAJA, 2003).

13 Uma vez que a urease catalisa a hidrólise da ureia, gerando carbamato e amônia, essa  
 14 técnica simples pode ser utilizada para quantificar a quantidade de amônia liberada através da  
 15 absorção da amostra por espectroscopia UV-visível (630 nm).

16

### 17 1.3.2 Estudo de Interação Ligante-Proteína em Nível Molecular

#### 18 1.3.2.1 A RMN no estudo de macromoléculas

19 O papel da RMN como ferramenta estrutural para proteínas foi ampliado ao longo  
 20 dos anos à medida que seu desempenho aumentou. As técnicas bidimensionais foram  
 21 introduzidas nos anos 1970 e 1980 por Jean Jeener, e Ernst (AUE; BARTHOLDI; ERNST,  
 22 1976). Posteriormente, as técnicas tridimensionais foram implementadas por Kurt Wüthrich,  
 23 laureado com o Prêmio Nobel em Química, em 2002, por seu desenvolvimento da

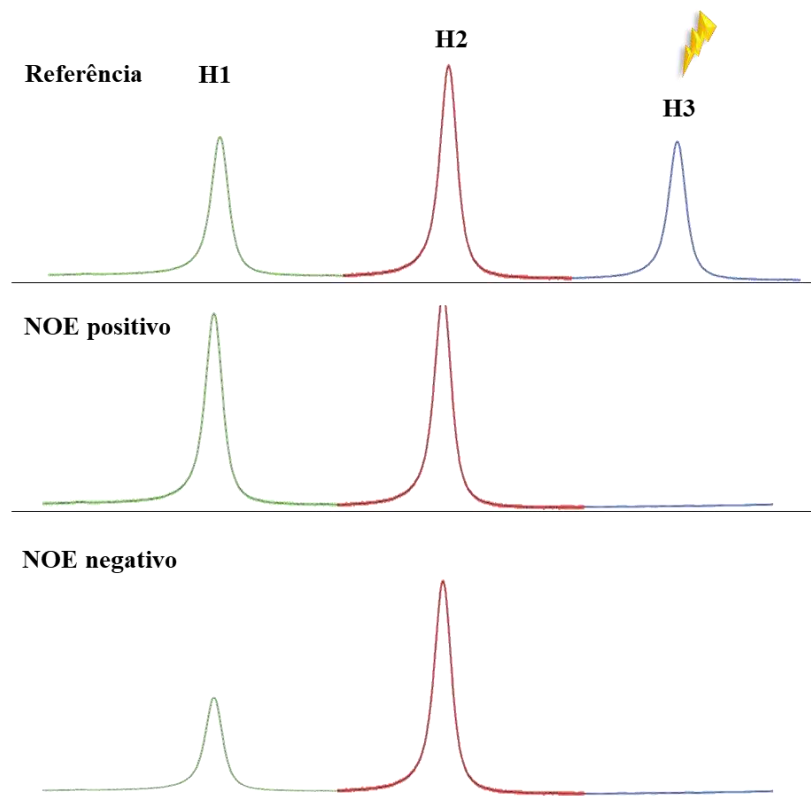
1 espectroscopia de ressonância magnética nuclear para determinar a estrutura tridimensional de  
2 macromoléculas biológicas em solução. Aprimoramento de ferramentas que permitiram  
3 análises estruturais apuradas e o estudo detalhado da dinâmica molecular (MARION, 2013).

4 A espectroscopia de RMN se tornou a mais abrangente ferramenta para estudar  
5 interações moleculares em solução, e tornou-se uma técnica essencial para caracterizar eventos  
6 de reconhecimento molecular de pequenos ligantes com macromoléculas biologicamente  
7 relevantes (proteínas ou ácidos nucleicos) (COELHO *et al.*, 2015).

#### 8 *1.3.2.1.1 Efeito nuclear overhauser (NOE)*

9 O NOE é definido como a mudança na intensidade de ressonância de um núcleo que  
10 ocorre quando as transições de spin de uma outra são saturadas. A **Figura 17** exemplifica esse  
11 comportamento, onde uma vez que a ressonância de H3 (azul) é irradiada, se observa um  
12 aumento (NOE positivo) ou diminuição (NOE negativo) da intensidade do sinal de ressonâncias  
13 de outros núcleos espacialmente próximos (H1, verde) (NEUHAUS, 2011).

1 **Figura 18.** Exemplificação do efeito NOE pela irradiação do H3 (azul) que exerce aumento  
 2 (NOE positivo) ou diminuição (NOE negativo) sobre as intensidades observadas para os  
 3 sinais de seus H vizinhos. Considerando-se que H1 (verde) está próximo espacialmente de  
 4 H3, e H2 (vermelho) distante espacialmente de H3.



5  
 6 **Fonte:** Adaptado de (COELHO *et al.*, 2015).

7

8 A magnitude do efeito NOE é expressa pela **Equação 1**, onde  $f_I \{S\}$  indica a mudança  
 9 fracionária na intensidade do sinal de um núcleo I após a saturação de um núcleo S. I e  $I^0$  são a  
 10 intensidade do sinal com e sem irradiação, respectivamente (NEUHAUS, 2011).

11

$$12 \quad f_I \{S\} = \frac{I - I^0}{I^0} \quad (1)$$

13

14 A detecção de um NOE apreciável entre dois *spins* indica que existe uma distância  
 15 internuclear relativamente curta entre eles, geralmente menor que 4 ou 5 Å. Essa proximidade  
 16 através do espaço faz com que um sistema de dois núcleos homonucleares de *spin* 1/2  
 17 compartilhem um acoplamento dipolar, de modo a se detectar a interação magnética direta no  
 18 espaço entre os dois *spins* em interação (COELHO *et al.*, 2015; NEUHAUS, 2011).

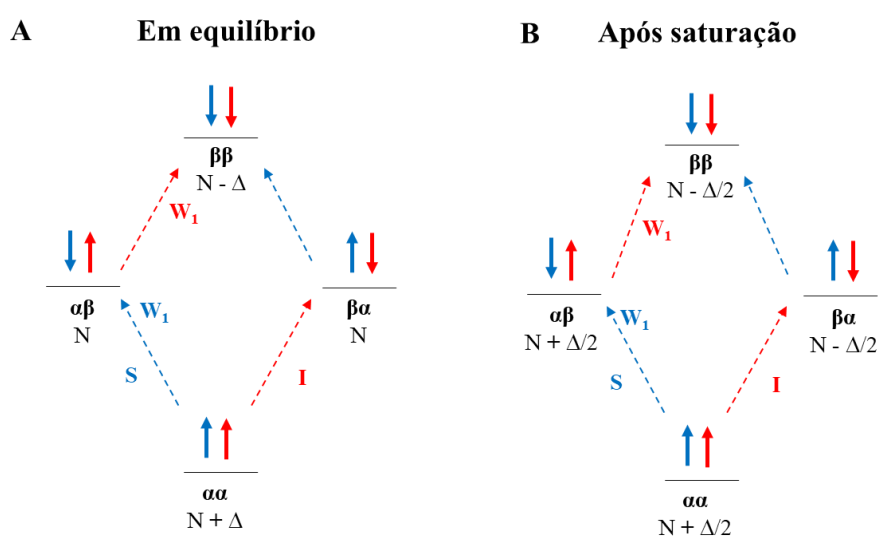
19 O efeito NOE, atua com o princípio da transferência de polarização de *spin* nuclear de  
 20 uma população de núcleos com *spin* ativo para outro através da relaxação cruzada. Quando a

1 população de *spins* é perturbada por um campo de rádio frequência (RF), isto resulta numa  
 2 frequência da energia de transição para população de *spins* retornar ao equilíbrio (NEUHAUS,  
 3 2011).

4 Para se perceber o fenômeno do NOE, é necessário olhar para as transições possíveis  
 5 para a relaxação dos dois núcleos de spin  $1/2$ , representado na **Figura 18**, por **S** (núcleo que é  
 6 saturado por um pulso de RF) e **I** (núcleo que compartilha acoplamento dipolar com S), sendo  
 7 demonstrado os quatro níveis de energia:  $\alpha\beta$ ,  $\beta\alpha$ ,  $\alpha\alpha$  e  $\beta\beta$ . Os rótulos **W** representam as  
 8 probabilidades de transição por unidade de tempo entre os níveis de energia, sendo **W<sub>0</sub>** e **W<sub>2</sub>**,  
 9 responsáveis pelo efeito NOE (ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY; ATIA-TUL-WAHAB,  
 10 2016).

11

12 **Figura 19.** Diagrama do nível de energia para um sistema de rotação homonuclear **I** e **S**,  
 13 mostrando probabilidades de transição e estados de rotação. (A) Condição em equilíbrio e (B)  
 14 condição após saturação de **S**.



15

16 **Fonte:** Autoria própria.

17

18 Primeiramente, vamos considerar o diagrama de nível de energia dos dois núcleos **I** e  
 19 **S** que estão próximos no espaço, sendo **I** o observado e **S** sendo o irradiado. O estado  $\alpha\alpha$   
 20 corresponde a ambos os núcleos no estado de energia mais baixa, o estado  $\beta\beta$  representa ambos  
 21 estão no estado de energia superior. As combinações  $\alpha\beta$  e  $\beta\alpha$ , um dos dois núcleos está no  
 22 estado de energia inferior, enquanto o outro está no estado de energia superior. Levando em  
 23 consideração a distribuição de Boltzmann, no equilíbrio térmico o estado  $\alpha\alpha$  possui a população  
 24 de *spins* mais alta, enquanto os estados  $\alpha\beta$  e  $\beta\alpha$  possuem populações intermediárias, e o estado

1  $\beta\beta$  corresponde à população mais baixa (**Figura 19A**) (ATTA-UR-RAHMAN;  
2 CHOUDHARY; ATIA-TUL-WAHAB, 2016).

3 Em um primeiro momento, para as transições em estado de equilíbrio, vamos  
4 considerar as transições que envolvem uma inversão de um dos *spins*, a transição simples  
5 quântica (do inglês, *single quantum transition*)  $W_1$ . A diferença populacional para essas  
6 transições é igual a  $\Delta$  (delta), tanto para o núcleo **S** quanto para **I** (**Figura 19A**) (ATTA-UR-  
7 RAHMAN; CHOUDHARY; ATIA-TUL-WAHAB, 2016).

8 Agora, considerando essas populações imediatamente após o pulso ser aplicado ao  
9 núcleo **S** (estado saturado, **Figura 19B**), podemos perceber que os níveis populacionais são  
10 rapidamente igualados. Observamos que o excesso populacional para as transições  $W_1$  de **S**  
11 agora é igual a zero, mas não há mudança imediata na diferença nos níveis populacionais  
12 conectados pelas transições  $W_1$  de **I**, que continua a ser  $\Delta$ , como no estado de equilíbrio (ATTA-  
13 UR-RAHMAN; CHOUDHARY; ATIA-TUL-WAHAB, 2016).

14 Uma vez que o estado de equilíbrio foi perturbado, o sistema tenta restaurar o  
15 equilíbrio, utilizando duas transições que envolvem a inversão simultânea de ambos os *spins*,  
16 transição duplo-quântica (do inglês, *double-quantum transition*)  $W_2$  e transição zero-quântica  
17 (do inglês, *zero quantum transition*)  $W_0$ . São essas duas transições que são responsáveis pelo  
18 efeito NOE observado, pois é por meio delas que a saturação do núcleo **S** afeta a intensidade  
19 do núcleo **I** (ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY; ATIA-TUL-WAHAB, 2016).

20 Vamos considerar primeiro a transição  $W_2$ , onde o sistema tenta restabelecer o estado  
21 de equilíbrio transferindo alguma população  $x$  do estado  $\beta\beta$  para o estado  $\alpha\alpha$  (**Figura 19B**). Se  
22 examinarmos agora o resultado deste ajuste populacional nas transições  $W_1$  de **I**, verificamos  
23 que a diferença agora é  $\Delta + x$  e esse aumento populacional resulta na intensidade observada do  
24 sinal, ou seja um NOE positivo, observado principalmente para pequenas moléculas, que  
25 possuem rotações mais rápidas e curtos tempos de correlação ( $\tau_C$ ), onde deste modo as  
26 transições  $W_2$  são predominantes (ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY; ATIA-TUL-  
27 WAHAB, 2016).

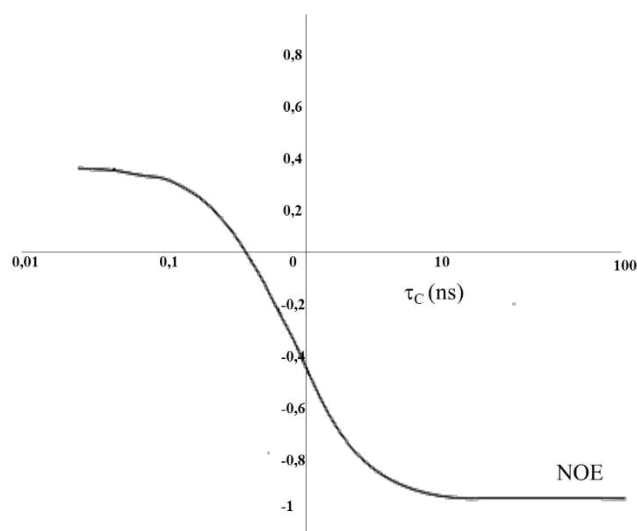
28 Já para as transições  $W_0$ , uma parte da população  $x$  agora é transferida do estado  $\alpha\beta$   
29 para o estado  $\beta\alpha$  (**Figura 19B**). Se examinarmos o resultado deste ajuste populacional nas  
30 transições  $W_1$  de **I** verificamos que a diferença agora é  $\Delta - x$ . Essa diminuição populacional  
31 resulta na intensidade observada do sinal, um NOE negativo, para grandes moléculas (proteínas,  
32 enzimas) que possuem rotações mais lentas e tempo de correlação mais longos, onde as  
33 transições  $W_0$  são predominantes (ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY; ATIA-TUL-

1 WAHAB, 2016).

2 A observação do efeito NOE considera a transferência de polarização entre o receptor  
3 e o ligante e na dinâmica do equilíbrio e depende do tempo de correlação ( $\tau_c$ ) das moléculas  
4 ligadas e livres. O tempo de correlação varia aproximadamente com o peso molecular, desta  
5 maneira moléculas pequenas ( $MM < 1000-2000$ ) possuem tempos de correlação muito curtos,  
6 cerca de  $10^{11}$  s ou menos, enquanto moléculas grandes como as proteínas, por exemplo,  
7 possuem tempos de correlação de 5 ns ou mais. Para moléculas pequenas, o efeito NOE é  
8 acumulado muito lentamente e a taxa de relaxação cruzada é positiva, enquanto para proteínas  
9 o NOE aumenta rapidamente e a taxa de relaxação cruzada é negativa (FIGUEIREDO;  
10 MARSAIOLI, 2007; PELLECCCHIA; SEM; WÜTHRICH, 2002). O efeito NOE em função de  
11  $\tau_c$  é mostrado na **Figura 20**.

12

13 **Figura 20.** NOE obtido (linha sólida) em função de  $\tau_c$ . O NOE é de até 0,38 para moléculas  
14 muito pequenas e -1,0 para moléculas grandes. Adaptado de (WILLIAMSON, 2009).



15

16 **Fonte:** Autoria própria.

17

18 Na espectroscopia de RMN para o estudo de interações moleculares, o NOE pode ser  
19 empregado para a determinação de sítios de ligação entre o receptor e o ligante através da  
20 transferência de magnetização, uma vez que pequenas moléculas ao se complexarem, se  
21 comportam como parte da macromolécula adotando seu respectivo NOE (FRIEBOLIN, 2005).

### 22 1.3.2.1.2 Saturation transfer difference (STD)

23 Dentre as técnicas de RMN desenvolvidas baseadas no efeito NOE para a identificação

1 de pequenas moléculas (ligantes) que interagem com uma macromolécula alvo (proteínas ou  
2 ácidos nucleicos), a STD, desenvolvida por Moriz Mayer e Bernd Meyer (2001) (MAYER;  
3 MEYER, 2001), é o método mais popular empregado no estudo de interações de compostos  
4 com alvos moleculares na descoberta de novos candidatos à fármacos (KEMPER *et al.*, 2010).

5 As vantagens de seu uso incluem: ligantes serem diretamente detectados mesmo a  
6 partir de uma mistura complexa de substâncias; obtenção de parâmetros como constante de  
7 dissociação ( $K_D$ ) em uma faixa de  $10^{-3}$  a  $10^{-8}$  M; discriminação entre os prótons do ligante  
8 conforme suas proximidades relativas com os resíduos de aminoácidos da proteína, permitindo  
9 o mapeamento de epítomos e sua alta sensibilidade mesmo com o uso de quantidades  
10 relativamente baixas de proteína, como 1 nM, na presença de excesso de ligante (MAYER;  
11 MEYER, 2001).

12 De maneira simplificada, um ligante complexado à uma macromolécula de interesse,  
13 é considerado um acceptor da transferência de magnetização da proteína. Devido à sua relaxação  
14 lenta, o ligante armazena a saturação recebida durante o contato com a proteína por tempo  
15 suficiente para a detecção após dela se dissociar. Este processo pode ser definido pelo estado  
16 de equilíbrio que segue uma cinética de segunda ordem, descrito pelas taxas de associação ( $k_{on}$ )  
17 e dissociação ( $k_{off}$ ) e sua constante de dissociação termodinâmica de equilíbrio correspondente  
18  $K_D$  (**Equação 2**) (GOSSERT; JAHNKE, 2016; VIEGAS *et al.*, 2011).

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

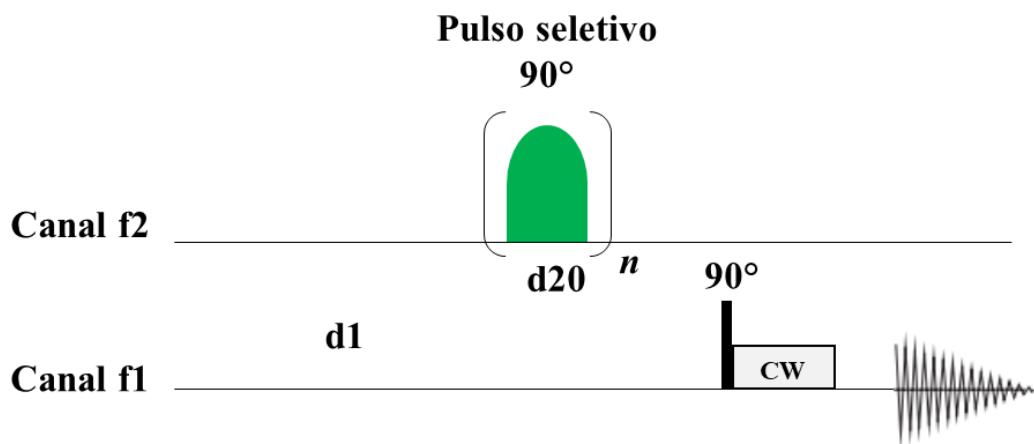
19  
20  
21  
22 Como vimos, o experimento de STD se baseia na transferência de saturação da  
23 proteína para o ligante. Consiste na aquisição de dois espectros independentes da mesma  
24 amostra nas mesmas condições experimentais, através da saturação seletiva por uma  
25 radiofrequência (RF) (LEY *et al.*, 2014).

26 A sequência de pulsos utilizada para o experimento de STD (**Figura 21**) se baseia em  
27 um pulso de  $90^\circ$  seletivo sobre os núcleos de  $^1H$  da proteína, com  $n$  repetições durante todo o  
28 tempo de saturação e de um pulso duro de  $90^\circ$  no canal f1 para a excitação não seletiva.  
29 (BRITO, 2017; LEY *et al.*, 2014).

30

31

1 **Figura 21.** Diagrama da sequência de pulsos do experimento de STD (stddiffesgp.3). *n*: número  
 2 de repetições; **d1**: tempo de espera para iniciar a aquisição; **d20**: tempo de saturação; **CW**: trava  
 3 de spins. Adaptado de (BRITO *et al.*, 2018; PARELLA, 2006).



4  
 5 **Fonte:** Autoria própria.

6

7 Assim, no experimento de STD, o primeiro espectro é adquirido sem a saturação da  
 8 proteína (denominado *off-resonance*, **Figura 22**), com o pulso seletivo aplicado a uma  
 9 frequência em que nenhum dos prótons das proteínas ou dos ligantes ressona (normalmente  
 10 entre 25 a 50 ppm), sendo suas intensidades dadas por ( $I_0$ ). O segundo é adquirido através da  
 11 irradiação seletiva entre 0,50 e -2,00 ppm, região geralmente fora da janela espectral de  
 12 substâncias de baixo peso molecular, mas onde as ressonâncias da proteína têm intensidade  
 13 significativa (denominado *on-resonance*, **Figura 22**). As intensidades dos hidrogênios dos  
 14 ligantes resultantes neste caso são dadas por ( $I_{sat}$ ) (VIEGAS *et al.*, 2011).

15 Finalmente, a subtração (diferença) entre esses dois espectros resultam em um espectro  
 16 onde serão observáveis apenas os sinais do ligante que receberam a transferência de saturação  
 17 da proteína durante a formação do complexo, e conseqüentemente permaneceram com essa  
 18 magnetização após a dissociação. Esta diferença de intensidade dos sinais devido à transferência  
 19 de saturação pode ser quantificada e constitui uma indicação de afinidade de ligação ( $I_{STD}$ ,  
 20 **Figura 22**) (VIEGAS *et al.*, 2011).

21

22

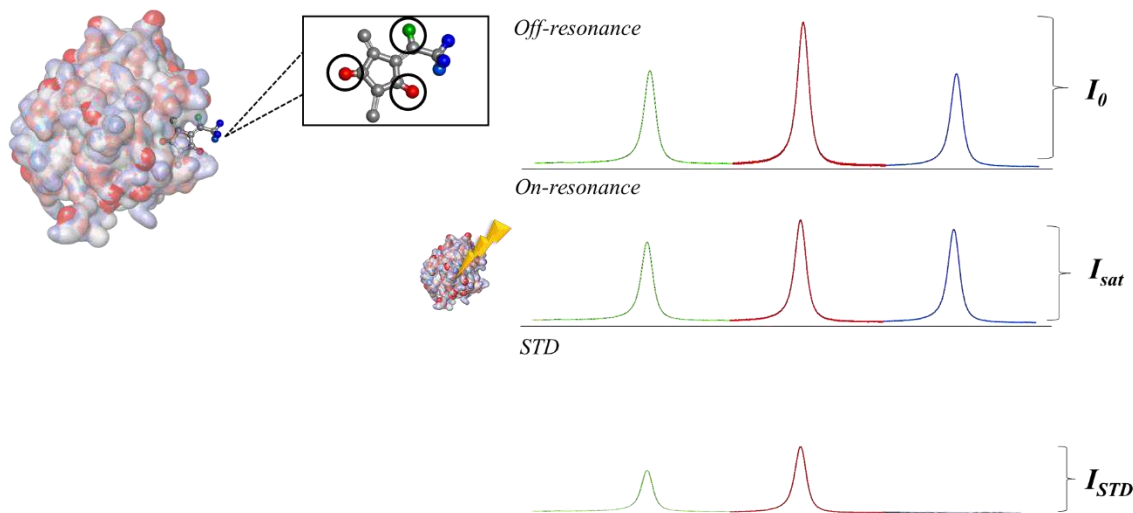
23

24

25

26

1 **Figura 22.** Esquema representativo do experimento de STD, sinais representados pelas cores  
 2 verde e vermelha são dos prótons do ligante que receberam a transferência de saturação da  
 3 proteína.



4

5 **Fonte:** Autoria própria.

6

7 Para quantificar melhor a amplificação de ressonâncias no STD, Mayer e Meyer  
 8 (MAYER; MEYER, 2001) introduziram o conceito “Fator de Amplificação”(A<sub>STD</sub>). Como a  
 9 resposta do STD surge diretamente do complexo receptor-ligante, este é proporcional a  
 10 concentração do ligante em excesso [L<sub>E</sub>], portanto, o A<sub>STD</sub> pode ser determinado pela **Equação**  
 11 **3:**

12

13

$$A_{STD} = \frac{I_0 - I_{SAT}}{I_0} \times \left[ \frac{L_E}{P} \right] = \frac{I_{STD}}{I_0} \times \left[ \frac{L_E}{P} \right] \quad (3)$$

14

15

16

17

O fator de amplificação é obtido multiplicando o efeito STD relativo de um dado  
 hidrogênio (I<sub>STD</sub> / I<sub>0</sub>) em uma dada concentração de ligante ([L]), pela razão molar do ligante  
 em excesso em relação à proteína ([L<sub>E</sub>]/[P]) (MAYER; MEYER, 2001).

18

19

20

21

22

Durante um tempo de saturação determinado, o A<sub>STD</sub> também pode representar o  
 número médio de moléculas de ligante saturadas por molécula de receptor. Tempos de saturação  
 maiores permitem mais moléculas de ligante serem saturadas, desde que haja um excesso deste  
 em relação à proteína. Além disso, o excesso de ligante faz com que seja improvável a entrada  
 de ligantes saturados no local de complexação (VIEGAS *et al.*, 2011).

23

24

25

A definição do A<sub>STD</sub>, também se torna útil para determinação da constante de  
 dissociação (K<sub>D</sub>) providas dos experimentos de STD. Jesús Angulo *et al.*, propuseram que o K<sub>D</sub>  
 pode ser determinado através da **Equação 4** em analogia à Equação de Michaelis Menten (**5**)

1 (ANGULO; ENRÍQUEZ-NAVAS; NIETO, 2010).

$$A_{STD} = \frac{\alpha_{STD}[L]}{K_D + [L]} \quad (4) \rightarrow \quad V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (5)$$

2  
3  
4  
5 Onde,  $A_{STD}$  é o fator de amplificação,  $\alpha_{STD}$  é o fator de amplificação máximo observado,  $[L]$  é a concentração do ligante, e  $K_D$  é a constante de dissociação, e  $V_{max}$  é a velocidade máxima,  $V_0$  é a velocidade inicial da reação,  $K_m$  é a constante de Michaelis Menten, e  $[S]$  é a concentração de substrato.

6  
7  
8  
9 Essa analogia é válida, uma vez que, o fator de amplificação, se assemelha ao comportamento de  $V_0$ , onde o  $A_{STD}$  aumenta proporcionalmente com o aumento do excesso de ligantes até que se atinja uma amplificação máxima (uma vez que  $I_0$  é proporcional a  $[L]$ , e o  $I_{STD} / I_0$  diminui com o aumento da concentração) (ANGULO; ENRÍQUEZ-NAVAS; NIETO, 2010; VIEGAS *et al.*, 2011).

10  
11  
12  
13  
14 Portanto, desde que a concentração de ligante se aproxime da concentração do ligante em excesso, os dados providos do STD em diferentes concentrações podem ser utilizados na **Equação 4** para determinar os valores de  $K_D$  e  $\alpha_{STD}$  (VIEGAS *et al.*, 2011).

#### 15 16 17 18 1.3.2.2 Modelagem molecular

19 A modelagem molecular consiste em um conjunto de técnicas utilizadas para o desenvolvimento de modelos computacionais que visam mimetizar o comportamento de moléculas. No contexto da descoberta de fármacos, modelos são úteis para investigar as propriedades estruturais e moleculares de compostos bioativos, prevendo assim características essenciais para o planejamento de novos compostos bioativos.

20  
21  
22  
23  
24 A modelagem molecular pode ser dividida em dois grupos principais: a abordagem indireta e a direta (BARREIRO *et al.*, 1997). A primeira não exige a informação sobre a topologia do alvo molecular, uma vez que o planejamento é baseado na estrutura do ligante. Enquanto na abordagem direta, o planejamento é realizado baseado na estrutura do receptor, onde é necessário se adquirir o conhecimento do arranjo topológico da macromolécula em estudo. As informações da estrutura tridimensional (3D) do alvo molecular podem ser adquiridas por análise das estruturas obtidas por cristalografia de raio-X e RMN depositadas em bancos de dados como o *Protein Data Bank* (PDB) ou por construções de modelos por homologia.

25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

1 Os principais métodos na abordagem indireta são: (a) Impressão digital molecular (do  
2 inglês, *molecular fingerprint*) que atuam na busca por similaridade de compostos  
3 estruturalmente relacionados ao um ligante bioativo; (b) Modelo farmacofórico, que envolve a  
4 identificação de padrões de propriedades moleculares que satisfaçam um arranjo 3D necessário  
5 para o reconhecimento molecular; e (c) Relação Quantitativa Estrutura/Atividade – QSAR (do  
6 inglês, *Quantitative Structure Activity Relationship*), onde através de descritores moleculares  
7 correlacionados com a atividade biológica, as propriedades moleculares são calculadas  
8 produzindo um modelo matemático para a predição de novas moléculas bioativas (GUIDO;  
9 ANDRICOPULO, 2008). Já os exemplos aplicados mais comuns nos estudos pela abordagem  
10 direta são a docagem molecular (do inglês, *docking molecular*) e simulações de dinâmica  
11 molecular (GUIDO; ANDRICOPULO, 2008; SANT’ANNA, 2009).

#### 12 1.3.2.2.1 *Docagem molecular*

13 A docagem molecular é uma das principais técnicas de modelagem molecular,  
14 primeiramente introduzida em 1982 por Kuntz *et al.* Desde então, veem se aperfeiçoando e  
15 sendo amplamente utilizada para planejamentos de fármacos nos campos da química medicinal  
16 e biologia estrutural, contribuindo significativamente na fase de descoberta de novos compostos  
17 bioativos bem como na otimização de compostos líderes (FARIAS, 2017; KUNTZ *et al.*, 1982).  
18 O processo de docagem molecular pode ser dividido em duas etapas fundamentais, a  
19 determinação do modo de ligação e a predição da afinidade entre uma pequena molécula  
20 (ligante) pelo sítio de interação de uma macromolécula alvo (enzima, proteína, RNA ou DNA)  
21 (GUIDO; ANDRICOPULO, 2008).

22 Diversos programas de docagem molecular estão disponíveis, e diferem entre si em  
23 relação a: (a) Sua função de pontuação, classificadas como funções empíricas, baseadas em  
24 campo de força ou em conhecimento, utilizadas para estimar a afinidade de interação entre o  
25 ligante e a macromolécula em cada pose (soluções) obtida pelo processo de docagem; e (b)  
26 Funções de busca, cujo os métodos de busca utilizados nos algoritmos no processo de docagem  
27 molecular classificam-se como métodos sistemáticos, determinísticos e estocásticos (Leach  
28 2001).

29 O método sistemático explora todos os graus de liberdade de um ligante, que é dividido  
30 em fragmentos. De forma combinatória durante a busca, o fragmento de referência é  
31 incrementado até a reconstituição total do ligante e o encontro da conformação bioativa. Um  
32 exemplo de programa que utiliza este método é o FlexX (MUNIZ, 2018; PICCIRILLO; DO

1 AMARAL, 2018; RAREY *et al.*, 1996).

2 A busca determinística caracteriza-se pela produção da nova conformação a partir da  
3 estrutura inicial do ligante, garantindo a convergência para um mínimo de energia devido a  
4 utilização da dinâmica molecular. Avaliam os movimentos de cada átomo no sistema  
5 predizendo sua posição e velocidade em função do tempo, onde forças exercidas em cada  
6 átomo são calculadas durante toda a trajetória até a obtenção do complexo ligante-alvo  
7 molecular. Um exemplo de programa que utiliza este método é o Surflex-Dock (CORSINI,  
8 2020; RODRIGUES *et al.*, 2012; SPITZER; JAIN, 2012).

9 Por fim, os métodos estocásticos que utilizam abordagens como: (a) Monte Carlo, que  
10 explora o espaço conformacional do ligante visando regiões com mínimo de energia, onde a  
11 conformação inicial é gerada aleatoriamente e a partir desta as demais são geradas por meio de  
12 um critério baseado na energia de ligação. Este método é utilizado, por exemplo, no programa  
13 Glide (do inglês, *Grid-Based Ligand Docking with Energetics*) (CORSINI, 2020; HALGREN  
14 *et al.*, 2004; PICCIRILLO; DO AMARAL, 2018) e (b) Algoritmo genético, baseado na teoria  
15 de evolução de Darwin, o qual faz busca aleatória do espaço conformacional, com o intuito de  
16 diminuir a probabilidade de o ligante ficar aprisionado em mínimos locais. Assim, populações  
17 de poses do ligante (cromossomos) formados por diferentes ângulos diedros e vetores  
18 translacionais e rotacionais (genes) evoluem até mutações ou cruzamentos entre si. Populações  
19 melhores pontuadas são usadas para reproduzir novas populações, repetidamente, até atingir  
20 determinado critério (PICCIRILLO; DO AMARAL, 2018). Exemplos de programas que usam  
21 algoritmo genético são o AutoDock, AutoDock Vina, GOLD (do inglês, *Genetic Optimization*  
22 *for Ligand Docking*), e DockThor (DE MAGALHÃES; BARBOSA; DARDENNE, 2004;  
23 JONES *et al.*, 1997; MORRIS *et al.*, 2009; TROTT; OLSON, 2009).

24 O programa GOLD, desenvolvido pelo Centro de Dados Cristalográficos de  
25 Cambridge (do inglês, *Cambridge Crystallographic Data Centre – CCDC*) é um *software*  
26 licenciado comercialmente, e momentaneamente no Brasil disponibilizado para o uso  
27 acadêmico em parceria firmada com a Coordenadoria de Aperfeiçoamento Profissional  
28 (CAPES) (JONES *et al.*, 1997). O GOLD, utiliza variações do algoritmo genético, na busca de  
29 uma população de possíveis poses (soluções) trabalhando com a otimização de uma função  
30 Fitness pré-definida, que avalia as energias de ligação de hidrogênio do complexo ligante-alvo,  
31 van der Waals, ligação de hidrogênio intramolecular do ligante e van der Waals interna do  
32 ligante, considerando as modificações dos diedros do ligante, a geometria dos anéis e as  
33 posições no sítio ativo do alvo molecular (REIS, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2012). Há quatro  
34 funções de pontuação pré-definidas disponíveis no GOLD, sendo elas empíricas como a

1 ChemPLP (*Piecewise Linear Potential*) e ChemScore, baseadas em campo de força como a  
2 GoldScore, e baseadas em conhecimento como a ASP (*Astex Statistical Potential*) (JONES *et*  
3 *al.*, 1997).

4 A função ChemScore é uma função de pontuação empírica baseada no ajuste teórico  
5 de dados experimentais através de equações que consideram a energia livre total que ocorre  
6 entre o ligante em afinidade com complexos. Considera também, além das ligações de  
7 hidrogênio e interações com metal, o contato hidrofóbico e a flexibilidade do ligante. Assim  
8 como a ChemScore, a função ChemPLP também é empírica, e considera além da ligação de  
9 hidrogênio, múltiplos potenciais lineares para modelar van der Waals e termos repulsivos  
10 (GUIDO; ANDRICOPULO, 2008; JONES *et al.*, 1997; REIS, 2008).

11 A função Fitness GoldScore é a função de pontuação original fornecida com o GOLD  
12 baseada em campo de força, que quantifica a energia proveniente das interações ligante-  
13 receptor e a energia interna do ligante, otimizada para a previsão das posições de ligação do  
14 ligante levando em consideração fatores como energia de ligação de hidrogênio, van der Waals,  
15 interação com metal e tensão de torção do ligante (FARIAS, 2017; JONES *et al.*, 1997).

16 A função de pontuação ASP é baseada em conhecimento e utiliza um potencial de  
17 distância átomo-átomo em interação, derivados de conjunto de dados de complexos ligante-  
18 receptor, e se assemelha a outros potenciais de pontuação como PMF e DrugScore (GUIDO;  
19 ANDRICOPULO, 2008; JONES *et al.*, 1997).

20 Tendo em vista que, a aplicação da docagem molecular por métodos sistemáticos  
21 podem elevar o custo computacional de modo exaustivo devido aos graus de liberdade do  
22 ligante, e os métodos determinísticos são dependentes das condições iniciais do sistema  
23 podendo acarretar ao aprisionamento em mínimos locais e barreiras energéticas altas, a  
24 utilização do método estocástico como o algoritmo genético aplicado pelo programa GOLD se  
25 torna a abordagem mais comum, uma vez que múltiplas conformações são geradas  
26 aleatoriamente, e o programa fornece a possibilidade de se utilizar quatro tipos de funções de  
27 pontuação simultaneamente durante o estudo, oferecendo a redução do custo computacional e  
28 disponibilidade de tempo.

## 1 **2 OBJETIVOS**

2

### 3 2.1 OBJETIVOS GERAIS

4

5 Este trabalho tem como objetivo a síntese de hidantoínas e tiohidantoínas, visando a  
6 avaliação de seu potencial antiureolítico frente à urease de *Canavalia ensiformis* (UCE).

7

### 8 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

9

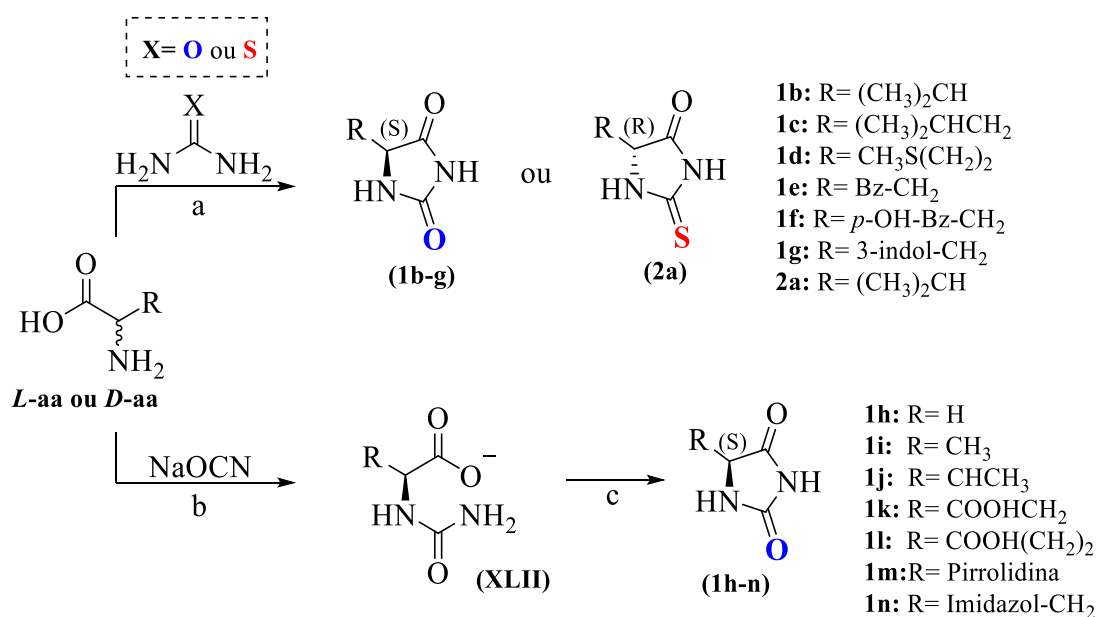
- 10 ✓ Síntese e caracterização estrutural de hidantoínas e tiohidantoínas derivadas de *L* ou *D*-  
11 aminoácidos.
- 12 ✓ Avaliação *in vitro* do potencial inibitório de tiohidantoínas e hidantoínas frente à urease  
13 de *Canavalia ensiformis* (UCE), e estudo da relação estrutura-atividade.
- 14 ✓ Estudos cinéticos da inibição de urease UCE dos compostos selecionados por método  
15 colorimétrico convencional.
- 16 ✓ Estudo das interações ligante-alvo molecular dos compostos selecionados e urease de  
17 UCE utilizando a técnica de STD.
- 18 ✓ Estudo das interações ligante-alvo molecular dos compostos selecionados e urease de  
19 UCE utilizando a técnica de docagem molecular.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 SÍNTESE DE HIDANTOÍNAS E TIOIDANTOÍNAS DERIVADAS DE AMINOÁCIDOS

As tioidantoínas e hidantoínas foram sintetizadas pela metodologia (**Esquema 10**, condição **a**), descrita por Wang e colaboradores (WANG; SHEIKH; ZHANG, 2006), consistindo em uma reação de condensação direta de *L*-aminoácidos (*L*-aa) ou *D*-aminoácidos (*D*-aa), com a ureia (para a síntese das hidantoínas), ou tioureia (para a síntese das tioidantoínas). Uma segunda condição reacional, adaptada de Schörghuber *et al.*, se mostrou também conveniente para a preparação das hidantoínas. Neste caso, *L*-aminoácidos reagem com cianato de sódio (NaOCN) em solução aquosa, seguida pela posterior ciclização na presença de HCl (**Esquema 10**, condição **b e c**) (SCHÖRGHUBER *et al.*, 2015).

**Esquema 10.** Síntese de hidantoínas e tioidantoínas derivadas de aminoácidos.



**Reagentes e condições:** a) 170-180 °C, refluxo, 35 min, 30-90%; b) H<sub>2</sub>O, 100 °C, 3 h; c) HCl 6 M, 120 °C, 4 h, 13-61%

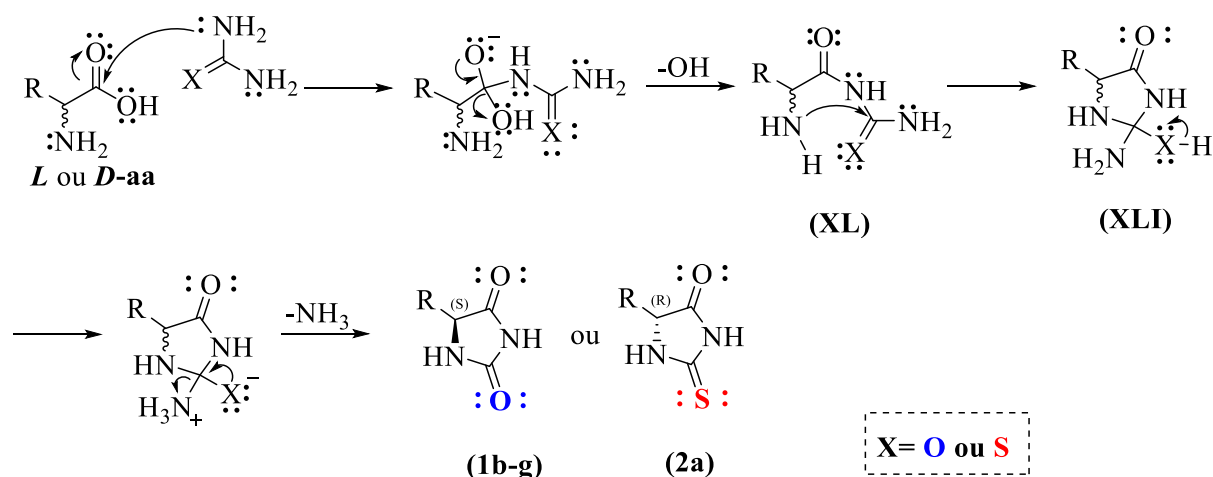
**Fonte:** Autoria própria.

O mecanismo proposto para a reação de condensação direta dos aminoácidos e ureia ou tioureia, representado no **Esquema 11**, envolve o ataque de um dos grupos amino do nucleófilo à carbonila do aminoácido para formação de uma amida (**XL**) ou tioamida. Em seguida, o grupo C=X sofre ataque nucleofílico intramolecular do grupo  $\alpha$ -amino da amida ou

1 tioamida, formando o intermediário **XLI** sem ocorrência de racemização durante a ciclização.  
 2 Posteriormente, este intermediário se interconverte na hidantoína (**1b-g**) ou tioidantoína (**2a**)  
 3 (WANG; SHEIKH; ZHANG, 2006).

4

5 **Esquema 11.** Mecanismo proposto para a síntese de tioidantoína ou hidantoínas em reação de  
 6 condensação direta de ureia ou tioureia com aminoácidos. Adaptado de (WANG; SHEIKH; ZHANG,  
 7 2006).



8

9 **Fonte:** Autoria própria.

10

11 A utilização da metodologia descrita por Wang permitiu se obter os derivados dos  
 12 aminoácidos com cadeias laterais não polares, tais como valina, leucina, metionina,  
 13 fenilalanina, triptofano, e polar como a tirosina, que reagiram com a ureia ou tioureia para  
 14 formar as correspondentes hidantoínas (**1b-g**) ou tioidantoína (**2a**) com rendimentos moderados  
 15 a ótimos (30-90%), como demonstrado na **Tabela 1** (entradas 1 a 6 e 13). Dentre os derivados  
 16 de aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas, aqueles com anéis aromáticos **1e-g**, foram  
 17 obtidos com os maiores rendimentos variando de 81 a 90% (**Tabela 1**, entradas 4 a 6). O  
 18 composto **2a**, análogo tioidantoínico derivado do aminoácido *D*-valina, também foi sintetizado  
 19 em 30% de rendimento, com o intuito de comparar a sua atividade com o seu enantiômero nos  
 20 ensaios *in vitro* com a urease (**Tabela 1**, entrada 13).

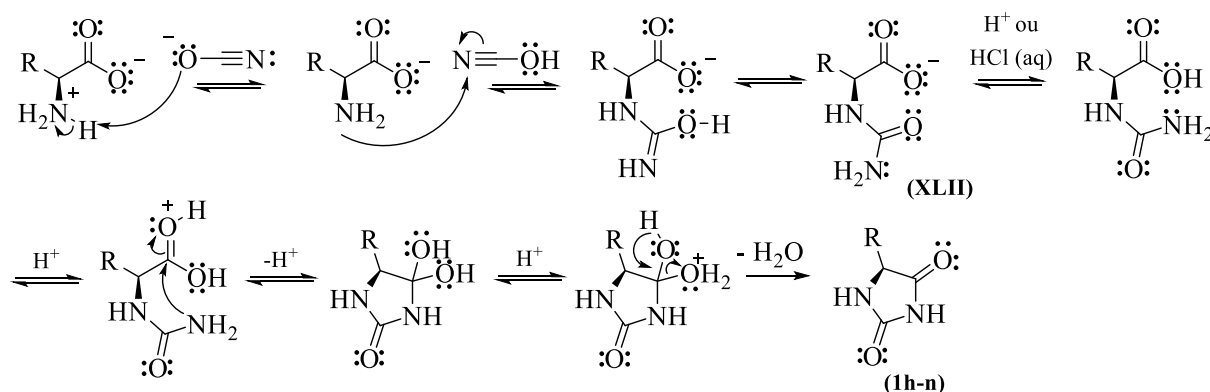
21

22 Os compostos derivados dos aminoácidos glicina, alanina, treonina, asparagina,  
 23 glutamina, prolina e histidina, não puderam ser obtidos por esta metodologia, pois em alguns  
 24 casos não houve precipitação do produto e não foi possível a obtenção por outros meios como  
 25 por exemplo, extração, ou não houve o consumo do material de partida, ou ainda se observou a  
 26 formação de misturas complexas. É relatado na literatura que estes aminoácidos podem se  
 decompor em altas temperaturas, como as utilizadas nessa reação (170-180 °C) ou ainda

1 sofrerem reações colaterais envolvendo os grupos funcionais das cadeias laterais, resultando  
 2 em subprodutos, portanto tornando-se instáveis sob essa condição reacional (HUANG; OUGH,  
 3 1991; WANG; SHEIKH; ZHANG, 2006).

4 Neste contexto, a metodologia envolvendo a reação de *L*-aminoácidos com cianato de  
 5 sódio (NaOCN) em solução aquosa, com posterior ciclização na presença de HCl se mostrou  
 6 eficaz para a obtenção da série dos compostos (**Esquema 12**).

7  
 8 **Esquema 12.** Mecanismo proposto para a síntese de hidantoínas a partir da reação de  
 9 aminoácidos com cianato de sódio. Adaptado de (DECLAS; LE VAILLANT; WASER, 2019;  
 10 WANG, 2010).



12  
 13 **Fonte:** Autoria própria.

14  
 15 De acordo com o mecanismo proposto (**Esquema 12**), a reação de formação das  
 16 hidantoínas **1h-n** se inicia com o ataque do nitrogênio do aminoácido ao carbono do cianato  
 17 para a formação do intermediário ácido hidantoínico **XLII**. Posteriormente, na presença de HCl,  
 18 a ciclização acontece por meio da reação intramolecular envolvendo o nitrogênio primário e a  
 19 carboxila, seguida da eliminação de água.

20 Com a utilização desta metodologia, foi possível obter **1h-j** e **1m-n**, derivados dos  
 21 aminoácidos com cadeias laterais não polares, tais como alanina e prolina, polares como a  
 22 glicina e treonina, e carregados positivamente como a histidina (**Tabela 1**, entradas 7 a 9 e 12  
 23 a 13). Nestas condições reacionais, *L*-asparagina e *L*-glutamina foram hidrolisadas em ácido  
 24 aspártico e ácido glutâmico, respectivamente, resultando nos derivados **1k** e **1l** (**Tabela 1**,  
 25 entradas 10 e 11).

26 Os compostos (**1h-n**) foram obtidos com rendimentos baixos a bons, sendo o maior  
 27 rendimento observado para o derivado **1k** de 94% (**Tabela 1**, entrada 10), e os menores

1 rendimentos observados para os derivados **1i**, **1m** e **1n** de 24, 25 e 13% respectivamente  
 2 (**Tabela 1**, entradas 8, 12 e 13).

3

4 **Tabela 1.** Rendimentos para a síntese das hidantoínas (**1b-n**) e da tioidantoína (**2a**) derivadas  
 5 de aminoácidos.

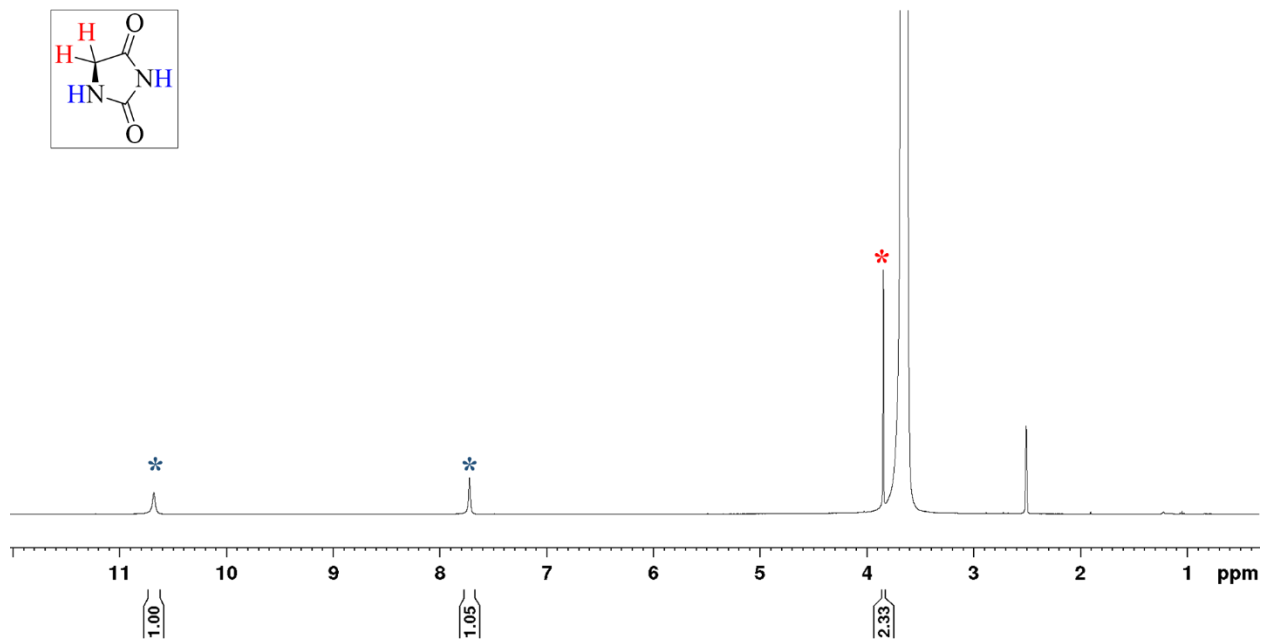
(**1b-m**)                      ou                      (**2a**)

Entrada	Aminoácido	R	Hidantoína e Tiohidantoína	Rendimento (%)
1	<i>L</i> -val	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH	<b>1b</b>	39
2	<i>L</i> -leu	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub>	<b>1c</b>	72
3	<i>L</i> -met	CH <sub>3</sub> S(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	<b>1d</b>	49
4	<i>L</i> -fen	Bz-CH <sub>2</sub>	<b>1e</b>	82
5	<i>L</i> -tir	<i>p</i> -OH-Bz-CH <sub>2</sub>	<b>1f</b>	90
6	<i>L</i> -trp	3-indol-CH <sub>2</sub>	<b>1g</b>	81
7	Gli	H	<b>1h</b>	62
8	<i>L</i> -ala	CH <sub>3</sub>	<b>1i</b>	24
9	<i>L</i> -tre	CH <sub>3</sub> CH	<b>1j</b>	90
10	<i>L</i> -asx	COOHCH <sub>2</sub>	<b>1k</b>	94
11	<i>L</i> -glu	COOH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	<b>1l</b>	23
12	<i>L</i> -pro	Pirrolidina	<b>1m</b>	25
13	<i>L</i> -his	Imidazol-CH <sub>2</sub>	<b>1n</b>	13
14	<i>D</i> -val	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH	<b>2a</b>	30

6

7 A confirmação da formação das substâncias **1b-n** e **2a** foi realizada pela análise de  
 8 dados de RMN. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H apresentaram sinais de deslocamento químico (δ)  
 9 dos dois grupos NH em δ<sub>H</sub> 7,72 a 12,5 ppm, além dos sinais com δ<sub>H</sub> de 3,85 a 4,33 ppm,  
 10 atribuídos aos hidrogênios α, como se pode observar representativamente para o composto **1h**  
 11 na **Figura 23**.

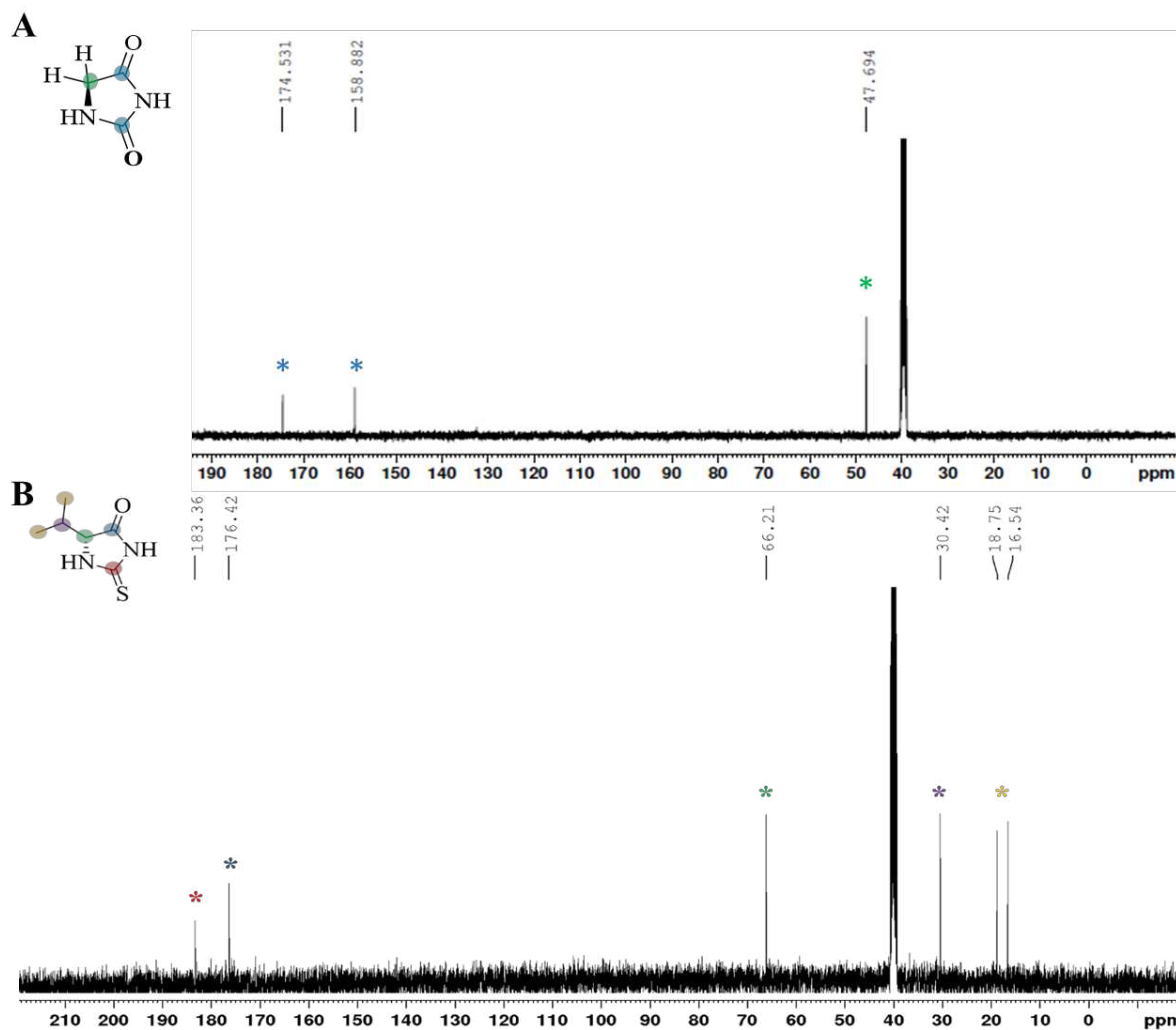
1 **Figura 23.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz) de **1h** em  $\text{DMSO-}d_6$ .



Fonte: Autoria própria.

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentaram  $\delta_c$  de 157,57-177,28 para as carbonilas características do anel hidantoínico (**Figura 24A**) ou tioidantoínico, além do  $\delta_c$  183,36 ppm para a tiocarbonila da tioidantoína **2a** (**Figura 24B**). Todos os sinais de RMN dos derivados (Apêndice B) foram confrontados com os dados disponíveis na literatura para estes compostos (HUANG; OUGH, 1991).

1 **Figura 24.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz) para **1h** (A) e **2a** (B) em  $\text{DMSO-}d_6$ .



### 3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DE TIOIDANTOÍNAS E HIDANTOÍNAS FRENTE À UREASE

#### 3.2.1 Obtenção dos Parâmetros para o Ensaio Enzimático

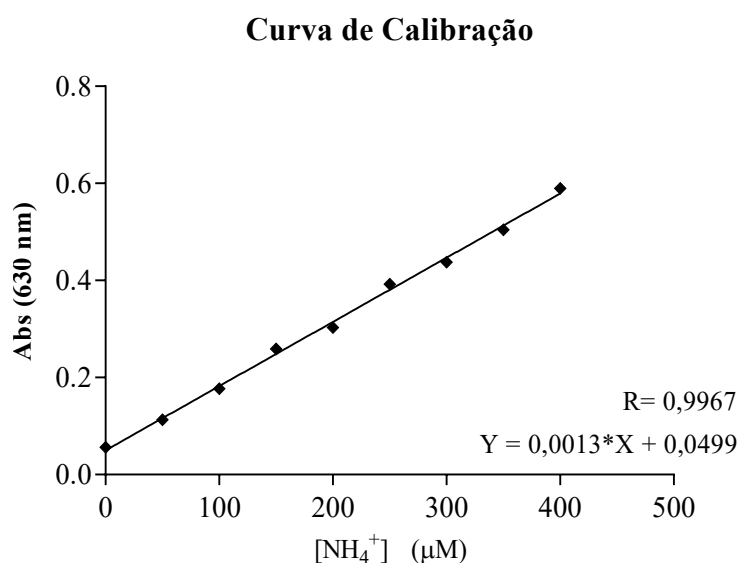
O ensaio da atividade inibitória dos compostos **1b-n** e **2a-o** frente à urease de UCE (*Canavalia ensiformis*) Tipo III, CAS 9002-13-5) foi realizado em triplicata, utilizando-se o método do indofenol, adaptado de Khan e colaboradores. O experimento consiste na reação entre a amônia, fenol e hipoclorito de sódio na presença de um catalisador, o nitroprussiato de sódio, resultando na formação de um composto azulado (KHAN *et al.*, 2017).

Para determinação da quantidade de amônia gerada nas reações, uma curva de calibração foi preparada usando cloreto de amônio como fonte de amônia. O experimento para

1 se determinar a curva de calibração foi realizado utilizando cloreto de amônio em diferentes  
2 concentrações, entre 0 e 400  $\mu\text{M}$ . A curva de calibração demonstrou uma relação linear entre a  
3 absorbância e as concentrações de amônia, indicando que quanto maior a concentração de  
4 cloreto de amônio (amônia) maior a absorbância (**Figura 25**).

5

6 **Figura 25.** Curva de calibração para determinação de amônia pelo método do indofenol, a partir  
7 de diferentes concentrações de cloreto de amônio.



8

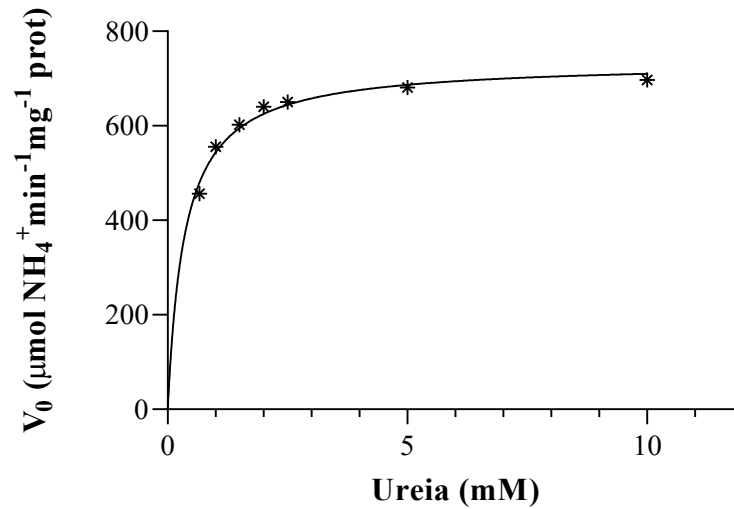
9 **Fonte:** Autoria própria.

10

11 Alguns fatores podem contribuir para o aumento ou diminuição da velocidade  
12 reacional da atividade catalítica das enzimas, sendo um deles a concentração de substrato  
13 utilizada. Apesar dos parâmetros dos ensaios enzimáticos com a urease, através da metodologia  
14 do indofenol, serem bem consolidados na literatura, nós realizamos uma breve investigação  
15 sobre qual a melhor concentração de ureia a ser utilizada em nossos estudos, onde a  
16 concentração de ureia variou de 0,66 a 10 mM (**Figura 26**).

17

1 **Figura 26.** Gráfico de Michaelis-Menten de cinética enzimática para UCE.



2

3 **Fonte:** Autoria própria.

4

5 É possível observar no gráfico ilustrado da **Figura 26**, que a velocidade da reação  
6 começa a aumentar a partir das concentrações mais baixas, e atinge o platô nas concentrações  
7 de 5 a 10 mM. A taxa da reação é estritamente proporcional à concentração do substrato, assim  
8 quando há menor quantidade de substrato disponível no meio reacional, a velocidade reacional  
9 segue cinética de primeira ordem, desta maneira, as concentrações 0,66 a 2,50 mM foram  
10 escolhidas para a realização da avaliação do perfil cinético dos inibidores (OLIVEIRA, 2008).  
11 Já para a concentração de ureia em 10 mM apresentou-se adequada para a realização das  
12 análises da inibição direta.

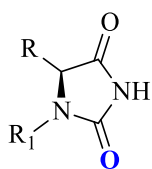
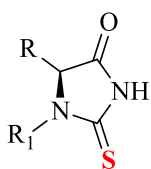
### 3.2.2 Efeito Inibitório das Tioidantoínas e Hidantoínas na Atividade da Urease

Foi realizada uma triagem *in vitro* com quatorze tioidantoínas (**2b-o**), cuja a síntese foi relatada em trabalho anterior (para maiores informações vide Apêndice A) (CARVALHO, 2017), e as doze hidantoínas (**1b-m**) e a tioidantoína **2a** sintetizadas nesse trabalho.

As tioidantoínas e hidantoínas, sintetizadas a partir de diferentes aminoácidos com cadeias laterais polares, apolares, alifáticas e aromáticas, foram utilizadas com o objetivo de avaliar a influência desses grupos e a substituição do átomo de oxigênio pelo enxofre sobre a inibição da urease.

Os resultados do ensaio de inibição enzimática revelaram que todas tioidantoínas **2a-o** inibiram a urease com porcentagens de inibição (%I) variando de 22,0 a 90,5%, como demonstrado na **Tabela 2**.

1 **Tabela 2.** Atividade inibitória das tioidantoínas e hidantoínas e tiourea (0,050 mM) frente à  
 2 urease de UCE (0,0035 mM) em reações contendo ureia como substrato (10 mM).

Entrada	<i>L, D-aa</i>	R	R <sub>1</sub>	Hidantoína		Tioidantoína	
					%I		%I
1	<i>D-val</i>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH	H	<b>1a</b>	-	<b>2a<sup>d</sup></b>	27,8 ± 4,19
2	<i>L-val</i>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH	H	<b>1b</b>	0	<b>2b<sup>k</sup></b>	90,5 ± 1,03
3	<i>L-leu</i>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub>	H	<b>1c</b>	0	<b>2c<sup>d</sup></b>	32,9 ± 4,33
4	<i>L-met</i>	CH <sub>3</sub> S(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	H	<b>1d<sup>k</sup></b>	85,9 ± 0,27	<b>2d<sup>i</sup></b>	62,0 ± 6,39
5	<i>L-fen</i>	Bz-CH <sub>2</sub>	H	<b>1e</b>	0	<b>2e<sup>e</sup></b>	40,7 ± 2,69
6	<i>L-tir</i>	<i>p</i> -OH-Bz-CH <sub>2</sub>	H	<b>1f</b>	0	<b>2f<sup>d</sup></b>	31,5 ± 4,13
7	<i>L-trp</i>	3-indol-CH <sub>2</sub>	H	<b>1g</b>	0	<b>2g<sup>d</sup></b>	31,3 ± 4,94
8	Gli	H	H	<b>1h</b>	0	<b>2h<sup>g</sup></b>	53,4 ± 5,99
9	<i>L-ala</i>	CH <sub>3</sub>	H	<b>1i<sup>a</sup></b>	4,67 ± 0,00	<b>2i<sup>i</sup></b>	59,9 ± 2,25
10	<i>L-tre</i>	CH <sub>3</sub> CH	H	<b>1j<sup>a</sup></b>	2,77 ± 0,72	<b>2j<sup>f</sup></b>	48,2 ± 0,37
11	<i>L-asx</i>	COOH-CH <sub>2</sub>	H	<b>1k<sup>*b</sup></b>	8,01 ± 1,90	<b>2k<sup>j</sup></b>	68,6 ± 1,79
12	<i>L-glu</i>	COOH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	H	<b>1l<sup>*b</sup></b>	9,99 ± 1,56	<b>2l<sup>j</sup></b>	68,1 ± 3,68
13	<i>L-pro</i>	Pirrolidina	H	<b>1m<sup>b</sup></b>	10,8 ± 0,31	<b>2m<sup>c</sup></b>	22,0 ± 0,71
14	<i>L-his</i>	Imidazol-CH <sub>2</sub>	H	<b>1n<sup>b</sup></b>	13,0 ± 2,82	<b>2n<sup>j</sup></b>	69,6 ± 3,10
15	<i>L-val</i>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH	COCH <sub>3</sub>	-	-	<b>2o<sup>d</sup></b>	29,5 ± 7,42
16	-	-	-	<b>Tiourea<sup>g</sup></b>	56,5 ± 1,63	-	-

3 Valores apresentam a média ± desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Letras distintas indicam  
 4 diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).

5 \*Compostos obtidos a partir da hidrólise da *L-asx* e *L-glu* em ácido aspártico e ácido glutâmico, respectivamente.

6  
 7 O composto **2b**, derivado do aminoácido *L-valina* apresentou o maior efeito inibitório  
 8 da série com %I = 90,5, aproximadamente duas vezes maior que o verificado para o inibidor  
 9 padrão, tiourea. É interessante ressaltar que o seu enantiômero **2a**, derivado da *D-valina*,  
 10 apresentou porcentagem de inibição três vezes menor (%I = 27,8), assim como a acetilação no  
 11 N<sub>1</sub> do anel tioidantoínico resultando no derivado **2o**, influenciou negativamente a inibição  
 12 enzimática, também apresentando %I = 29,5. Isto sugere que o grupo isopropila no C<sub>5</sub> da  
 13 tioidantoína **2b** (enantiômero *S*), pode ter uma influência importante e estereosseletiva no sítio  
 14 ativo da enzima.

15 O derivado da Glicina, **2h** apresentou %I = 53,4%, equivalente à tiourea (%I = 56,5%),

1 não diferindo estatisticamente. Foi possível observar um ótimo perfil inibitório com %I = 48,2  
2 a 59,9, para os derivados de aminoácido com cadeias laterais alifáticas menores, de até três  
3 carbonos como **2h**, **2i** e **2j** (**Tabela 2**, entradas 8-10). Essa possibilidade é corroborada pela  
4 atividade inferior (%I = 32,9) de **2c**, derivado da leucina, com cadeia lateral mais extensa. Essa  
5 tendência é observada também para os derivados com cadeias laterais mais volumosas,  
6 alifáticas (**2m**) e/ou aromáticas (**2e-g**), que apresentaram menores valores de porcentagem de  
7 inibição I% = 22 a 40%. Os derivados **2k**, **2n**, **2o** e **2d** com grupos polares, básicos e enxofre,  
8 respectivamente na cadeia lateral, apresentaram boa inibição da urease com valores de %I = 62  
9 a 69%.

10 Foi observado que a substituição do enxofre por oxigênio no anel tioidantoinico não  
11 contribuiu positivamente para atividade inibitória, pois de todas hidantoinas avaliadas, apenas  
12 cinco apresentaram perfil inibitório, sendo quatro delas, **1i**, **1j**, **1k** e **1l** com valores de %I baixos,  
13 variando de 4 a 10%. A hidantoina **1d**, a única da série a possuir um átomo de enxofre na cadeia  
14 lateral, apresentou %I = 85,9, equivalente ao composto **2b**, da série das tioidantoinas. Isto  
15 sugere que o átomo de enxofre presente nesse derivado pode ser o responsável pela sua alta  
16 taxa de inibição enzimática da urease de UCE.

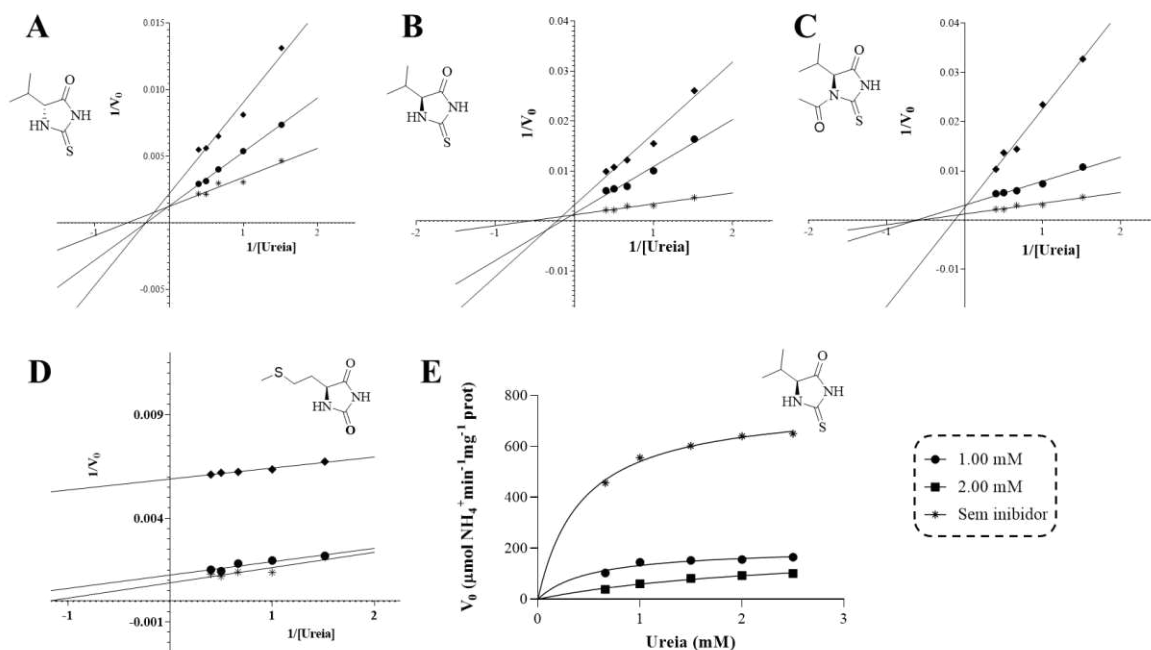
17

### 18 3.2.3 Estudo do Mecanismo Cinético de Inibição da Urease por Hidantoinas e Tioidantoinas.

19

20 A tioidantoina **2b**, a mais ativa da série com %I = 90,5, além do seu enantiômero **2a**  
21 e de seu derivado acetilado **2o**, e o derivado do aminoácido metionina **1d**, único a apresentar  
22 atividade notável da série das hidantoinas com %I = 85,9, foram selecionados para testes  
23 adicionais com a enzima UCE para investigar o mecanismo de inibição na presença de  
24 diferentes concentrações dos inibidores afim de se estudar a cinética enzimática. As plotagens  
25 de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk foram realizadas e os valores para  $K_i$  (constantes de  
26 inibição) foram determinados usando as inclinações de cada gráfico de linha (**Figura 27**). A  
27 cinética foi estudada tomando-se recíproca de atividade enzimática ao longo do eixo y e  
28 recíproca da concentração de substrato ao longo do eixo x. A tendência das linhas para  
29 diferentes concentrações de inibidores (2,00 e 1,00 mM), e nas reações livres de inibidor  
30 forneceu informações sobre o mecanismo de inibição. Um gráfico de  $V_0$  (velocidade inicial)  
31 *versus* concentração de ureia obtido a partir de dados de ensaios com **2b** é mostrado na **Figura**  
32 **27E**, para exemplificar o comportamento de Michaelis-Menten da catálise enzimática da  
33 urease.

1 **Figura 27.** Modo de inibição da urease a partir das plotagens de Lineweaver-Burk da recíproca  
 2 da velocidade de reação vs. a recíproca do substrato (ureia) na ausência (\*) e na presença de  
 3 2,00 mM (■) e 1,00 mM (●) dos compostos **2a** (A), **2b** (B), **2o** (C) e **1d** (D). Exemplificação do  
 4 comportamento de Michaelis-Menten da catálise enzimática da urease para **2b** (E).



5  
 6 **Fonte:** Autoria própria.

7  
 8 Os gráficos de Lineweaver-Burk obtidos (**Figura 27A-C**) indicam que os compostos  
 9 **2a**, **2b** e **2o** apresentaram inibição do tipo mista frente à urease de UCE, uma vez que as linhas  
 10 interceptam o eixo Y em lugares distintos no segundo quadrante do eixo X. Inibidores de tipo  
 11 misto são definidos por serem capazes de ligar-se tanto a enzima livre como ao complexo  
 12 enzima-substrato. Um exemplo de inibição do tipo mista também é observada para o fosfato de  
 13 *N*-(*n*-butil)triamida (NBPTO, **Figura 7**, seção 1.2), o inibidor de urease mais utilizado na  
 14 agricultura (YAMADA; ABDALLA, 2007). Inibidores mistos podem se ligar tanto ao sítio  
 15 ativo da enzima quanto a sítios alostéricos. Já o perfil observado para o composto **1d** apresenta  
 16 inibição do tipo incompetitiva frente à urease de UCE (**Figura 27D**), uma vez que as linhas  
 17 interceptam os eixos Y e X em lugares distintos e se demonstram paralelas. Inibidores  
 18 incompetitivos se ligam exclusivamente ao complexo enzima-substrato e possuem baixa ou  
 19 nenhuma afinidade pela enzima livre, geralmente a ligação ocorre em sítios alostéricos, levando  
 20 a formação do complexo enzima-substrato-inibidor (HABENSCHUS, 2016).

21 O sítio alostérico da urease é descrito por ser consideravelmente menos conservado do  
 22 que o sítio ativo, desta maneira, os inibidores que atuam participando de interações com sítios

1 alostéricos podem ser mais suscetíveis a uma potencial falta de associação entre seu perfil  
2 inibitório para diferentes ureases (REGO *et al.*, 2018a).

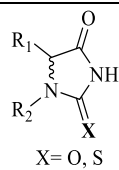
3 O composto **2b** foi capaz de inibir a UCE apresentando valor de  $K_i = 0,42$  mM, seguido  
4 do composto **2o** com  $K_i = 0,57$  mM, já o derivado **2a** apresentou o maior valor de  $K_i$  com 1,13  
5 mM. Ambos compostos apresentaram valores de  $K_m$  entre 1,54 e 1,64 mM e  $V_{max}$  variando de  
6 758 a 788  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NH}_4^+$  por minuto por miligrama de proteína (**Tabela 3**). No caso dos  
7 inibidores mistos, além dos parâmetros da constante de inibição, constante de Michaelis-  
8 Menten e velocidade máxima enzimática, também foi determinado o parâmetro alfa ( $\alpha$ ), cujo  
9 valor corresponde ao grau em que a ligação do inibidor altera a afinidade da enzima pelo  
10 substrato. Seu valor é sempre maior que zero (COPELAND, 2005).

11 Se  $\alpha < 1$ , o inibidor liga-se preferencialmente ao complexo enzima-substrato, já se alfa  
12 é muito pequeno (mas maior que zero), o inibidor se liga quase inteiramente ao complexo  
13 enzima-substrato. Quando  $\alpha = 1$ , o inibidor apresenta mesma afinidade pela enzima livre ou  
14 pelo complexo enzima-substrato. Este efeito foi observado para o derivado **2o** com  $\alpha = 1,08$ .  
15 Se o valor de  $\alpha > 1$ , o inibidor liga-se preferencialmente à enzima livre, caso esse, observado  
16 para o derivado **2b**, mais ativo da série (%I = 90,5 e  $K_i = 0,42$  mM) e com  $\alpha = 1,83$ . E por fim  
17 se o valor de alfa é muito grande, a ligação é quase inteiramente à enzima livre, comportamento  
18 observado para o derivado **2a** com  $\alpha = 2,67$  (COPELAND, 2005).

19 A hidantoína **1d**, apresentou valor de  $K_i = 0,99$  mM, no caso deste inibidor  
20 incompetitivo a constante é determinada pelo produto entre o  $K_i$  e o valor de  $\alpha$ . Não é possível  
21 o ajuste da constante de inibição separadamente, pois seu valor é muito alto em comparação ao  
22 alfa (que é muito baixo), uma vez que inibidores incompetitivos geralmente não se ligam à  
23 enzima livre (COPELAND, 2005). O valor de  $K_m$  observado foi de 0,64 mM e o  $V_{max} = 1076$   
24  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NH}_4^+$  por minuto por miligrama de proteína (**Tabela 3**, entrada 4).

25

1 **Tabela 3.** Efeito das tioidantoínas **2a**, **2b**, **2o** e **1d** nos parâmetros cinéticos de UCE.

Entrada	<i>L, D-aa</i>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>1</sub></b>		<b>K<sub>i</sub></b> (mM)	<b>Alfa</b> (α)	<b>K<sub>m</sub></b> (mM)	<b>V<sub>max</sub></b> (μmol/min <sup>-1</sup> )
1	<i>D-val</i>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH	H	<b>2a</b>	1,13±0,34	2,67±2,47	1,64±0,33	788±78,3
2	<i>L-val</i>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH	H	<b>2b</b>	0,42±0,09	1,83±1,03	1,56±0,21	760±48,9
3	<i>L-val</i>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH	COCH <sub>3</sub>	<b>2o</b>	0,57±0,20	1,08±0,74	1,54±0,28	758±66,9
4	<i>L-met</i>	CH <sub>3</sub> S(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	H	<b>1d*</b>	0,99±0,22 <sup>†</sup>	-	0,64±0,30	1076±160

2 Valores apresentam a média ± desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Análise de variância pelo  
 3 teste One-way ANOVA encontrou diferença entre todos os tratamentos com \*\* p<0,05 para **2a** e \*\*\*\* p<0.0001  
 4 para **2b**, **2o** e **1d**. \*Hidantoína **1d** (X= O). <sup>†</sup>AlfaK<sub>i</sub>: Produto entre o K<sub>i</sub> e o valor de alfa (também descrito como  
 5 K<sub>i</sub><sup>'</sup>).

### 7 3.2.4 Estudo das Interações Ligante-Proteína entre Tioidantoínas e Urease por STD

9 A fim de se investigar com maiores detalhes as interações em nível molecular  
 10 existentes entre os compostos **2a**, **2b**, **2o** e **1d** com a enzima urease, foi utilizada a técnica de  
 11 RMN de *Saturation Transfer Difference* (STD) seguindo metodologia adaptada de Viegas e  
 12 colaboradores (VIEGAS *et al.*, 2011).

13 O efeito STD pode ser melhor analisado se o fator de amplificação (A<sub>STD</sub>) for aplicado.  
 14 O fator de amplificação do STD é obtido pela multiplicação do efeito STD relativo de um dado  
 15 hidrogênio (I<sub>STD</sub>/I<sub>0</sub>) em uma dada concentração de ligante ([L]) com a razão molar de ligante  
 16 em excesso em relação à proteína (L<sub>E</sub>/P):

$$18 \quad A_{STD} = \frac{I_{STD}}{I_0} \times \left[ \frac{L_E}{P} \right] \quad (3)$$

20 Na **Figura 28A e B** são mostrados o espectro de referência (*off-ressonance*) e espectro  
 21 da diferença entre este e o espectro em que a enzima sofreu saturação (*on-ressonance*) da mistura  
 22 de UCE (0,02 mM) e a tioidantoína **2b** (2,00 mM, L<sub>E</sub>/P= 100). Os dupletos intensos em δ<sub>H</sub>  
 23 0,96 e 0,80 ppm (**Figura 28B**) referentes as duas metilas diasterotópicas **H1** e **H2**  
 24 respectivamente, indicam, em primeira instância, que este é um ligante ativo que interage com  
 25 a enzima. Os sinais na região de δ<sub>H</sub> 3,40 a 3,91 ppm, observados no espectro de referência, são  
 26 atribuídos aos açúcares usados como estabilizantes na formulação da enzima, e não apresentam  
 27 interações com esta, podendo ser utilizados convenientemente como controle negativo para

1 avaliação das interações.

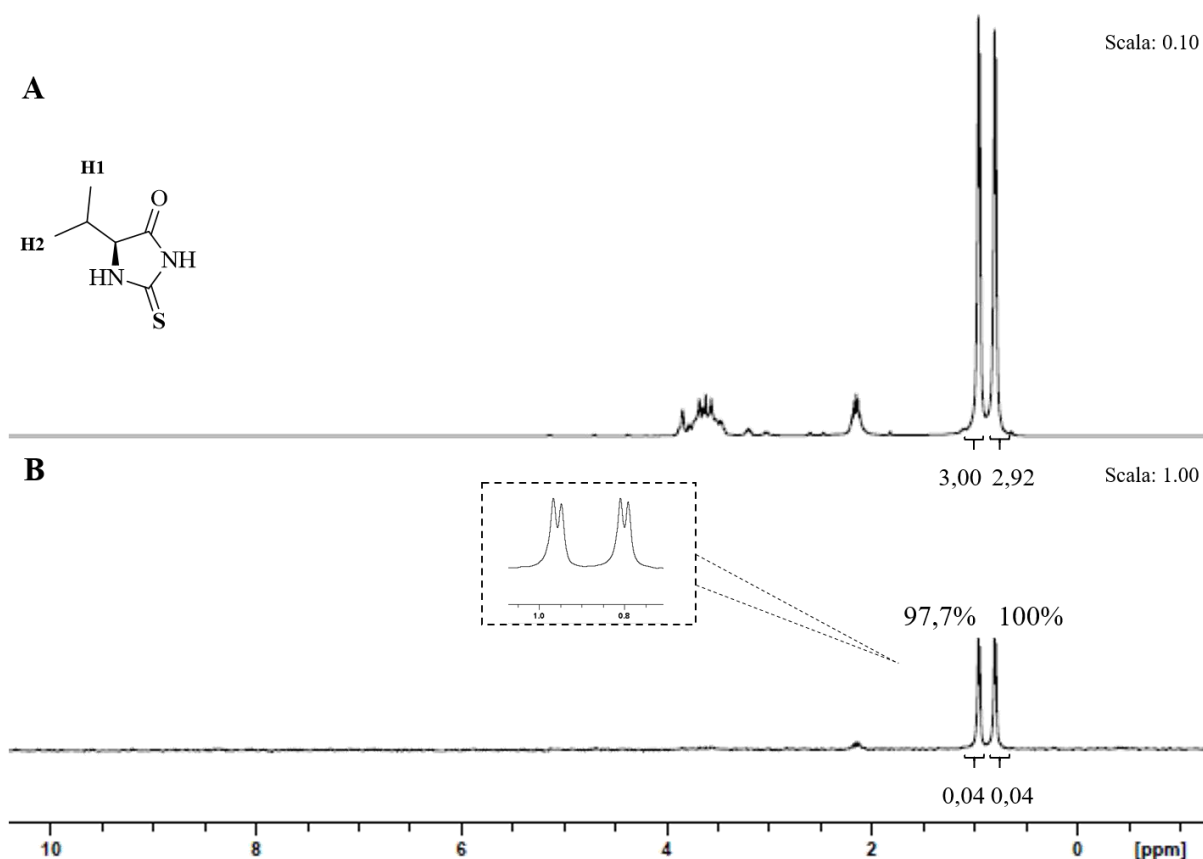
2

3 **Figura 28.** Espectros do experimento de STD com atribuição dos sinais de  $^1\text{H}$  do ligante **2b**

4 com a urease de UCE. Espectro de referência (*off-resonance*) (A) e espectro de STD (B).

5 Parâmetros: [UCE] = 0,02 mM; [**2b**] = 2,00 mM; tampão fosfato (em  $\text{D}_2\text{O}$ ), pH 7,4; STD:  $T_{\text{sat}}$ =

6 1,5 s; Gauss1.1000 = 10 ms; Sinc1.1000 = 2 ms; n° scans: 64.



7

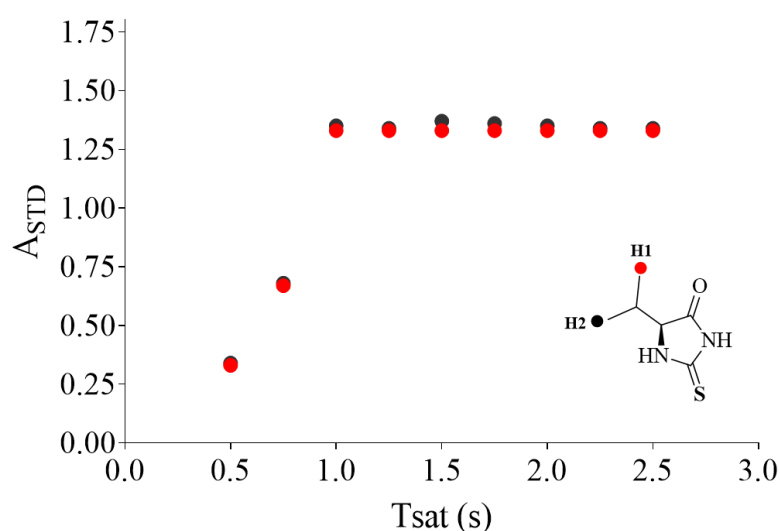
8 **Fonte:** Autoria própria.

9

10 É interessante ressaltar ainda que, desde que todos os hidrogênios do ligante possuam  
 11 taxas de relaxação semelhantes, as diferenças nas respostas do efeito STD ou  $A_{\text{STD}}$  para cada  
 12 hidrogênio do ligante pode refletir a proximidade relativa desse hidrogênio com o local de  
 13 ligação ao receptor enzimático. Para isto, basta definir a intensidade mais alta à 100% e para  
 14 todos os outros sinais, a proporção relativa é calculada. Com isso é possível a obtenção do  
 15 mapeamento de epítomos do inibidor (VIEGAS *et al.*, 2011). Assim, a metila **H2**, apresentando  
 16 valor de  $A_{\text{STD}} = 1,37$  foi definida como o parâmetro de intensidade referência (100%), sendo  
 17 possível determinar que **H1** apresentou um valor de 97,7% de efeito STD com  $A_{\text{STD}} = 1,33$   
 18 (**Figura 28**).

Uma vez que um tempo de saturação ( $T_{sat}$ ) é determinado, o  $A_{STD}$  também pode ser descrito em função do número médio de moléculas de ligante saturadas por molécula de receptor, desta maneira, a otimização do  $T_{sat}$  é importante. Foram adquiridos nove experimentos de STD das amostras contendo concentrações fixas de enzima urease de UCE (0,02 mM), e do composto teste **2b** (2 mM) (respeitando a razão ligante-enzima ( $L_E/P$ ) = 100), variando os tempos de saturação de 0,50 a 2,50 s. Na **Figura 29** podemos observar a plotagem do  $A_{STD}$  vs. o tempo de saturação.

**Figura 29.** Fator de amplificação do STD em função do tempo de saturação (s).

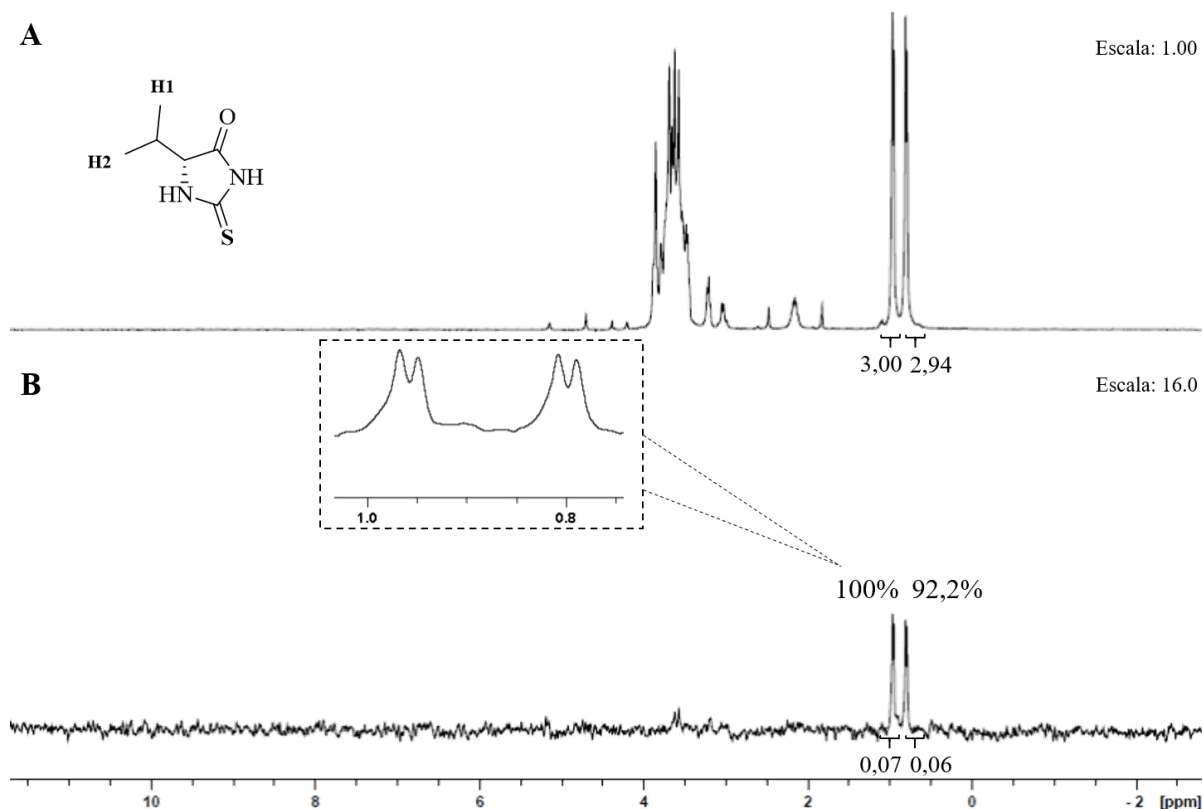


Fonte: Autoria própria.

O aumento do fator de amplificação com o aumento do tempo de saturação foi observado até o valor de 1,00 s, e posteriormente se tornou constante. A **Figura 29** mostra que a melhor separação entre os hidrogênios metílicos **H1** e **H2**, foi observado para o tempo de saturação de 1,50 s, sendo este o tempo escolhido para os experimentos seguintes.

Para avaliar a influência da configuração absoluta *S* (**2b**) para *R* (**2a**) para a tioidantoína derivada do aminoácido valina, foi realizado o experimento de STD com o composto **2a**, cujos espectros de referência (*off-ressonance*), e de efeito STD-RMN, são mostrados na **Figura 30A** e **B**, respectivamente. Foi possível observar os dupletos em  $\delta_H$  0,96 e 0,80 ppm referentes as duas metilas diasterotópicas **H1** e **H2**, respectivamente, mostrando que o composto é um ligante ativo para a enzima (**Figura 30B**).

1 **Figura 30.** Espectros do experimento de STD com atribuição dos sinais de  $^1\text{H}$  do ligante **2a**  
 2 com a urease de UCE. Espectro de referência (*off-resonance*) (A) e espectro de STD (B).  
 3 Parâmetros: [UCE] = 0,02 mM; [**2a**] = 2,00 mM; tampão fosfato (em  $\text{D}_2\text{O}$ ), pH 7,4; STD:  $T_{\text{sat}}$ =  
 4 1,5 s; Gauss1.1000 = 10 ms; Sinc1.1000 = 2 ms; n° scans: 64.

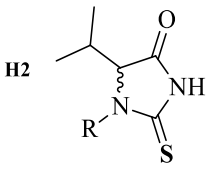


5  
 6 **Fonte:** Autoria própria.

7  
 8 Este derivado, apresentou maior intensidade observada ao efeito STD para a metila  
 9 **H1**, com valor de  $A_{\text{STD}} = 2,41$ , que foi definido como o parâmetro de intensidade mais alta  
 10 (100%), sendo possível determinar que **H2** apresentou um valor de 92,2% de efeito STD com  
 11  $A_{\text{STD}} = 2,23$  (**Figura 30B**, **Tabela 4**). Isso evidencia que o arranjo espacial para o derivado da  
 12 valina possui influência primordial para as interações com a enzima, uma vez que para os  
 13 ensaios *in vitro*, também foi observado que a mudança de configuração *S* para *R* reduziu em  
 14 aproximadamente três vezes a %I da enzima de UCE de 90,5 (**2b**) para 27,8% (**2a**) (**Tabela 2**,  
 15 sessão 3.2.2).

16

1 **Tabela 4.** Valores de  $A_{STD}$  para todos os prótons que apresentaram efeito STD, para os  
 2 compostos **2a**, **2b** e **2o** avaliados.

 H1 H2 R= H ( <b>2a</b> , <b>2b</b> ) R= COCH <sub>3</sub> ( <b>2o</b> )	$A_{STD}$						
	<b>2a</b>		<b>2b</b>		<b>2o</b>		
	H1	H2	H1	H2	H1	H2	H3*
	2,41	2,23	1,52	1,59	2,38	2,30	0,72

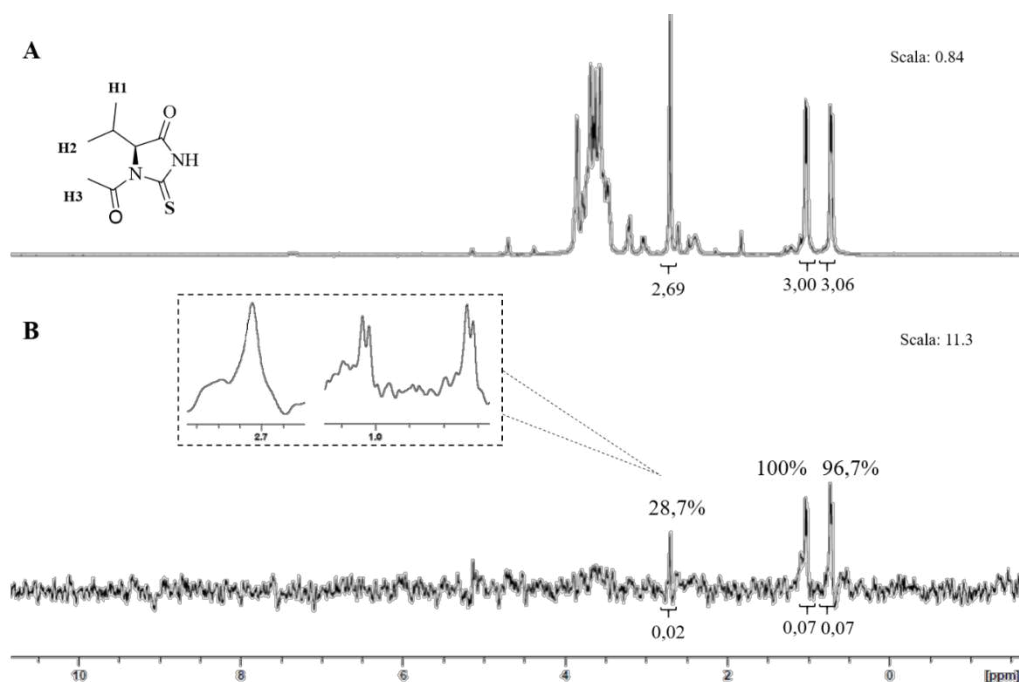
3 \*Hidrogênios metílicos do grupo acetil (COCH<sub>3</sub>).

4

5 Para avaliar a influência do grupo acetil do composto **2o** nas interações com a enzima  
 6 de UCE, foi realizado o experimento de STD, cujos espectros de referência (*off-ressonance*), e  
 7 da diferença propriamente dita, são mostrados na **Figura 31A e B**, respectivamente. Assim  
 8 como para **2b**, pudemos observar os dupletos em  $\delta_H$  1,02 e 0,72 ppm referentes as duas metilas  
 9 diastereotópicas **H1** e **H2** respectivamente, além do simpleto em  $\delta_H$  2,71 ppm, referente a metila  
 10 **H3** do grupo acetil (**Figura 31B**).

11

12 **Figura 31.** Espectros do experimento de STD com atribuição dos sinais de <sup>1</sup>H do ligante **2o**  
 13 com a urease de UCE. Espectro de referência (*off-ressonance*) (**A**) e espectro de STD (**B**).  
 14 Parâmetros: [UCE] = 0,02 mM; [**2o**] = 2,00 mM; tampão fosfato (em D<sub>2</sub>O), pH 7,4; STD: Tsat=  
 15 1,5 s; Gauss1.1000 = 10 ms; Sinc1.1000 = 2 ms; n° scans: 64.



16

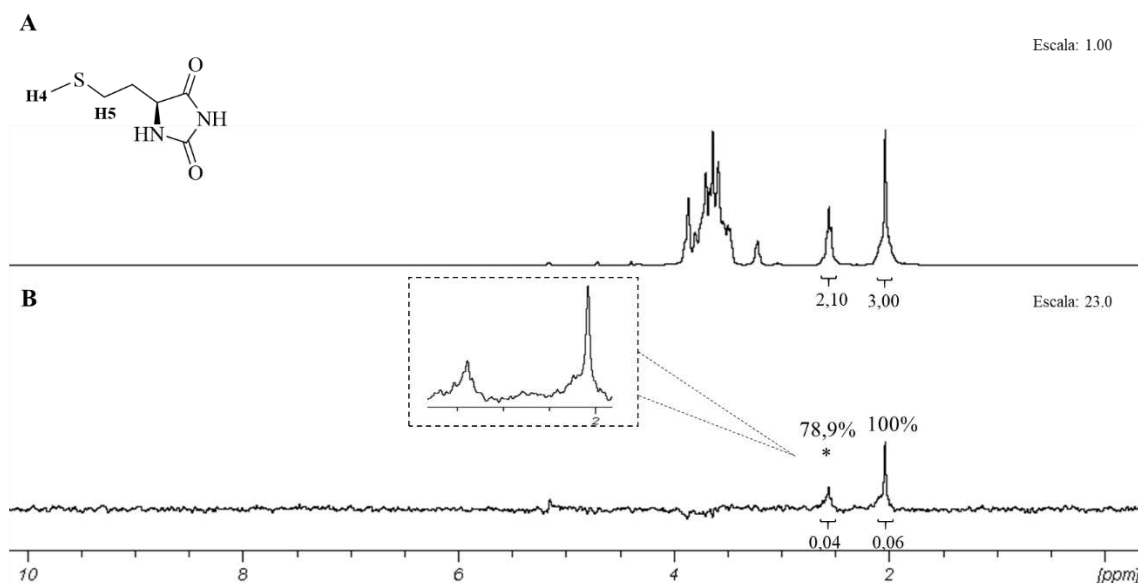
17 **Fonte:** Autoria própria.

O derivado acetilado **2o**, apresentou maior intensidade observada ao efeito STD para a metila de maior deslocamento químico, com valor de  $A_{STD} = 2,38$ , definido como o parâmetro referência (100%), tendo a outra metila apresentado um valor de 96,7% de efeito STD relativo com  $A_{STD} = 2,30$  (**Figura 31B, Tabela 4**). Ainda foi possível observar que o grupo acetil presente na posição N1 do anel tioidantoinico, apresentou efeito STD de 28,7% e  $A_{STD} = 0,72$  (**Figura 31B, Tabela 4**). A inserção do grupo acetil nesta posição mostrou ser prejudicial para as interações com a enzima, uma vez que para os ensaios *in vitro*, foi observado que a acetilação reduziu a %I da enzima de UCE de 90,5 (**2b**) para 29,5% (**2o**) (**Tabela 2, sessão 3.2.2**).

Devido às observações experimentais nos ensaios colorimétricos *in vitro*, da hidantoína **1d**, que apresentou alta taxa de inibição (%I = 85,9), inclusive equivalente ao composto **2b**, mais ativo da série das tioidantoinas, também foi submetida à estudos de STD para avaliar a influência desta cadeia lateral proveniente do aminoácido metionina, que possui um átomo de enxofre ligado à uma metila e sua possível correspondência à atividade inibitória.

Os espectros de referência e de diferença são mostrados na **Figuras 32A e B**, respectivamente. O simpleto intenso em  $\delta H$  2,03 ppm referentes a metila **H4** ligada ao átomo de enxofre, e o sinal dos hidrogênios metilênicos **H5** em  $\delta H$  2,55 ppm indicam, em primeira instância, que este é um ligante ativo que interage com a enzima (**Figura 32B**).

**Figura 32.** Espectros do experimento de STD com atribuição dos sinais de  $^1H$  do ligante **1d** com a urease de UCE. Espectro de referência (*off-resonance*) (**A**) e espectro de STD (**B**). Parâmetros: [UCE] = 0,02 mM; [**2o**] = 2,00 mM; tampão fosfato (em D<sub>2</sub>O), pH 7,4; STD: Tsat = 1,5 s; Gauss1.1000 = 10 ms; Sinc1.1000 = 2 ms; n° scans: 64.



23

24

Fonte: Autoria própria.

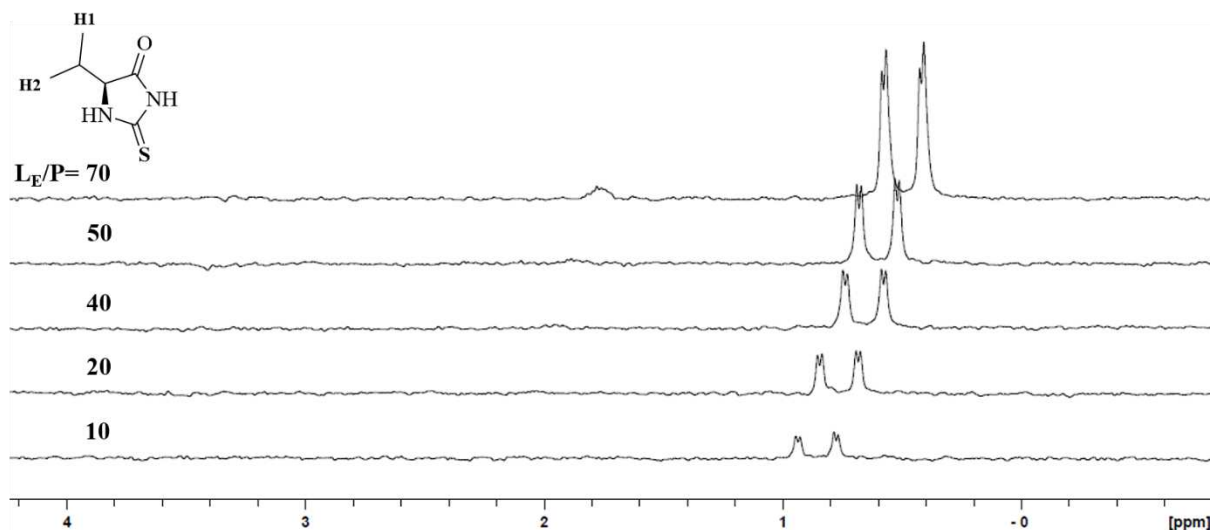
1 A hidantoína **1d**, apresentou maior intensidade observada ao efeito STD para a metila  
2 **H4** ligada ao átomo de enxofre com valor de  $A_{STD} = 2,14$  (próximo ao observado para o derivado  
3 **2b**,  $A_{STD} = 2,38$ ), definido como o parâmetro referência (100%). O efeito STD relativo dos  
4 hidrogênios metilênicos **H5** apresentou um valor de 78,9% e  $A_{STD} = 1,69$  (**Figura 32B**), porém  
5 cabe ressaltar que este sinal sofre sobreposição parcial com o DSMO deuterado ( $\delta H$  2,50 ppm)  
6 utilizado na solubilização dos compostos (mesmo que em porcentagem muito baixa em torno  
7 de 0,8%), e por isso representa apenas um valor estimado. Contudo, é possível observar que o  
8 grupo metil ligado ao enxofre, parece contribuir expressivamente para as interações com a  
9 enzima urease de UCE corroborando com os dados provenientes do ensaio colorimétrico.

### 11 3.2.5 Estudos Cinéticos por RMN: Determinação da Constante de Dissociação por STD

13 A determinação do  $K_D$  foi realizada pela aquisição de diferentes experimentos de STD  
14 para cada composto avaliado (**2a**, **2b**, **2o** e **1d**), variando-se as concentrações do ligante de  
15 interesse de 0,20 a 2,00 mM (correspondente a cada caso, um excesso de ligante de 10 a 100  
16 vezes) com a concentração da enzima (0,02 mM) mantida fixa no volume final da amostra.

17 Foi possível observar que conforme o aumento da concentração do ligante **2b**, maior  
18 foi o efeito STD, e conseqüentemente o  $A_{STD}$  observado para os prótons que apresentaram  
19 interação com a enzima (**Figura 33**, Tabela A2, Apêndice A). Esse comportamento também foi  
20 observado para os demais ligantes testados **2a** e **2o** e **1d**, cujo valores de  $A_{STD}$  obtidos estão  
21 representados na **Figura 34** (Tabela A2, Apêndice A).

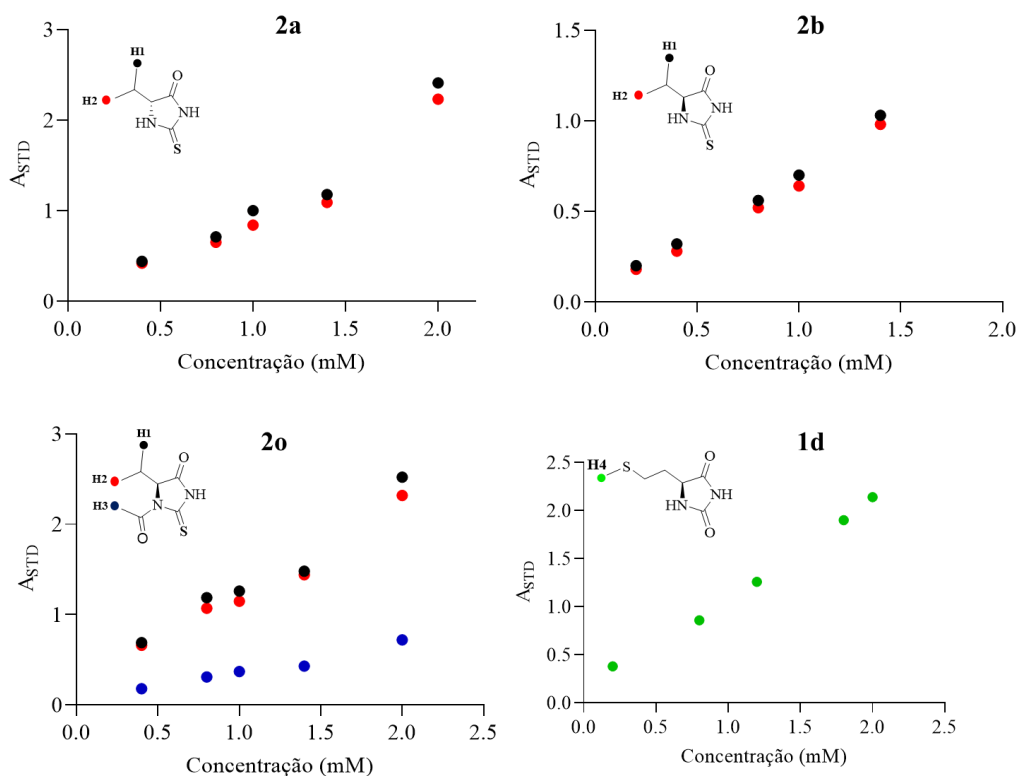
- 1 **Figura 33.** Espectros dos experimentos de STD com atribuição dos sinais de  $^1\text{H}$  do ligante **2b**  
 2 nas diferentes razões  $L_E/P$  de 10 a 70, na presença da urease de UCE. Parâmetros:  $[\text{UCE}] = 0,02$   
 3  $\text{mM}$ ;  $[\mathbf{2b}] = 0,20$  a  $1,40$   $\text{mM}$ ; tampão fosfato (em  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\text{pH } 7,4$ ; STD:  $T_{\text{sat}} = 1,5$  s;  
 4  $\text{Gauss}1.1000 = 10$  ms;  $\text{Sinc}1.1000 = 2$  ms;  $n^\circ$  scans: 64.



6 Fonte: Autoria própria.

7

- 8 **Figura 34.** Fator de amplificação do STD observado para os prótons, **H1**, **H2**, **H3** e **H4** dos  
 9 compostos **2a**, **2b**, **2o** e **1d** em função da concentração do ligante.



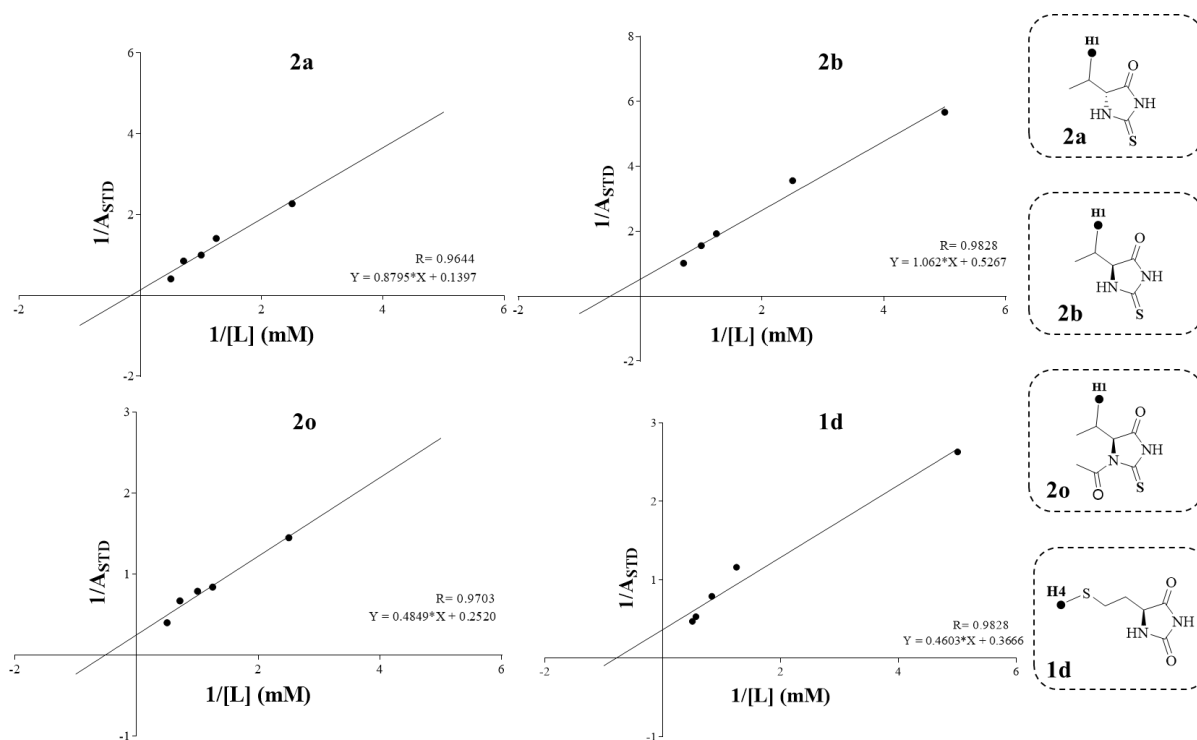
11 Fonte: Autoria própria.

1            Desta maneira, a titulação baseada nos experimentos de STD forneceu o valor de  $A_{STD}$   
 2        correspondente aos prótons que interagiram com a enzima para cada composto, onde a  
 3        estimativa do  $K_D$  e do  $\alpha_{STD}$  (**Tabela 5**) foi realizada pela linearização da **Equação 4**, resultante  
 4        das plotagens dos gráficos de Lineweaver-Burk (**Figura 35**).

$$A_{STD} = \frac{\alpha_{STD}[L]}{K_D + [L]} \quad (4)$$

8            Onde,  $A_{STD}$  é o fator de amplificação,  $\alpha_{STD}$  é o fator de amplificação máximo  
 9        observado,  $[L]$  é a concentração do ligante.

11        **Figura 35.** Plotagens de Lineweaver-Burk representativas e suas respectivas equações das retas  
 12        para as metilas **H1** e **H4** dos compostos **2a**, **2b**, **2o** e **1d** utilizadas para os cálculos do  $\alpha_{STD}$  e  
 13         $K_D$ .



14  
 15        Fonte: Autoria própria.

17            O valor do  $K_D$  médio ( $K_{Dméd}$ ) foi determinado pelo valor médio de todos os  $K_D$  dos  
 18        prótons que apresentaram efeito STD, de cada composto testado, e estão representados na  
 19        **Tabela 5**.

20

1 **Tabela 5.** Valores de  $\alpha_{STD}$ ,  $K_D$  e  $K_D$  médio para todos os prótons que apresentaram efeito STD  
 2 dos compostos **2a**, **2b**, **2o** e **1d** avaliados.

<i>L, D-aa</i>	Composto	H1		H2		H3*		H4 <sup>†</sup>		$K_{Dméd}$ (mM)
		$\alpha_{STD}$	$K_D$ (mM)	$\alpha_{STD}$	$K_D$ (mM)	$\alpha_{STD}$	$K_D$ (mM)	$\alpha_{STD}$	$K_D$ (mM)	
<i>D-val</i>	<b>2a</b>	4,54	4,09	7,16	6,29	-	-	-	-	5,19
<i>L-val</i>	<b>2b</b>	1,77	1,57	1,90	2,02	-	-	-	-	1,79
<i>L-val</i>	<b>2o</b>	3,45	1,74	3,97	1,92	1,33	2,54	-	-	2,06
<i>L-met</i>	<b>1d</b>	-	-	-	-	-	-	2,73	1,26	1,26

3 Dados apresentaram valor de  $p < 0,005$ . \*Hidrogênios metílicos do grupo acetil (COCH<sub>3</sub>). <sup>†</sup>Hidrogênios da  
 4 metila ligada ao átomo de enxofre da hidantoína **1d**.

5  
 6 Como podemos observar, os compostos **1d** e **2b**, apresentaram os menores valores de  
 7  $K_{Dméd}$  de 1,26 e 1,79 mM, respectivamente, mais uma vez, mostrando-se os mais ativos das  
 8 séries das hidantoínas e tioidantoínas avaliadas. O análogo acetilado de **2b**, o derivado **2o**, com  
 9  $K_{Dméd} = 2,06$  mM, mostrou que o grupo acetil influenciou negativamente na interação com a  
 10 enzima urease de UCE, coerentemente com a diminuição da atividade inibitória observada nos  
 11 ensaios colorimétricos (**2b**,  $K_i = 0,42$  mM ; **2o**,  $K_i = 0,57$  mM). Como esperado, o composto **2a**,  
 12 apresentou o maior valor de  $K_{Dméd} = 5,19$  mM (para ensaio colorimétrico,  $K_i = 1,13$  mM),  
 13 comprovando também por este estudo, que a configuração *S* do derivado **2b** é primordial para  
 14 interações com a enzima urease de UCE.

15 Em busca de se observar efeitos comparativos entre os resultados obtidos para a  
 16 constante de inibição  $K_i$ , proveniente dos ensaios *in vitro* e a constante de dissociação  $K_D$  dos  
 17 estudos de STD dos compostos que apresentaram inibição do tipo mista (**2a**, **2b** e **2o**), o  
 18 composto **1d** não foi inserido na análise, pois sua constante é determinada pelo produto entre o  
 19  $K_i$  e o parâmetro alfa, não sendo possível ajustar separadamente o cálculo da constante de  
 20 inibição (sessão 3.2.3), assim não sendo coerente a comparação com o  $K_D$  proveniente do ensaio  
 21 STD. Foi realizada uma análise do coeficiente de Correlação de Pearson ( $r$ ), que avalia a  
 22 correlação linear entre duas variáveis quantitativas sendo uma medida adimensional da  
 23 covariância, com valores situados entre -1 a +1, onde:

24  $r = 1$ , que indica uma correlação perfeita positiva entre as duas variáveis;

25  $r = -1$ , que indica uma correlação negativa perfeita entre as duas variáveis (o aumento de uma,  
 26 sempre diminui a outra); e

1  $r = 0$ , que indica que não há dependência linear uma da outra, mas o resultado deve ser  
2 investigado por outros meios (MIOT, 2018).

3 A análise de correlação entre as duas variáveis indicou um  $r = 1,00$  (**Tabela 6**) (ou  
4 100%) o que significa uma correlação perfeita positiva entre as duas variáveis (SCHOBER;  
5 SCHWARTE, 2018).

6  
7 **Tabela 6.** Comparação entre as constantes  $K_i$  e  $K_D$ , através do coeficiente de correlação de  
8 Pearson dos compostos **2a**, **2b** e **2o** avaliados.

<i>L, D-aa</i>	<b>R</b>	<b>Tioidantoína</b>	$K_i$ mM ( <i>in vitro</i> )	$K_D$ mM (STD)	<i>r</i>
<i>D-val</i>	H	<b>2a</b>	1,13	5,19	1,00
<i>L-val</i>	H	<b>2b</b>	0,42	1,79	
<i>L-val</i>	COCH <sub>3</sub>	<b>2o</b>	0,57	2,06	

9

10 Desta maneira, os resultados obtidos pela aplicação da técnica de STD, revelaram  
11 detalhes em nível molecular sobre o modo de interação entre os inibidores e a urease. Além  
12 disso, os resultados de STD se refletiram semi-quantitativamente as atividades inibitórias dos  
13 ensaios colorimétricos tradicionalmente utilizados, indicando que o STD apresenta potencial  
14 como ferramenta alternativa aos métodos convencionais de determinação de parâmetros  
15 qualitativos ou quantitativos como a determinação de constantes de dissociação.

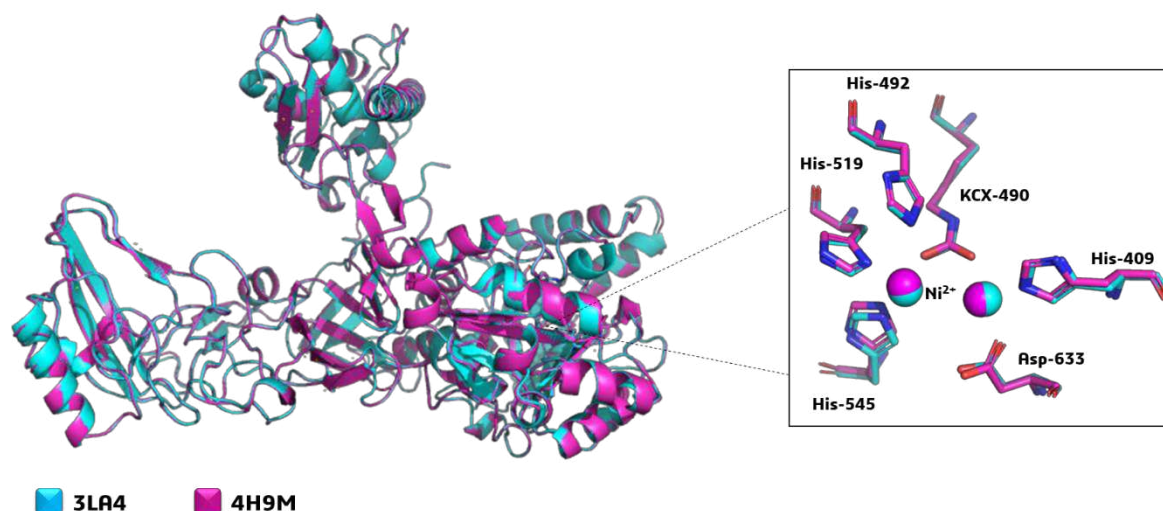
16

### 17 3.2.6 Estudos por Docagem Molecular

18 Até a presente data deste trabalho, existem duas estruturas tridimensionais da enzima  
19 de *Canavalia ensiformis* disponíveis no Banco de Dados de Proteínas (*Protein Data Bank*). A  
20 primeira, disponibilizada pelo código PDB 3LA4, com resolução de 2.05 Å, que possui dois  
21 íons fosfato no sítio ativo (BALASUBRAMANIAN; PONNURAJ, 2010) e a outra pelo código  
22 PDB 4H9M, com resolução de 1.52 Å, em complexo com o inibidor ácido acetohidroxâmico  
23 no sítio ativo. A sobreposição das duas estruturas cristalográficas é representada na **Figura 36**,  
24 onde é possível observar que ambas possuem alta similaridade entre os arranjos tridimensionais  
25 e do sítio ativo da urease de UCE.

26

1 **Figura 36.** Comparação entre os arranjos tridimensionais e do sítio ativo das estruturas  
 2 cristalográficas da urease de UCE: 3LA4 (azul) e 4H9M (rosa).



3

4 Fonte: Autoria própria.

5

6 Essas estruturas possuem quatro resíduos de aminoácidos modificados, sendo três  
 7 resíduos de cisteína, CME59, CME207 e CME592, e uma lisina carboamilada KCX490 que faz  
 8 ponte entre os íons níquel. Balasubramanian *et al.*, relataram que na estrutura 3LA4, as três  
 9 cisteínas sofreram modificação covalente (para Cys-S-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH) pelo β-mercaptoetanol  
 10 presente no tampão de purificação utilizado (BALASUBRAMANIAN; PONNURAJ, 2010).  
 11 Informações sobre a estrutura 4H9M ainda não foram publicadas, mas provavelmente seguem  
 12 o mesmo padrão. Desta maneira nós realizamos nossos estudos de docagem molecular  
 13 utilizando a estrutura 3LA4, removendo os fragmentos e confôrmeros das cisteínas  
 14 modificadas, e o grupo *N*-carboxila da lisina, uma vez que os programas de docagem molecular  
 15 não reconhecem esses resíduos modificados.

16 Vários processos de validação são utilizados para protocolos de docagem molecular.  
 17 Apesar do processo mais usual ser o *redocking*, em que a docagem é realizada com o intuito de  
 18 se verificar se o protocolo é capaz de permitir que o programa reproduza a pose no mesmo local  
 19 da estrutura do co-cristal, outros modelos podem ser aplicados, como por exemplo a análise por  
 20 *cluster*, onde o agrupamento de poses fornece uma alternativa à classificação de energia para a  
 21 identificação de poses prováveis (MORRIS *et al.*, 1998), e o consenso onde duas ou mais  
 22 funções de pontuação são avaliadas, onde as poses que apresentarem RMSD (do inglês, *Root-*  
 23 *Mean-Square Deviation*) menor que 2,00 são selecionadas. Muitos estudos têm demonstrado  
 24 que a docagem consensual é uma abordagem que aumenta a performance das simulações em  
 25 comparação com o escore e a predição de poses quando comparado à utilização de apenas uma

1 só função de pontuação (WOLF; ZIMMERMANN; HOFMANN-APITIUS, 2007).

2 Portanto, considerando a importância do processo de validação da docagem molecular  
3 e a confiabilidade da pose obtida nos estudos, optamos por aplicar neste trabalho a docagem  
4 molecular validada por consenso, uma vez que utilizamos a enzima 3LA4 que não possui  
5 inibidor co-cristalizado e o programa GOLD, aplicando suas quatro funções de pontuação:  
6 ChemScore, ChemPLP, GoldScore e ASP.

7 Após avaliação *in vitro* pelos ensaios colorimétricos e STD, estudos de docagem  
8 molecular foram realizados com o objetivo de obter maiores informações sobre os efeitos das  
9 tioidantoínas **2a**, **2b**, **2o** e da hidantoína **1d** na enzima UCE, avaliando sua afinidade pelo sítio  
10 ativo da enzima e em um sítio alostérico, uma vez que os perfis inibitórios desses inibidores se  
11 demonstraram do tipo misto e incompetitivo. Entre as quatro funções de pontuação utilizadas  
12 nos estudos realizados no sítio ativo da enzima, ChemScore e ASP apresentaram os menores  
13 valores de RMSD entre si para o composto **2o**, ChemScore e ChemPLP para **2b** e ChemScore  
14 e GoldScore para **2a** (Tabela 7), desta maneira, as poses resultantes destes processos foram  
15 selecionadas para a análise das interações. Como a hidantoína **1d** apresentou perfil inibitório  
16 do tipo incompetitivo, e por isso não possui a probabilidade de afinidade de ligação no sítio  
17 ativo da enzima, desta maneira não foi incluída neste estudo de docagem molecular.

1 **Tabela 7.** RMSD entre as poses resultantes das funções de pontuação empregadas no programa  
 2 GOLD para o sítio ativo de UCE. Em negrito, a pose consensual selecionada a partir do menor  
 3 valor de RMSD.

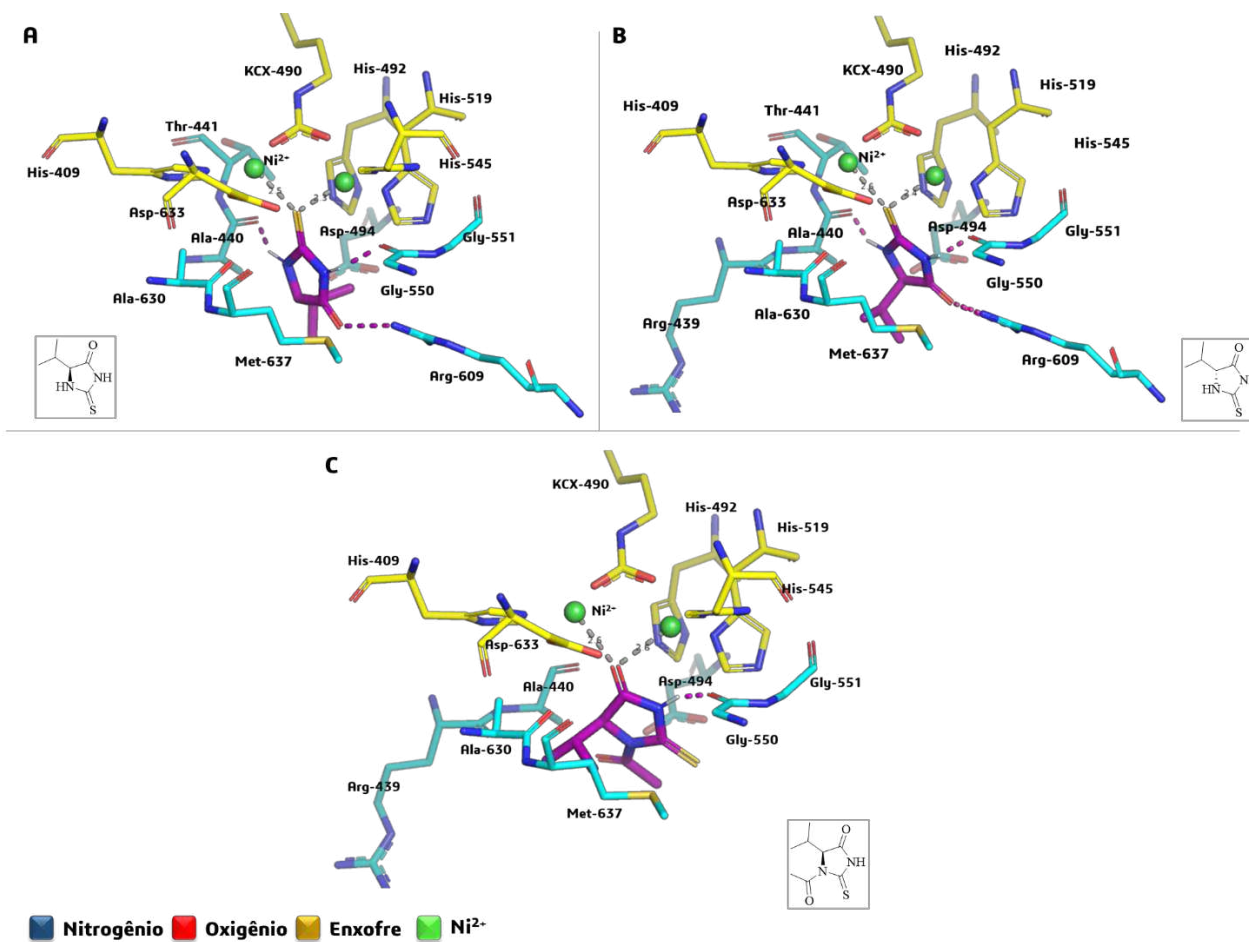
Composto	GoldScore	ChemPLP	ChemScore	ASP	
<b>2a</b>	<b>GoldScore</b>	0	2,52	<b>1,80</b>	2,30
	<b>ChemPLP</b>	2,52	0	2,84	2,79
	<b>ChemScore</b>	<b>1,80</b>	2,84	0	1,90
	<b>ASP</b>	2,30	2,79	1,90	0
<b>2b</b>	<b>GoldScore</b>	0	1,77	1,62	1,93
	<b>ChemPLP</b>	1,77	0	<b>0,29</b>	0,39
	<b>ChemScore</b>	1,62	<b>0,29</b>	0	0,40
	<b>ASP</b>	1,93	0,39	0,40	0
<b>2o</b>	<b>GoldScore</b>	0	3,46	3,82	4,21
	<b>ChemPLP</b>	3,46	0	3,38	3,79
	<b>ChemScore</b>	3,82	3,38	0	<b>1,70</b>
	<b>ASP</b>	4,21	3,79	<b>1,70</b>	0

4

5 As simulações de docagem por consenso dos complexos ligante-UCE no sítio ativo  
 6 exibiram em comum interações por ligação de hidrogênio com os resíduos Ala440, Gly550 e  
 7 Arg609, além de coordenação com os átomos de metal Ni<sup>2+</sup> (**Figura 37**).

8 Como mostrado na **Figura 37A**, o átomo de enxofre do núcleo da tioidantoína **2b**  
 9 coordena com o íon Ni<sup>2+</sup> a 2.5 Å de distância, enquanto o N-H de N1 está envolvido com  
 10 interações de ligações de hidrogênio com o resíduo Ala440. O átomo de oxigênio do anel  
 11 tioidantoínico faz interação de ligação de hidrogênio com o resíduo Arg609, enquanto o N2  
 12 interage com o resíduo Gly550. É importante ressaltar que o modo de ligação deste composto  
 13 no sítio ativo da enzima, permite interações hidrofóbicas com resíduos importantes para a  
 14 atividade catalítica, como His409, KCX-490, His492, His519, His545 e Asp633 (em amarelo,  
 15 **Figura 34**), envolvidos no ambiente de coordenação com os íons níquel (BENINI *et al.*, 1999).  
 16 Além disso, a cadeia lateral alifática com o grupo isopropílico, permite interações com os  
 17 aminoácidos Thr441, Asp494, Gly551, Ala630 e Met637. Todas estas informações discutidas  
 18 para **2b**, foram observáveis para os derivados **2a** e **2o**, com o adicional de que a configuração  
 19 *R* de **2a** permitiu a interação com o resíduo Arg439 (**Figura 37B**), assim como observado para  
 20 **2o** devido a presença do grupo acetil na posição N1 do anel. Ainda para **2o**, foi observada a  
 21 coordenação com os íons de Ni<sup>2+</sup> realizada pelo átomo de oxigênio ao invés do enxofre (que  
 22 apresentou modo de ligação inversa a **2b**), e a perda das ligações de hidrogênio Ala440 e  
 23 Arg609 (**Figura 37C**).

- 1 **Figura 37.** Diagramas de interação das poses consensuais das tioidantoinas **2b** (A), **2a** (B), **2o** (C) no sítio ativo de UCE. Resíduos de interação  
2 são representados por bastão nas cores azul e amarela em referência aos resíduos participantes da atividade catalítica. As linhas em cor magenta  
3 tracejadas representam as interações de ligações de hidrogênio com resíduos e as de cor cinza a coordenação com o metal.



4

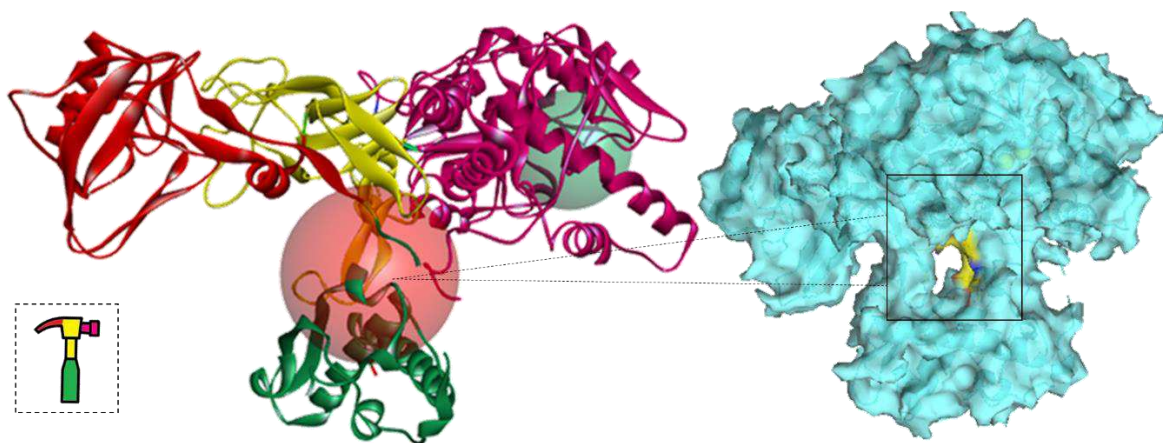
5 Fonte: Autoria própria.

1 Inibidores mistos e incompetitivos podem se ligar a sítios alostéricos, desta maneira,  
2 possíveis sítios diferentes ao ativo na enzima de UCE foram mapeados através do programa  
3 FTMap. O FTMap é um servidor de mapeamento computacional que identifica regiões da  
4 superfície de macromoléculas com contribuições importantes para a energia livre de ligação do  
5 ligante (KOZAKOV *et al.*, 2016).

6 O monômero de UCE é subdividido em quatro domínios, que se assemelha à forma de  
7 um martelo (**Figura 38**): o domínio *N*-terminal  $\alpha\beta$  (1–134, em verde) que se conecta ao domínio  
8  $\beta$  (286-401 e 702-761, em amarelo) formando o “cabo do martelo”, por sua vez este domínio  $\beta$   
9 está conectado a dois outros domínios  $\alpha\beta$ , um deles o domínio C-terminal (também chamado  
10 de *TIM-barrel domain*) (402–701 e 762–840, em magenta) onde está o sítio ativo, e o outro  
11 domínio  $\alpha\beta$  (135-285, em vermelho) formando a “cabeça do martelo” (**Figura 38**)  
12 (BALASUBRAMANIAN; PONNURAJ, 2010). O programa foi capaz de mapear dois sítios de  
13 interação possíveis, sendo um deles a região do sítio ativo (esfera verde, **Figura 38**), e um sítio  
14 entre a junção dos domínios  $\alpha\beta$  (1-134) e  $\beta$  (286-401, 702-761) (esfera vermelha, **Figura 38**),  
15 em uma cavidade profunda localizada no “cabo do martelo”.

16

17 **Figura 38.** Representação tridimensional dos domínios do monômero da urease de UCE  
18 (PDB: 3LA4), e os possíveis sítios de interação calculados pelo FTMap. Esfera vermelha  
19 representa o sítio alostérico, e a esfera verde o sítio ativo.



20

21 Fonte: Autoria própria.

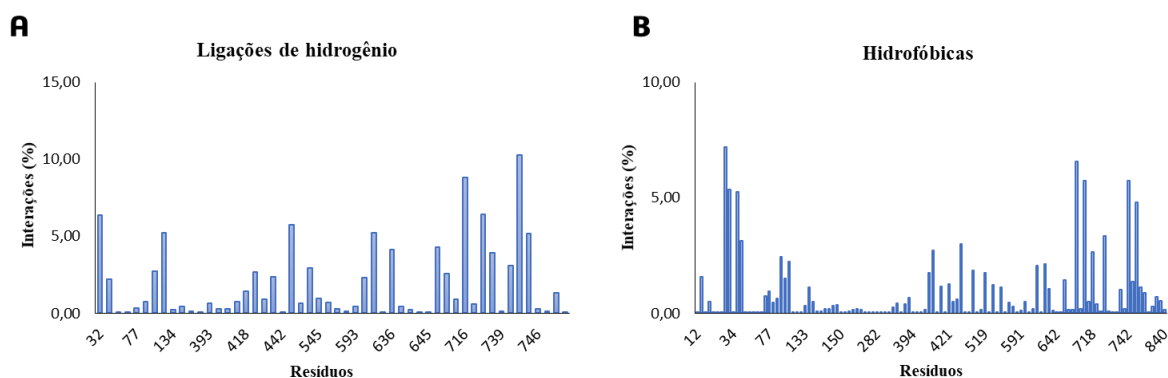
22

23 As interações dos resíduos por ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas maiores  
24 que 5% foram consideradas para a análise dos *clusters* gerados pelo mapeamento (**Figura 39**).

1 Os resíduos que apresentaram maior porcentagem de interação por ligação de hidrogênio foram  
 2 Tyr32, Gln82, His492, Asp633, Lys716, Glu718, Glu742 e Val744 (**Figura 39A**). Já os  
 3 resíduos com interações hidrofóbicas foram Thr33, Val36, Phe712, Lys716 e Glu742 (**Figura**  
 4 **39B**). Com exceção dos resíduos His492 e Asp633 que são pertencentes ao sítio ativo já  
 5 avaliado, os demais resíduos foram considerados para análise dentro do protocolo adotado para  
 6 a docagem consensual do sítio alostérico.

7

8 **Figura 39.** Gráficos das porcentagens de interação de (A) ligações de hidrogênio e (B)  
 9 interação hidrofóbicas com os resíduos da enzima UCE.



10

11 Fonte: Autoria própria.

12

13 Entre as quatro funções de pontuação utilizadas, ChemPLP e ASP apresentaram os  
 14 menores valores de RMSD entre si para o composto **2a** e **2o**, sendo que para o último o valor  
 15 de RMSD obtido foi maior que dois (2,52), indicando que este ligante possivelmente adota  
 16 diferentes conformações e interações no sítio em estudo. Para **2b**, os menores valores de RMSD  
 17 foram observados entre as funções GoldScore e ASP, e por fim ChemPLP e GoldScore para **1d**  
 18 (**Tabela 8**), as poses resultantes destes processos foram selecionadas para a análise das  
 19 interações.

20

21

1 **Tabela 8.** RMSD entre as poses resultantes das funções de pontuação empregadas no programa  
 2 GOLD para o sítio alostérico de UCE. Em negrito pose consensual selecionada a partir do  
 3 menor valor de RMSD.

Composto	GoldScore	ChemPLP	ChemScore	ASP	
<b>2a</b>	<b>GoldScore</b>	0	4,86	4,14	4,39
	<b>ChemPLP</b>	4,86	0	8,10	<b>2,52</b>
	<b>ChemScore</b>	4,14	8,10	0	7,19
	<b>ASP</b>	4,39	<b>2,52</b>	7,19	0
<b>2b</b>	<b>GoldScore</b>	0	3,34	7,59	<b>1,27</b>
	<b>ChemPLP</b>	3,34	0	5,53	3,75
	<b>ChemScore</b>	7,59	5,53	0	7,93
	<b>ASP</b>	<b>1,27</b>	3,75	7,93	0
<b>2o</b>	<b>GoldScore</b>	0	1,64	8,13	1,62
	<b>ChemPLP</b>	1,64	0	7,54	<b>0,64</b>
	<b>ChemScore</b>	8,13	7,54	0	7,40
	<b>ASP</b>	1,62	<b>0,64</b>	7,40	0
<b>1d</b>	<b>GoldScore</b>	0	<b>1,13</b>	5,26	2,74
	<b>ChemPLP</b>	<b>1,13</b>	0	5,60	2,73
	<b>ChemScore</b>	5,26	5,60	0	5,79
	<b>ASP</b>	2,74	2,73	5,79	0

4  
 5 As simulações de docagem por consenso dos complexos ligante-UCE no sítio  
 6 alostérico exibiram em comum interações por ligação de hidrogênio com os resíduos Tyr32 e  
 7 Glu718 (**Figura 40**).

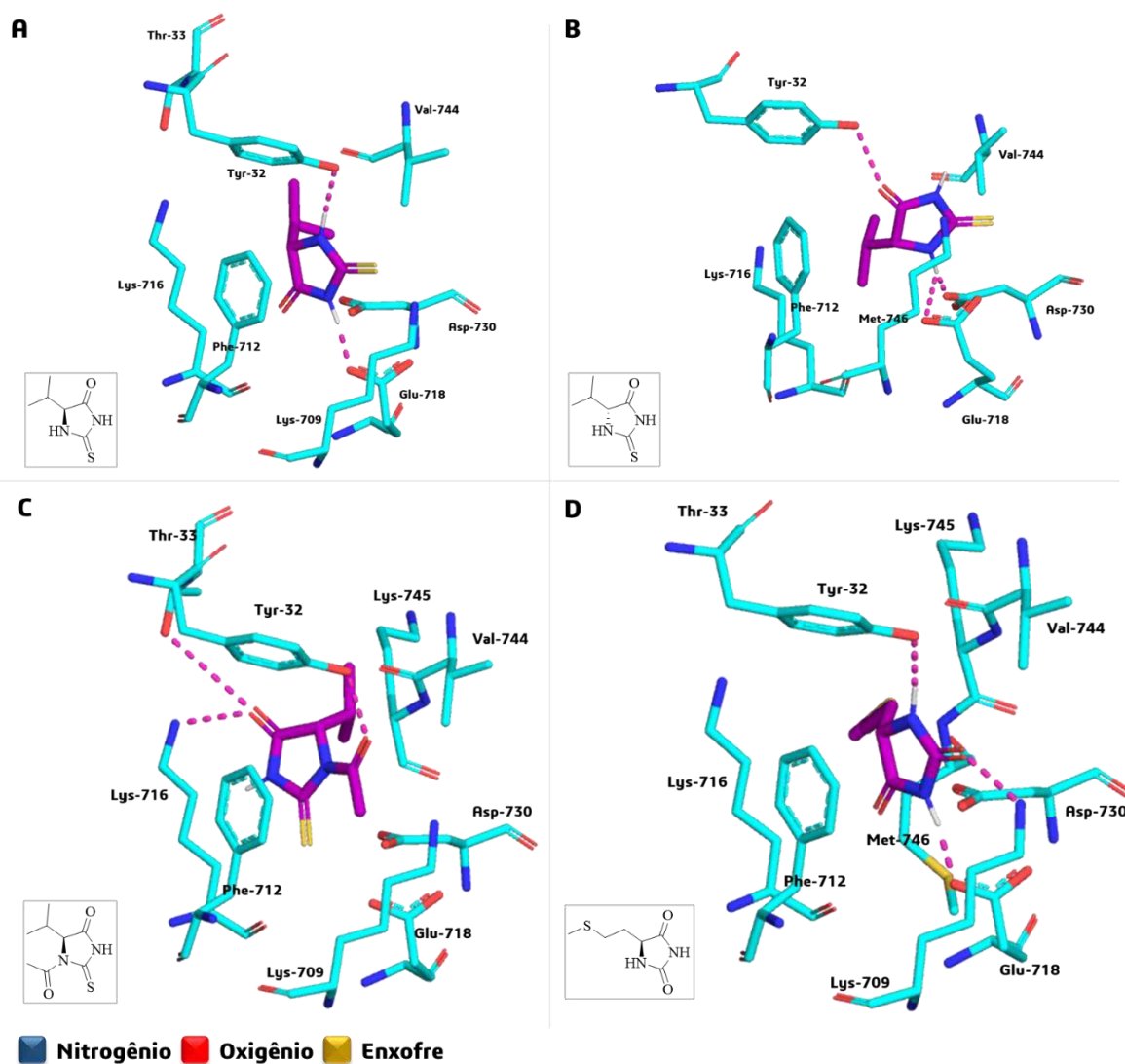
8 Como mostrado na **Figura 40A**, os átomos de N-H de N1 e N2 do núcleo da  
 9 tioidantoína **2b** estão envolvidos em interações de ligações de hidrogênio com os resíduos  
 10 Tyr32 e Glu718, respectivamente. Também foi possível observar que o modo de ligação deste  
 11 composto no sítio alostérico da enzima, permitiu interações hidrofóbicas com resíduos Thr33,  
 12 Phe712, Lys709, Lys716, Asp730 e Val744. O derivado **2a** (enantiômero *R*), apresentou modo  
 13 de interação semelhante com os mesmos resíduos, porém projetada no espaço um pouco mais  
 14 à direita do sítio de ligação, sendo a ligação de hidrogênio com a Tyr32 realizada pelo átomo  
 15 de oxigênio do anel tioidantoínico, além da interação hidrofóbica observada com o resíduo  
 16 Met746 ao invés da Lys709, provavelmente proveniente da interação com o grupo isopropílico  
 17 que está projetado à frente, ao contrário do observado para o enantiômero *S* **2b** (**Figura 40B**).  
 18 Para o derivado acetilado **2o**, a ligação de hidrogênio com a Tyr32 foi realizada pelo átomo de

1 oxigênio do grupo acetil na posição N1 do anel tioidantoinico. O outro átomo de oxigênio do  
 2 anel, realizou ligações de hidrogênio com os resíduos Thr33 e Lys716, para este derivado não  
 3 foram observadas ligações de hidrogênio com o resíduo Glu718. As interações hidrofóbicas  
 4 observadas foram as mesmas das do composto **2b** (Figura 40C).

5

6 **Figura 40.** Diagramas de interação das poses consensuais das tioidantoinas **2b** (A), **2a** (B), **2o**  
 7 (C) e a hidantoina **1d** (D) no sítio alostérico de UCE. Resíduos de interação são representados  
 8 por bastão nas cores azul. As linhas em cor magenta tracejadas representam as interações de  
 9 ligações de hidrogênio.

10



11

12 Fonte: Autoria própria.

13

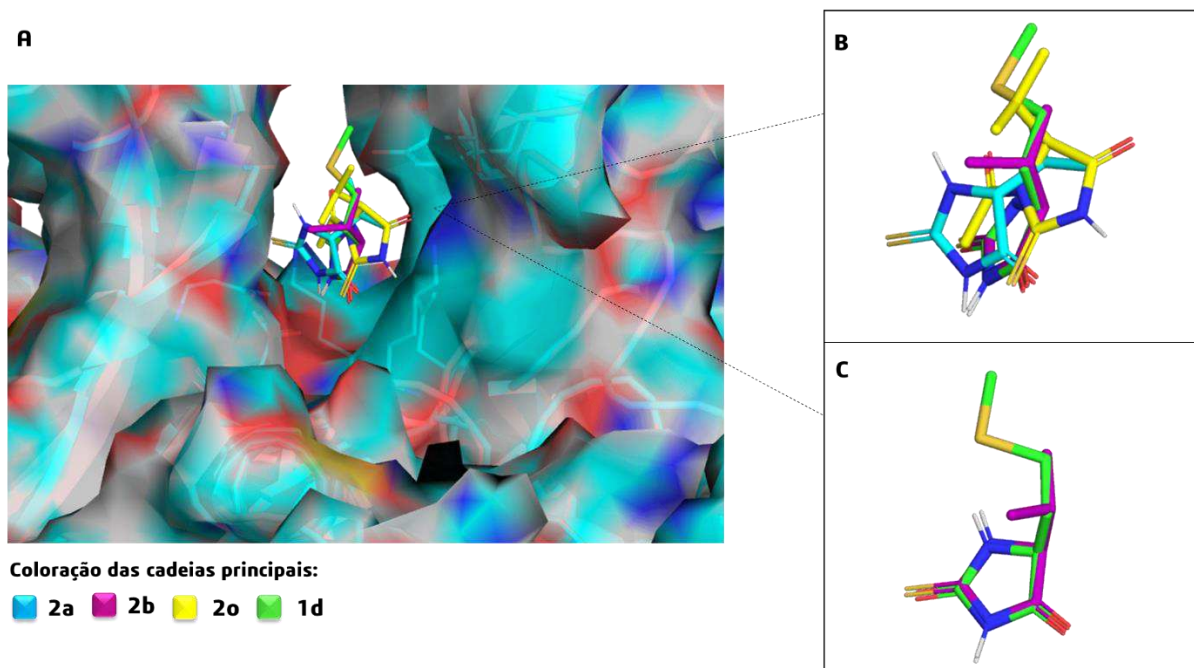
14 A hidantoina **1d**, apresentou as mesmas interações por ligação de hidrogênio com os

1 resíduos Tyr32 e Glu718 assim como **2b**, com a ligação de hidrogênio adicional realizada entre  
 2 o átomo de oxigênio do núcleo hidantoínico com o resíduo Lys709. As interações hidrofóbicas  
 3 também foram observadas assim como para **2b**, com interações adicionais observadas para os  
 4 resíduos Lys745 e Met746, proveniente da interação com a cadeia lateral alifática mais extensa  
 5 (**Figura 40D**).

6 É interessante ressaltar, que todos os compostos apresentaram modo de interação  
 7 semelhante no sítio alostérico (**Figura 41A-B**), porém a sobreposição dos modos de ligação  
 8 (poses) dos compostos **2b** e **1d**, demonstraram que esses foram capazes de se alocarem no bolso  
 9 de interação com a mesma conformação e orientação (**Figura 41C**).

10

11 **Figura 41.** Modos de interação das poses consensuais das tioidantoínas (A e B) **2b**, **2a**, **2o** e a  
 12 hidantoína **1d** no sítio alostérico de UCE; (C) Sobreposição entre as poses consensuais de **2b** e  
 13 **1d** no sítio alostérico. Compostos estão representados na forma de bastão nas cores azul (**2a**),  
 14 magenta (**2b**), amarelo (**2o**) e verde (**1d**).



15

16 Fonte: Autoria própria.

17

18 De modo geral, os estudos realizados de docagem molecular demonstraram que a  
 19 tioidantoína **2a** apresentou maior afinidade pelo sítio ativo, uma vez que nos estudos das  
 20 interações no sítio alostérico apresentou valores de RMSD > 2.00. Isto é coerente com os dados  
 21 observados no estudo experimental *in vitro*, uma vez que para o composto **2a** o valor de alfa

1 observado foi de  $\alpha = 2,67$ , onde a ligação é considerada quase inteiramente à enzima livre.

2 Também foi possível observar que os compostos **2b** ( $\alpha = 1,83$ ), **2o** ( $\alpha = 1,08$ )  
3 apresentam maiores interações por ligações de H e hidrofóbicas no sítio ativo, do que no sítio  
4 alostérico, o que condiz com os resultados experimentais onde esses compostos apresentaram  
5 valores de alfa  $< 1$  onde a probabilidade de afinidade de ligação é pela enzima livre.

6 Além de que os compostos **2b** e **1d** apresentaram modos de interação muito  
7 semelhantes, orientação e conformação praticamente idênticas no sítio alostérico. Os resultados  
8 também mostraram uma participação crucial dos átomos de oxigênio, enxofre e N-H do anel  
9 da tioidantoína e hidantoína nas interações de ligação mais importantes entre os ligantes e o  
10 alvo, indicando que esse anel possivelmente atua como grupo farmacofórico nessa série de  
11 compostos.

## 1 4 CONCLUSÕES

2

3 A metodologia da reação de condensação direta de *L*-aminoácidos com a ureia (para a  
4 síntese das hidantoínas), ou tioureia (para a síntese da tioidantoína **2a**), permitiu a obtenção  
5 eficiente de hidantoínas com cadeias laterais não polares, tais como valina, leucina, metionina,  
6 fenilalanina, triptofano, e polar como a tirosina em bons rendimentos e alto grau de pureza  
7 diretamente por recristalização. Os derivados de aminoácidos de cadeia curta ou hidrofílica por  
8 sua vez foram obtidos em metodologia *one pot* com cianato de sódio e ureia com posterior  
9 ciclização na presença de HCl para formação da hidantoína de interesse em rendimentos baixos  
10 a bons.

11 O estudo de inibição da urease de UCE *in vitro*, mostrou que as tioidantoínas  
12 apresentam alta porcentagem de inibição, sendo o composto mais ativo **2b** (derivada da *L*-  
13 valina) , aproximadamente duas vezes mais potente que o inibidor de referência tioureia,  
14 comprovando que esta classe de compostos é promissora para o desenvolvimento de novos  
15 inibidores de urease. A inserção do grupo acetil na posição N1 do anel tioidantoínico provou  
16 prejudicar a atividade inibitória, bem como a substituição do grupo tioxo pelo grupo  
17 carbonílico, uma vez que as hidantoínas não apresentaram bons efeitos inibitórios, com exceção  
18 do compostos **1d** (derivada da *L*-metionina), único a apresentar enxofre em sua cadeia lateral,  
19 indicando que o enxofre pode apresentar influência na inibição enzimática. Os estudos de  
20 cinética enzimática demonstraram perfil de inibição mista para todas as tioidantoínas avaliadas,  
21 e inibição incompetitiva para a hidantoína avaliada, sendo possível a determinação de seus  
22 valores de constante de inibição, que se demonstraram coerentes ao estudo de inibição direta.

23 O uso da técnica de STD forneceu o mapeamento de epítomos através da determinação  
24 do efeito STD e  $A_{STD}$  e dados quantitativos para as  $K_D$  para a interação entre os inibidores  
25 testados e a urease de UCE. Os resultados demonstram que a configuração absoluta da  
26 tioidantoína derivada do aminoácido valina (**2a/2b**) é crucial para a afinidade com a enzima,  
27 sendo o derivado mais promissor a tioidantoína proveniente do aminoácido natural (*L*),  
28 considerando tanto os valores de  $K_D$ , como as porcentagens de inibição determinadas nos  
29 ensaios *in vitro*. Estes resultados sugerem, portanto, que a técnica de STD, além de revelar  
30 detalhes de interação em nível atômico, se refletiram semi-quantitativamente apresentando  
31 potencial como ferramenta alternativa para a obtenção de parâmetros cinéticos e estudos de  
32 interação ligante-alvo molecular de interesse aos de ensaios bioquímicos tradicionais.

33 Os estudos realizados de docagem molecular demonstraram que as tioidantoínas e a

1 hidantoína avaliadas apresentaram afinidade tanto pelo sítio ativo da enzima UCE como pelo  
2 sítio alostérico avaliado no caso do derivado **1d**, inibidor incompetitivo. Os compostos **2b** e **1d**  
3 apresentaram modos de interação muito semelhantes, e orientação e conformação praticamente  
4 idênticas no sítio alostérico, corroborando com o observado nos ensaios *in vitro*. A análise das  
5 interações dos compostos com o alvo molecular sugere que oxigênio, enxofre e N–H  
6 participaram de todas as interações de ligações de hidrogênio com resíduos importantes da  
7 enzima UCE, sugerindo que os anéis tioidantóinico e hidantóinico podem ser considerados  
8 grupos farmacofóricos nessas séries de compostos.

9

10

## 1 5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

2

### 3 5.1 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

4

5 Os pontos de fusão (pf) dos compostos sintetizados foram determinados em aparelho  
6 digital da marca Microquímica Ltda (Palhoça – SC, BR) modelo MQAPF-302 e não foram  
7 corrigidos.

8 Os espectros de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram adquiridos em  
9 espectrômetro Bruker (Billerica, MA, EUA) modelo: Avance III, operando a 400 MHz para  $^1\text{H}$   
10 e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ , em temperatura de 25 °C, equipado com sondas multinucleares de 5 mm.  
11 Foram utilizados água ( $\text{D}_2\text{O}$ , 4,70 ppm), dimetilsulfóxido ( $\text{DMSO-}d_6$ , 2,50 ppm) como  
12 solventes deuterados e tetrametilsilano (TMS, 0,00 ppm) como padrão interno. A  
13 multiplicidade dos prótons nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  são relatados como simpleto (s),  
14 simpleto largo (sl), duplete (d), duplo-duplete (dd), duplo-duploduplete (ddd), tripleto (t),  
15 quarteto (q) e multiplete (m). As constantes de acoplamento (J) são relatadas em Hz.

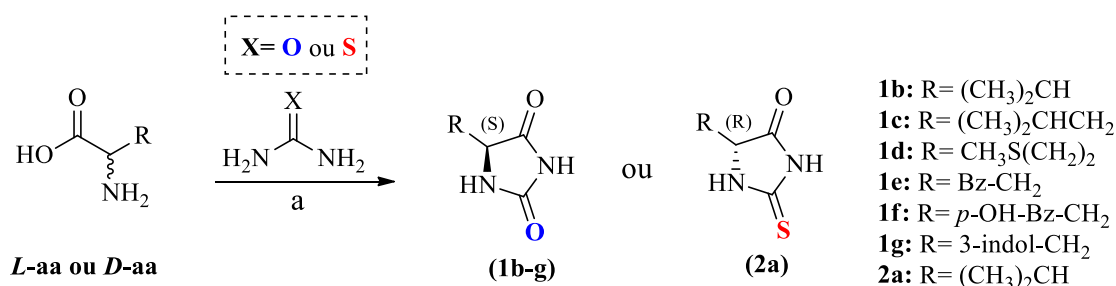
16

### 17 5.2 SÍNTESE DAS HIDANTOÍNAS DERIVADAS DE AMINOÁCIDOS

18

19 5.2.1 Síntese de Hidantoínas e Tioidantoína a Partir da Condensação Direta de *L* ou *D*-aa com  
20 Ureia (Adaptado de WANG; SHEIKH; ZHANG, 2006).

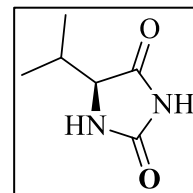
21



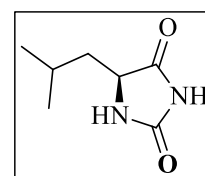
Em um balão de fundo redondo, o *L* ou *D*-aminoácido (20 mmol) e a ureia ou tioureia (60 mmol) foram adicionados e aquecidos a temperatura controlada de 170-180 °C por 35 minutos, em banho de areia sob agitação magnética constante. Após o término do tempo reacional, deixou-se a mistura arrefecer, e então foram adicionados aproximadamente 20 mL de água destilada gelada. A mistura novamente foi aquecida até a solubilização dos sólidos

1 formados durante o resfriamento, e então foi resfriada em geladeira por 24 horas. O produto  
 2 cristalizado formado foi filtrado e lavado com água destilada gelada (aproximadamente 10 mL).  
 3 Para a substância **1b** e **2a**, foi necessário ainda um processo de recristalização em água.

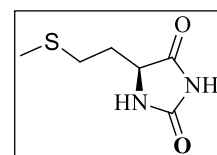
4  
 5 **(S)-5-isopropil-imidazolidin-2,4-diona (1b)** . Rendimento 1200 mg  
 6 (39%); sólido amarelo; pf 145-146 °C; RMN de <sup>1</sup>H (400,13 MHz,  
 7 DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0,79 (d, J= 6,79 Hz, 3H), 0,94 (d, J= 6,96 Hz, 3H), 1,95-  
 8 2,02 (m, 1H), 3,90 (dd, J= 1,14/3,43 Hz, 1H), 7,92 (s, 1H) 10,6 (s, 1H);  
 9 RMN de <sup>13</sup>C (100,61 MHz, DMSO- *d*<sub>6</sub>) δ 16,29 (CH<sub>3</sub>), 19,01 (CH<sub>3</sub>),  
 10 29,99 (CH), 63,20 (CH), 158,3 (C=O), 175,9 (C=O).



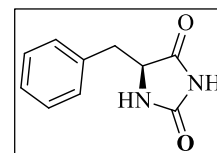
11  
 12 **5-isobutil-imidazolidin-2,4-diona (1c)**. Rendimento 2250 mg (72%);  
 13 sólido amarelo; pf 215–216 °C; RMN de <sup>1</sup>H (400,13 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ  
 14 0,88 (t, J= 6,60 Hz, 6H), 1,35-1,52 (m, 2H), 1,72-1,82 (m, 1H), 4,00 (ddd,  
 15 J= 0,95/4,42 Hz, 1H), 10,08 (br, 1H), 11,69 (s, 1H); RMN de <sup>13</sup>C (100,61  
 16 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 21,91 (CH<sub>3</sub>), 23,54 (CH<sub>3</sub>), 24,57 (CH<sub>2</sub>), 41,16 (CH),  
 17 56,61 (CH), 157,95 (C=O), 177,09 (C=O).



18  
 19 **5-(2-(metiltio)etil)-imidazolidin-2,4-diona (1d)**. Rendimento 1720 mg  
 20 (49%); sólido amarelo; pf 104-105 °C; RMN de <sup>1</sup>H (400,13 MHz,  
 21 DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1,71-1,80 (m, 1H), 1,88-1,97 (m, 1H), 2,03 (s, 3H), 2,50-  
 22 2,54 (m, 2H), 4,09 (dd<sub>a</sub>, J= 4,70 Hz, 1H), 8,00 (s, 1H), 10,6 (s, 1H); RMN  
 23 de <sup>13</sup>C (100,61 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 14,88 (CH<sub>3</sub>), 29,18 (CH<sub>2</sub>), 31,32  
 24 (CH<sub>2</sub>), 57,01 (CH), 157,89 (C=O), 176,40 (C=O).



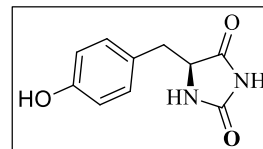
25  
 26 **5-benzil-imidazolidin-2,4-diona (1e)**. Rendimento 3120 mg (82%);  
 27 sólido amarelo; pf 183-185 °C; RMN de <sup>1</sup>H (400,13 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ  
 28 2,93 (d, J = 4,87 Hz, 2H), 4,33 (t<sub>a</sub>, J= 4,59 Hz, 1H), 7,16-7,29 (m, 5H),  
 29 7,92 (s, 1H), 10,4 (s, 1H); RMN de <sup>13</sup>C (100,61 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 36,71  
 30 (CH<sub>2</sub>), 58,86 (CH), 127,17 (CH), 128,56 (CH), 130,20 (CH), 135,93 (C),  
 31 157,61 (C=O), 175,75 (C=O).



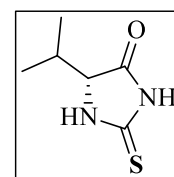
32

33

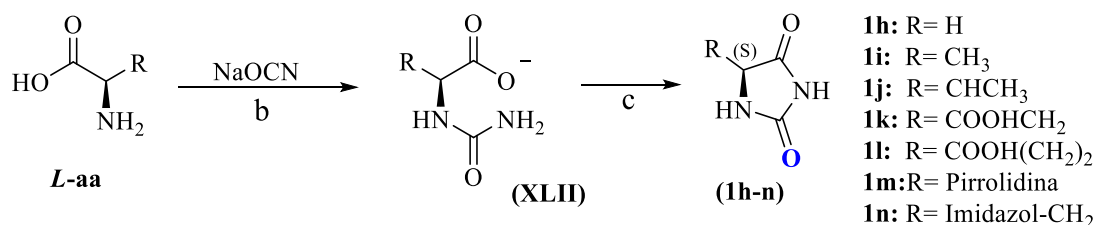
1 **5-(4-hidroxibenzil)-imidazolidin-2,4-diona (1f)**. Rendimento 3710  
 2 mg (90%); sólido amarelo; pf 258-259 °C; RMN de <sup>1</sup>H (400,13 MHz,  
 3 DMSO-d<sub>6</sub>) δ 2,81 (d, J= 4,83 Hz, 2H), 4,24 (t, J= 4,52 Hz, 1H), 6,65 (d,  
 4 J= 8,55 Hz, 2H), 6,96 (d, J= 8,46 Hz, 2H), 7,85 (s, 1H), 9,34 (br, 1H),  
 5 10,22 (br, 1H); RMN de <sup>13</sup>C (100,61 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 36,03 (CH<sub>2</sub>),  
 6 59,12 (CH), 115,33 (CH), 125,95 (CH), 131,15 (C), 156,55 (C-O),  
 7 157,65 (C=O), 175,77 (C=O).



8  
 9 **(R)-5-isopropil-imidazolidin-2,4-diona (2a)** . Rendimento 484 mg  
 10 (31%); sólido amarelo; pf 139–140 °C; RMN de <sup>1</sup>H (400,13 MHz,  
 11 DMSO-d<sub>6</sub>) δ 0,81 (d, J= 6,91 Hz, 3H), 0,95 (d, J= 7,02 Hz, 3H), 2,00-  
 12 2,08 (m, 1H), 4,11 (dd, J= 1,13/3,62 Hz, 1H), 10,0 (s, 1H), 11,6 (s, 1H);  
 13 RMN de <sup>13</sup>C (100,61 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 16,54 (CH<sub>3</sub>), 18,75 (CH<sub>3</sub>), 30,42  
 14 (CH), 66,21 (CH), 176,42 (C=O), 183,36 (C=S).



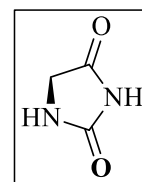
15  
 16 5.2.2 Síntese de Hidantoínas a Partir da Reação de *L*-aa com Cianato de Sódio (Adaptado de  
 17 SCHÖRGHUBER *et al.*, 2015).



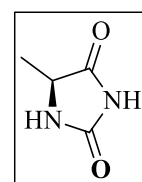
19  
 20  
 21 Em um balão de fundo redondo, uma mistura de *L*-aminoácido (5,00 mmol) e NaOCN  
 22 (6,60 mmol) em água (3,00 mL) foi aquecida a 100 °C por 3 horas sob agitação magnética  
 23 constante. Após resfriamento a 0 °C, solução aquosa de HCl 6 M (3,00 mL) foi adicionada  
 24 lentamente à mistura reacional, que foi então aquecida a 120 °C por 4 horas. As reações foram  
 25 acompanhadas por cromatografia em camada delgada, utilizando acetato de etila puro como  
 26 eluente, e revelador de permanganato de potássio. Após o consumo do material de partida, o  
 27 solvente foi reduzido por evaporação em placa quente até quase secura e o restante foi resfriado  
 28 em geladeira por 24 horas. Após este período, o precipitado formado foi filtrado, lavado com  
 29 água destilada gelada (3,00 mL), obtendo as hidantoínas interesse sem necessidade de

1 purificação. Para os compostos **1j** e **1m**, em que não houve precipitação do produto, estes foram  
 2 extraídos com acetato de etila (3 x 10 mL), a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro  
 3 e evaporada em rota-evaporador, resultando nos produtos de interesse.

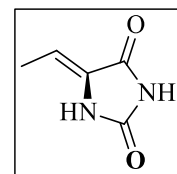
4  
 5 **Imidazolidin-2,4-diona (1h)**. Rendimento 37 mg (62%); sólido branco;  
 6 pf 221-222 °C; RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  3,85 (s, 2H), 7,72  
 7 (s, 1H), 10,7 (s, 1H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  47,69  
 8 ( $\text{CH}_2$ ), 158,88 (C=O), 174,53 (C=O).



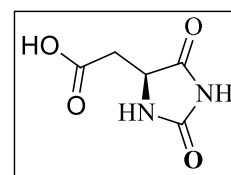
9  
 10 **5-metil-imidazolidin-2,4-diona (1i)**: Rendimento 140 mg (24%); sólido  
 11 branco; pf 167-168 °C; RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1,21 (d,  
 12  $J= 6,92$  Hz, 3H), 4,02 (ddd,  $J= 1,10/6,92$  Hz, 1H), 7,87 (s, 1H), 10,56 (s,  
 13 1H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  17,70 ( $\text{CH}_3$ ), 53,72 (CH),  
 14 157,57 (C=O), 177,28 (C=O).



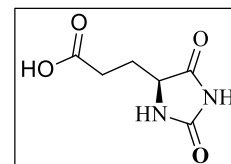
15  
 16 **(Z)-5-etilideno-imidazolidin-2,4-diona (1j)**. Rendimento 567 mg  
 17 (90%); cristal branco; pf 208–209 °C; RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz, DMSO-  
 18  $d_6$ )  $\delta$  1,13 (d,  $J= 6,53$  Hz, 3H), 3,83 (dd,  $J= 0,83/2,44$  Hz, 1H), 3,90 (ddd  
 19  $J= 2,62/6,50$ , 1H), 7,86 (s, 1H), 10,4 (s, 1H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz,  
 20 DMSO- $d_6$ )  $\delta$  20,74 ( $\text{CH}_3$ ), 64,27 (CH), 65,64 (C), 158,63 (C=O), 175,21  
 21 (C=O).



22  
 23 **2-(2,5-dioxo-imidazolidin-4-il)acetamida (1k)**. Rendimento 185 mg  
 24 (23%); sólido branco; pf 224-225 °C; RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz, DMSO-  
 25  $d_6$ )  $\delta$  2,62 (d,  $J= 5,25$  Hz, 2H), 4,20 (m, 1H), 7,85 (s, 1H), 10,6 (s, 1H),  
 26 12,5 (s, 1H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  35,88 ( $\text{CH}_2$ ), 54,79  
 27 (CH), 158,08 (C=O), 171,48 (C=O), 175,85 (C=O).



28  
 29 **3-(2,5-dioxo-imidazolidin-4-il)propanamida (1l)**. Rendimento 26 mg  
 30 (23%); sólido branco; pf 184-185 °C; RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz, DMSO-  
 31  $d_6$ )  $\delta$  1,68 (m, 1H), 1,91 (m, 1H), 2,32 (m, 1H), 4,03 (m, 1H), 8,01 (s,  
 32 1H), 10,7 (s, 1H), 12,2 (s, 1H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$   
 33 27,35 ( $\text{CH}_2$ ), 29,55 ( $\text{CH}_2$ ), 57,15 (CH), 157,81 (C=O), 174,16 (C=O),



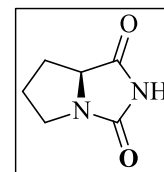
1 176,29 (C=O).

2

3

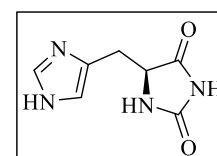
4 **Tetrahydro-1*H*-pirrol[1,2-*c*]imidazol-1,3(2*H*)-diona (1*m*).**

5 Rendimento 178 mg (25%); sólido branco; pf 153–155°C; RMN de <sup>1</sup>H  
6 (400,13 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1,60-1,69 (m, 1H), 1,90-2,08 (m, 3H), 3,01-  
7 3,07 (m, 1H), 3,43-3,49 (m, 1H), 4,09-4,13 (m, 1H), 10,7 (s, 1H); RMN  
8 de <sup>13</sup>C (100,61 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 27,13 (CH<sub>2</sub>), 27,19 (CH<sub>2</sub>), 45,39  
9 (CH<sub>2</sub>), 64,47 (CH), 161,48 (C=O), 175,91 (C=O).



10

11 **5-((1*H*-imidazol-4-il)metil)-imidazolidin-2,4-diona (1*n*).** Rendimento  
12 67,85 mg (35%); sólido amarelo; pf 224–228°C; RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz,  
13 DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2,92 (ddd, J<sub>1</sub>= 4,84-15,38, J<sub>2</sub>= 5,70-15,38 Hz, 2H), 4,44 (t,  
14 J= 5,72 Hz, 1H), 6,80 (d, J = 0,96 Hz, 1H), 7,54 (d, J = 1,12 Hz, 1H),  
15 9,93 (s, 1H), 11,56 (br, 1H); RMN de <sup>13</sup>C (100,61 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ  
16 28,93 (CH<sub>2</sub>), 61,00 (CH), 116,69 (CH), 132,64 (CH), 135,19 (C) 176,45  
17 (C=O), 184,36 (C=S).



18

19 5.3 ENSAIO DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA COM A UREASE *C. ENSIFORMIS*

20

21 5.3.1 Ensaio de Atividade Inibitória Direta

22

23 A análise da atividade inibitória direta da urease de UCE (*Canavalia ensiformis* (Jack  
24 Bean) Tipo III, CAS 9002-13-5) adquirida da Sigma Aldrich Brasil (Barueri, SP-BR), foi  
25 realizada em triplicata, utilizando metodologia colorimétrica denominada Reação do Indofenol  
26 (ou Reação de Berthlot) adaptada de Khan *et al.*, (2017). Em placa de 96 poços, a mistura  
27 reacional foi preparada através da adição de 10 µL do composto-teste a 5,00 mM, 55,0 µL de  
28 solução tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,4) suplementado com EDTA (ácido  
29 etilenodiamino tetra-acético) (1 mM), 100 µL de ureia (10 mM) e 25,0 µL de solução enzimática  
30 de urease (0,0035 mM), que foram submetidos a incubação a 45°C por 30 minutos. Após este  
31 período, 40,0 µL de reagente de fenol (1% de fenol e 0,05% de nitroprussiato de sódio) e 40,0  
32 µL de reagente alcalino (1,0% NaOH e 0,1% hipoclorito de sódio) foram adicionados a cada  
33 um dos poços e a mistura permaneceu em repouso por 15 minutos (KHAN *et al.*, 2017). A

1 absorvância final da mistura de reação, foi registrada a 630 nm, com um leitor de microplacas  
2 UV-visível marca Biotek (Winooski, VT, EUA) modelo Synergy HT.

3 A porcentagem de inibição (%I) foi determinada pela equação:  
4

$$5 \quad \%I = 100 - \left( \left( \frac{Abs \ a}{Abs \ c} \right) \times 100 \right)$$

6  
7 Onde **Abs a** é a absorbância observada para as amostras, e **Abs c** é a absorbância  
8 observada para o controle. O padrão de inibidor utilizado foi a tiourea (5,00 mM). Os poços  
9 referentes ao controle continham dimetilsulfóxido (DMSO) (10,0 µL) que foi o solvente usado  
10 para dissolver os compostos.

11

### 12 5.3.2 Ensaio da Cinética Enzimática

13

14 A mistura reacional utilizada foi a mesma que para medida de inibição direta (KHAN  
15 *et al.*, 2017). Porém utilizou-se duas concentrações do composto teste (2,00 e 1,00 mM), e cinco  
16 diferentes concentrações de substrato ureia (0,66, 1,00, 1,50, 2,00 e 2,50 mM) para cada  
17 amostra. A absorvância final da mistura de reação, foi registrada a 630 nm, com um leitor de  
18 microplacas UV-visível marca Biotek (Winooski, VT, EUA) modelo Synergy HT. As plotagens  
19 de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk foram registradas e os valores para constantes de  
20 inibição (*K<sub>i</sub>*) foram determinados usando as inclinações de cada gráfico de linha, através do  
21 software Graph-Pad (versão 8.00). A cinética foi estudada tomando-se recíproca de atividade  
22 enzimática ao longo do eixo y e recíproca da concentração de substrato ao longo do eixo x. A  
23 tendência das linhas para diferentes concentrações de inibidores (2,00 e 1,00 mM) forneceu  
24 informações sobre o mecanismo de inibição. A atividade enzimática foi calculada através de  
25 uma curva de calibração de cloreto de amônio, onde através da equação da reta, foi possível  
26 determinar os valores da atividade enzimática. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 27 5.3.2.1 Curva padrão de cloreto de amônio

28 A curva de calibração (preparada usando cloreto de amônio como fonte de amônia) foi  
29 empregada para calcular a quantidade de amônia gerada na reação (KHAN *et al.*, 2017). Assim,  
30 uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima capaz de

1 liberar 1  $\mu\text{mol}$  de amônia por minuto de reação ( $\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{mol de enzima}^{-1}$ ). O experimento para  
2 a curva de calibração foi realizado usando cloreto de amônio em diferentes concentrações,  
3 variando entre 0 e 400  $\mu\text{M}$ . A solução de cloreto de amônio foi preparada em água destilada.  
4 Em cada poço da placa de 96 poços, foram adicionados 85,0  $\mu\text{L}$  de diferentes concentrações de  
5 cloreto de amônio, depois 45,0  $\mu\text{L}$  de reagente fenol (1% de fenol e 0,05% de nitroprussiato de  
6 sódio) e 70,0  $\mu\text{L}$  de reagente alcalino (1,0% NaOH e 0,1% hipoclorito de sódio) foram  
7 adicionados a cada poço. O volume total da reação foi de 200  $\mu\text{L}$  por poço, e cada reação foi  
8 realizada em triplicata. A absorvância final da mistura de reação, foi registrada a 630 nm, com  
9 um leitor de microplacas UV-visível marca Biotek (Winooski, VT, EUA) modelo Synergy HT.

#### 11 5.4 ESTUDO DE INTERAÇÃO LIGANTE-PROTEÍNA POR STD

##### 13 5.4.1 Preparação das Amostras

15 A urease de UCE (*Canavalia ensiformis* (Jack Bean) Tipo III, CAS 9002-13-5),  
16 utilizada nos experimentos, foi adquirida da Sigma Aldrich Brasil (Barueri, SP-BR). Uma  
17 solução estoque de 0,05 mM de UCE foi preparada em um tampão fosfato em  $\text{D}_2\text{O}$  (75 mM de  
18 fosfato de sódio, 150 mM de cloreto de sódio a pH 7,50). Para todos os ligantes, foram  
19 preparadas soluções estoques 5 mM em  $\text{D}_2\text{O}$  não excedendo o valor de 1% de DMSO-*d*6 para  
20 solubilização dos compostos no volume final. As amostras para análise de RMN foram  
21 preparadas a partir destas soluções estoque.

##### 23 5.4.2 Detalhes e Configurações Gerais para os Experimentos de STD

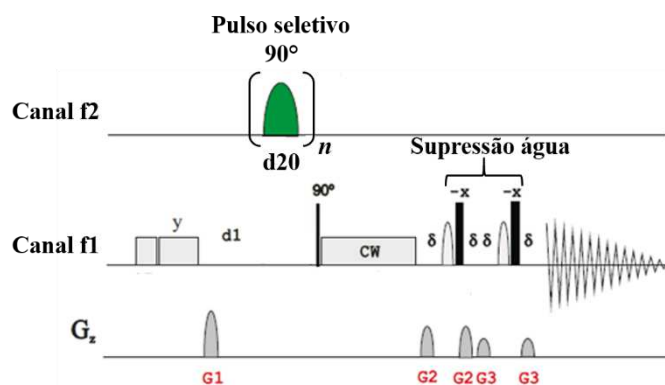
25 Os experimentos de RMN-STD foram realizados seguindo metodologia adaptada de  
26 Viegas *et al.*, (2011) e Brito (2017), realizados em espectrômetro Bruker Advance III operando  
27 em 400 MHz para  $^1\text{H}$  a 25 °C, equipado com sonda multinuclear de 5 mm (BRITO, 2017;  
28 VIEGAS *et al.*, 2011). Os espectros de STD foram obtidos utilizando parâmetros padrão da  
29 sequência de pulsos **stddiffesgp.3** fornecidos pela Bruker®. Os espectros de RMN-STD foram  
30 registrados com 64 *scans*.

31 Para cada experimento, o pulso de 90° foi calibrado separadamente. Para saturação dos  
32 núcleos de  $^1\text{H}$  da proteína (canal f2), foram utilizados pulsos seletivos gaussianos de 50 ms de  
33 largura com *n* repetições durante todo o tempo de saturação (d20) variando de 0,50 a 2,50 s,

1 enquanto o tempo de espera para aquisição (**d1**) foi de **d20** + 1. Além de um pulso duro de 90°  
 2 no canal f1, com a utilização de uma trava de *spins* (CW), com duração de 50 a 10 ms com o  
 3 intuito de suprimir os sinais da proteína. A supressão da proteína foi realizada utilizando um  
 4 filtro *spin-lock* com 20 ms. A lista de irradiação foi configurada com quatro frequências: 400  
 5 (1 ppm), 50000 (125 ppm), 400 (1 ppm) e 50000 Hz (125 ppm), no modo alternado.

6 Gradientes de campo pulsado no eixo z (Gz) são utilizados com a função de eliminar  
 7 sinais indesejados e governar a supressão do sinal de água pelo utilização de pulsos de excitação  
 8 seletiva (canal f1). Deste modo a supressão do sinal residual da água foi realizada utilizando o  
 9 método de excitação moldada governada por gradientes (do inglês: *excitation sculpting with*  
 10 *gradients*) com formato de pulsos Sinc1.1000 com 2 ms de largura, sendo o pulso previamente  
 11 calibrado antes da realização de cada experimento de STD (BRITO, 2017; LEY *et al.*, 2014;  
 12 PARELLA, 2006).

13



14

15

16 O espectro de diferença foi obtido subtraindo o espectro irradiado seletivamente pelo  
 17 espectro de referência.

18

#### 19 5.4.3 Otimização do Tempo de Saturação para Experimentos de Mapeamento de Epítomos

20

21 As amostras foram preparadas adicionando ao tubo: 200 µL da solução estoque de  
 22 UCE (0,05 mM), 100 µL de tampão e 200 µL de solução estoque (5 mM) do composto teste,  
 23 sendo assim a razão ligante-enzima ( $L_E/P$ ) = 100, no volume final. Nove experimentos foram  
 24 adquiridos variando os tempos de saturação de 0,50 a 2,50 s.

25

26

#### 1 5.4.4 Estudos Cinéticos para Determinação do $K_D$ por RMN-STD

2

3 A determinação do  $K_D$  foi realizada pela aquisição de cinco experimentos RMN-STD.  
 4 As amostras foram preparadas adicionando 200  $\mu\text{L}$  da solução estoque de UCE (0,05 mM), 100  
 5 a 260  $\mu\text{L}$  de tampão e 40,0 a 200  $\mu\text{L}$  de solução estoque (5 mM) do composto teste (dependente  
 6 da concentração de ligante variando de 0,20 a 2,00 mM). Onde as soluções resultaram a um  
 7 excesso de ligante de 10 a 100 vezes em relação a concentração da enzima (0,02 mM) que foi  
 8 mantida fixa. Os valores para o fator de amplificação foram obtidos a partir da **Equação 3**:

9

$$10 \quad A_{STD} = \frac{I_{STD}}{I_0} \times \left[ \frac{L}{P} \right] \quad (3)$$

11

12 Onde  $I_0$  é a intensidade do sinal do espectro de referência (*off-resonance*),  $I_{STD}$  é a  
 13 intensidade do sinal observada pelo efeito STD (espectro de diferença), e  $[L/P]$  é a razão  
 14 ligante-enzima.

15 A constante de dissociação ( $K_D$ ) foi obtida diretamente da titulação baseada nos  
 16 experimentos de STD, de acordo com a **Equação 4**:

17

$$18 \quad A_{STD} = \frac{\alpha_{STD}[L]}{K_D + [L]} \quad (4)$$

19

20 Onde,  $A_{STD}$  é o fator de amplificação,  $\alpha_{STD}$  é o fator de amplificação máximo  
 21 observado,  $[L]$  é a concentração do ligante. O  $\alpha_{STD}$  e o  $K_D$  foram obtidos através da equação da  
 22 reta resultante da plotagem dos gráficos de Lineweaver-Burk com a utilização do software  
 23 GraphPad (versão 8.0).

24

#### 25 5.5 PROCEDIMENTOS PARA OS ESTUDOS DE DOCAGEM MOLECULAR

26

27 A estrutura cristalográfica da urease de *Canavalia ensiformis* utilizada foi obtida no  
 28 Banco de Dados de Proteínas (<http://www.rcsb.org>, *Protein Data Bank*), disponibilizada pelo  
 29 código PDB 3LA4, com resolução de 2.05 Å. A região de interesse do sítio ativo foi definida  
 30 considerando as seguintes coordenadas x: -39,9590 y: -44,6790, z: 74,9860, centradas entre os  
 31 íons níquel. Os sítios alostéricos foram mapeados através do servidor FTMap disponível no

1 endereço eletrônico: <https://ftmap.bu.edu/>. A região de interesse do sítio alostérico seguiu as  
2 coordenadas x: -61,8344 y: -23,2354, z: 89,2500.

3 As estruturas 3D dos derivados de tioidantoínas e hidantoína (**2a**, **2b**, **2o** e **1d**) foram  
4 construídos no programa ChemDraw e então, a otimização da geometria foi realizada usando o  
5 Campo de força MM2 implementado no programa ChemBio3D (versão 12.0, PerkinElmer  
6 Informatics). A pose com melhor pontuação para a qual os resultados de encaixe foram  
7 considerados, foram selecionadas por cálculo de desvio quadrático médio (RMSD). Os valores  
8 de RMSD entre as soluções de pose foram realizadas usando Discovery Studio Visualizer  
9 (Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, versão 2017, San  
10 Diego: Dassault Systemes, 2016). As análises das interações intermoleculares e as figuras foram  
11 construídas no programa Pymol (versão 3.8).

12 A docagem molecular foi realizada utilizando o programa GOLD (Genetic  
13 Optimization for Ligand Docking, Cambridge Crystallographic Data Centre, versão 2020.1), as  
14 funções de pontuação empregadas foram GoldScore, ChemScore, ASP e ChemPLP. Os átomos  
15 de hidrogênio polares foram adicionados à proteína com base na ionização inferida pelo  
16 programa, o número de operações genéticas em cada execução e outros parâmetros foram  
17 definidos como padrão. Solventes como água e  $\beta$ -mercaptoetanol e íons fosfato foram excluídos  
18 da estrutura. Fragmentos e confôrmeros das cisteínas modificadas, e o grupo *N*-carboxila da  
19 lisina carboamilada foram corrigidos ou removidos. Os locais de ligação foram definidos em  
20 um raio de 10 Å para as análises no sítio ativo e 13 Å no sítio alostérico. Além disso, os ligantes  
21 foram submetidos a 10 execuções iterativas.

## 22 23 5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

24  
25 As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software Graph-Pad (versão  
26 8.00) – ANOVA, ou SISVAR (versão 5.70), onde os valores representam a média  $\pm$  desvio  
27 padrão de testes realizados em triplicata. Letras distintas indicam diferença significativa entre  
28 os tratamentos pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) ou Scott-Knott ( $P < 0,05$ ). A análise de correlação  
29 de Pearson foi realizada no Microsoft Office Excel (versão Professional Plus 2016), onde o  
30 coeficiente de correlação linear  $r$  podem apresentar os valores:

31  $r = 1$ , que indica uma correlação perfeita positiva entre as duas variáveis;

32  $r = -1$ , que indica uma correlação negativa perfeita entre as duas variáveis (o aumento de uma,  
33 sempre diminui a outra); e

- 1  $r = 0$ , que indica que não há dependência linear uma da outra, mas o resultado deve ser
- 2 investigado por outros meios.

## REFERÊNCIAS

ANGULO, Jesús; ENRÍQUEZ-NAVAS, Pedro M.; NIETO, Pedro M. Ligand-receptor binding affinities from saturation transfer difference (STD) NMR. **Chemistry - A European Journal**, [S. l.], v. 16, n. 26, p. 7803–7812, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/chem.200903528>

ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY, Muhammad Iqbal; ATIA-TUL-WAHAB. Chapter 6 - Nuclear Overhauser Effect. *In*: ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY, Muhammad Iqbal; ATIA-TUL-WAHAB (org.). **Solving Problems with NMR Spectroscopy (Second Edition)**. Second Edition. Boston: Academic Press, 2016. p. 227–264. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411589-7.00006-1>

AUE, W. P.; BARTHOLDI, E.; ERNST, R. R. Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. **The Journal of Chemical Physics**, [S. l.], v. 64, n. 5, p. 2229–2245, 1976. Disponível em: <https://doi.org/doi:http://dx.doi.org/10.1063/1.432450>

BALASUBRAMANIAN, Anuradha; PONNURAJ, Karthe. 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**, [S. l.], v. 400, n. 3, p. 274–283, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.05.009>

BARREIRO, Eliezer J. *et al.* Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. **Química Nova**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 300–310, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-40421997000300011>

BEIG, Bilal *et al.* Coating materials for slow release of nitrogen from urea fertilizer: a review. **Journal of Plant Nutrition**, [S. l.], v. 43, n. 10, p. 1510–1533, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1744647>

BENINI, Stefano *et al.* A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: Why urea hydrolysis costs two nickels. **Structure**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 205–216, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80026-4](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80026-4)

BRITO, TIAGO DE OLIVEIRA. **BENZOILTIOUREIAS: SÍNTESE, ATIVIDADES ANTIMICOBACTERIANA E ANTIUREOLÍTICA E ESTUDO DE INTERAÇÃO COM UREASE POR RMN**. 2017. - Universidade Estadual de Londrina, [s. l.], 2017.

BRITO, Tiago O. *et al.* Design, syntheses and evaluation of benzoylthioureas as urease inhibitors of agricultural interest. **RSC Advances**, [S. l.], v. 5, n. 55, p. 44507–44515, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c5ra07886e>

BRITO, Tiago O. *et al.* Benzoylthioureas: Design, Synthesis and Antimycobacterial Evaluation. **Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 93–103, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1573406415666181208110753>

BUCHERER, Hans Th.; LIEB, Viktor A. Über die Bildung substituierter Hydantoine aus Aldehyden und Ketonen. Synthese von Hydantoinen. **Journal für Praktische Chemie**, [S. l.], v. 141, n. 1–2, p. 5–43, 1934. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/prac.19341410102>

CABEZAS, W. A. R. Lara; KORNDORFER, G. H.; MOTTA, S. A. Volatilização de N-NH<sub>3</sub> na cultura de milho:: II. avaliação de fontes sólidas e fluidas em sistema de plantio direto e convencional. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 489–496, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-06831997000300019>

CANTARELLA, Heitor *et al.* Ammonia volatilisation from urease inhibitor-treated urea applied to sugarcane trash blankets. **Scientia Agricola**, [S. l.], v. 65, n. 4, p. 397–401, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162008000400011>

CARLINI, Celia R.; GUIMARÃES, Jorge A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. **Toxicon**, [S. l.], v. 19, n. 5, p. 667–675, 1981. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(81\)90104-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(81)90104-5)

CARVALHO, PRISCILA GOES CAMARGO DE. **SÍNTESE DE TIOIDANTOÍNAS, ESTUDO DE SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS E INTERAÇÕES COM SÍNTESE DE TIOIDANTOÍNAS, ESTUDO DE SUAS**. 2017. - Universidade Estadual de Londrina, [s. l.], 2017.

CHO, Seo Hyun; KIM, Seok Ho; SHIN, Dongyun. Recent applications of hydantoin and

thiohydantoin in medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 164, p. 517–545, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.12.066>

COELHO, Helena *et al.* The Quest for Anticancer Vaccines: Deciphering the Fine-Epitope Specificity of Cancer-Related Monoclonal Antibodies by Combining Microarray Screening and Saturation Transfer Difference NMR. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 137, n. 39, p. 12438–12441, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jacs.5b06787>

COPELAND, Robert A. Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists. **Methods of biochemical analysis**, United States, v. 46, p. 1–265, 2005.

CORSINI, Janaina de Fátima. **Bioinformática Estrutural Aplicada a Busca por Novos Compostos Contra os Alvos Moleculares p53- Y220C, MDM2, BIRC7, em Câncer**. 2020. - Universidade Federal de Alfenas, [s. l.], 2020.

DE CARVALHO, Priscila Goes Camargo *et al.* Synthesis and Antimicrobial Activity of Thiohydantoins Obtained from L-Amino Acids. **Letters in Drug Design & Discovery**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 94–102, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1570180816666181212153011>

DE MAGALHÃES, Camila Silva; BARBOSA, Hélio J. C.; DARDENNE, Laurent E. A genetic algorithm for the ligand-protein docking problem. **Genetics and Molecular Biology**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 605–610, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1415-47572004000400022>

DE OLIVEIRA, Silvânia Maria *et al.* Estrutura, reatividade e propriedades biológicas de hidantoínas. **Química Nova**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 614–622, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-40422008000300029>

DECLAS, Nina; LE VAILLANT, Franck; WASER, Jerome. Revisiting the Urech Synthesis of Hydantoins: Direct Access to Enantiopure 1,5-Substituted Hydantoins Using Cyanobenziodoxolone. **Organic Letters**, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 524–528, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b03843>

DEEPA, B.; BALASUBRAMANIAN, N.; NAGARAJA, K. S. Spectrophotometric

Determination of Cyanide Based on Berthelot Reaction. **Analytical Letters**, [S. l.], v. 36, n. 13, p. 2865–2874, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1081/AL-120025261>

DIXON, Nicholas E. *et al.* Jack Bean Urease (EC 3.5.1.5). A Metalloenzyme. A Simple Biological Role for Nickel? **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 97, n. 14, p. 4131–4133, 1975. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja00847a045>

DOMÍNGUEZ, María J. *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of phosphoramidate derivatives as urease inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 56, n. 10, p. 3721–3731, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf072901y>

FARIAS, Patrícia Pereira. **Modelagem Comparativa, Docagem Molecular e Relação Estrutura-Atividade de Derivados Nitroimidazólicos como Potenciais Inibidores da Enzima Nitrorredutase de Trypanosoma cruzi**. 2017. - Universidade Federal Fluminense, [s. l.], 2017.

FEARON, William Robert. Urease. Part I. The Chemical Changes Involved in the Zymolysis of Urea. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 84–93, 1923. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bj0170084>

FIGUEIREDO, Isis Martins; MARSAIOLI, Anita Jocelyne. Mapeamento das interações proteína-ligante através de técnicas de RMN de<sup>1</sup>H utilizando detecção do ligante. **Química Nova**, [S. l.], v. 30, n. 7, p. 1597–1605, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-40422007000700019>

FOLLMER, C. *et al.* Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): Biological effects of urease independent of its ureolytic activity. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 360, n. 1, p. 217–224, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3600217>

FOLLMER, C. Ureasas as a target for the treatment of gastric and urinary infections. **Journal of Clinical Pathology**, [S. l.], v. 63, n. 5, p. 424–430, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/jcp.2009.072595>

FONT, G. María *et al.* Structural characteristics of phosphoramidate derivatives as urease

inhibitors. requirements for activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 56, n. 18, p. 8451–8460, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf801786d>

FRIEBOLIN, Horst. **Basic one- and two-dimensional NMR spectroscopy**. Weinheim: WILEY-VCH, 2005. *E-book*.

GOSSERT, Alvar D.; JAHNKE, Wolfgang. NMR in drug discovery: A practical guide to identification and validation of ligands interacting with biological macromolecules. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, [S. l.], v. 97, p. 82–125, 2016. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2016.09.001>

GUIDO, Rafael V. C.; ANDRICOPULO, Adriano D. Modelagem Molecular de Fármacos. **Revista Processos Químicos**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 24–36, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.19142/rpq.v2i4.66>

HA, Nam Chul *et al.* Supramolecular assembly and acid resistance of Helicobacter pylori urease. **Nature Structural Biology**, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 505–509, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/88563>

HABENSCHUS, Máisa Daniela. Estudos de inibição das enzimas do citocromo P450 pelo produto natural (–)-grandisina utilizando microsomas hepáticos de humanos. [S. l.], p. 104, 2016. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-06072016-095943/>

HALGREN, Thomas A. *et al.* Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 47, n. 7, p. 1750–1759, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm030644s>

HANIF, Muhammad *et al.* Synthesis, Urease Inhibition, Antioxidant, Antibacterial, and Molecular Docking Studies of 1,3,4-Oxadiazole Derivatives. **ISRN Pharmacology**, [S. l.], v. 2012, p. 1–9, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.5402/2012/928901>

HANIF, Muhammad *et al.* Symmetrical heterocyclic cage skeleton: Synthesis, urease inhibition activity, kinetic mechanistic insight, and molecular docking analyses. **Molecules**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 1–13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules24020312>

HESSELINK, Keppel JM. Phenytoin: Repurposing an Old Molecule and Patent Strategies for Neuropathic Pain. **Journal of Inviting Innovations Clinical Trials & Patenting**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 1–3, 2018.

HOLTMANN, G. *et al.* A randomized, double-blind, comparative study of standard-dose rabeprazole and high-dose omeprazole in gastro-oesophageal reflux disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 479–485, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2002.01207.x>

HUANG, Zhixian; OUGH, Cornelius S. Determination of amino acid hydantoin by HPLC with diode array detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry®**, [S. l.], v. 39, n. 12, p. 2206–2213, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf00012a023>

ICHITANI, Masaki *et al.* Crystal structures of racemic and enantiomeric 5-isopropyl-5-methylhydantoin. **European Journal of Chemistry**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 6–10, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5155/eurjchem.1.2.115>

JABRI, Evelyn *et al.* The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. **Science**, [S. l.], v. 268, n. 5213, p. 998–1004, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.7754395>

JONES, Gareth *et al.* Development and Validation of a Genetic Algorithm for. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 267, p. 727–748, 1997.

JUNEJO, Nasima *et al.* Role of inhibitors and biodegradable material in mitigation of nitrogen losses from fertilized lands. **African Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 10, n. 18, p. 3504–3514, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.5897/AJBx10.046>

KAPPAUN, Karine *et al.* Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – A review. **Journal of Advanced Research**, [S. l.], v. 13, p. 3–17, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.05.010>

KAY, Herbert Davenport. The Reversibility of the Action of Urease of Soy Bean. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 277–285, 1923. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bj0170277>

KEMPER, Sebastian *et al.* Group epitope mapping considering relaxation of the ligand (GEM-CRL): Including longitudinal relaxation rates in the analysis of saturation transfer difference (STD) experiments. **Journal of Magnetic Resonance**, [S. l.], v. 203, n. 1, p. 1–10, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2009.11.015>

KHAN, Jalaluddin A. *et al.* Studies on new urease inhibitors by using biochemical, STD-NMR spectroscopy, and molecular docking methods. **Medicinal Chemistry Research**, [S. l.], v. 26, n. 10, p. 2452–2467, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00044-017-1945-3>

KHAN, Khalid Mohammed *et al.* Molecular modeling-based antioxidant arylidene barbiturates as urease inhibitors. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, [S. l.], v. 30, p. 153–156, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmngm.2011.07.001>

KHAN, Khalid Mohammed *et al.* Synthesis and in vitro urease inhibitory activity of N,N'-disubstituted thioureas. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 74, p. 314–323, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.01.001>

KISTIAKOWSKY, G. B.; SHAW, W. H. R. On the Mechanism of the Inhibition of Urease. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 75, n. 4, p. 866–871, 1953. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja01100a030>

KONNERT, Laure *et al.* Recent Advances in the Synthesis of Hydantoins: The State of the Art of a Valuable Scaffold. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 117, n. 23, p. 13757–13809, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00067>

KONRATH, Eduardo L.; PIEDADE, Maristela; EIFLER-LIMA, Vera Lucia. Síntese da fenitoína assistida por micro-ondas: Proposta de aula prática para alunos de graduação. **Química Nova**, [S. l.], v. 35, n. 9, p. 1887–1890, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000900033>

KOZAKOV, Dima *et al.* FTmap family. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 733–755, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.043>.The

KRAJEWSKA, Barbara. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S. l.], v. 59, n. 1–3, p. 9–21, 2009. Disponível

em: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.01.003>

KUMAR, Sandeep; KAYASTHA, Arvind M. Acetohydroxamic Acid-A Competitive Inhibitor of Urease from Soybean “Glycine max”. **Journal of Proteins and Proteomics**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 3–8, 2010.

KUNTZ, Irwin D. *et al.* A Geometric Approach to Macromolecule-Ligand Interactions. [S. l.], 1982.

LANNA, Anna Cristina *et al.* Atividade de urease no solo com feijoeiro influenciada pela cobertura vegetal e sistemas de plantio. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, [S. l.], v. 34, n. 6, p. 1933–1939, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-06832010000600018>

LEY, Nathan B. *et al.* Optimising selective excitation pulses to maximise saturation transfer difference NMR spectroscopy. **RSC Advances**, [S. l.], v. 4, n. 14, p. 7347–7351, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c3ra46246c>

LIPPARD, Stephen J. At Last-the Crystal Structure of. [S. l.], v. 268, n. May, 1995.

MACIEL, THAMILLA MARIA SILVA. **BIOFÍSICA DA INTERAÇÃO ENTRE UREASE COM METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE LÍQUENS E DA ALBUMINA DO SORO HUMANO COM COCAÍNA E COCAETILENO**. 2019. - Universidade Federal de Alagoas, [s. l.], 2019.

MANEJO, U. S. O. E. *et al.* Solo De Cerrado Sob Diferentes Sistemas De. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 147–157, 2009.

MARION, Dominique. An introduction to biological NMR spectroscopy. **Molecular and Cellular Proteomics**, [S. l.], v. 12, n. 11, p. 3006–3025, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/mcp.O113.030239>

MARONEY, Michael J.; CIURLI, Stefano. Nonredox nickel enzymes. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 114, n. 8, p. 4206–4228, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cr4004488>

MAYER, M.; MEYER, B. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to

identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 123, n. 25, p. 6108–6117, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja0100120>

MÉGRAUD, Francis. The challenge of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: The comeback of bismuth-based quadruple therapy. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 103–109, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1756283X11432492>

MIOT, Hélio Amante. Correlation analysis in clinical and experimental studies. **Jornal Vascular Brasileiro**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 275–279, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1677-5449.174118>

MOBLEY, H. L. T.; ISLAND, M. D.; HAUSINGER, R. P. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiological Reviews**, [S. l.], v. 59, n. 3, p. 451–480, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/membr.59.3.451-480.1995>

MORRIS, Garrett M. *et al.* Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, [S. l.], v. 19, n. 14, p. 1639–1662, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B)

MORRIS, Garrett M. *et al.* Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, [S. l.], v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>

MUNIZ, Heloisa dos santos. Métodos híbridos em docagem molecular: implementação, validação e aplicação. **Universidade De São Paulo**, [S. l.], n. Tese, p. 107, 2018.

NAGAHARA, Akihito *et al.* Addition of metronidazole to rabeprazole-amoxicillin-clarithromycin regimen for *Helicobacter pylori* infection provides an excellent cure rate with five-day therapy. **Helicobacter**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 88–93, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1523-5378.2000.00013.x>

NEUHAUS, David. Nuclear Overhauser Effect. **Encyclopedia of Magnetic Resonance**, [S. l.], p. 1–16, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9780470034590.emrstm0350.pub2>

NORDLANDER, Ebbe; CARLSSON, Hkan. Computational modeling of the mechanism of urease. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, [S. l.], v. 2010, n. February, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2010/364891>

OLIVEIRA, Katharina Carla Santos de. Desenvolvimento de um biosensor potenciométrico, à base de soja, para determinação da ureia. [S. l.], p. 1–74, 2008.

PARELLA, Teodor. Pulse Program Catalogue : Experiments. **Pulse Program Catalogue**, [S. l.], p. 1–249, 2006.

PAULA, Ana *et al.* Efeitos Em Longo Prazo De Inibidores Da Bomba De Prótons Pulmonary Sequestration-Literature Review. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research-BJSCR**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 45–49, 2013.

PELLECCHIA, Maurizio; SEM, Daniel S.; WÜTHRICH, Kurt. NMR in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 211–219, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd748>

PEREIRA ARAUJO, Débora *et al.* Efficient sodium bisulfite-catalyzed synthesis of benzothiazoles and their potential as ureases inhibitors. **RSC Adv.**, [S. l.], v. 5, n. 36, p. 28814–28821, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C5RA01081K>

PICCIRILLO, Erika; DO AMARAL, Antonia Tavares. Virtual screening of bioactive compounds: Concepts and applications. **Quimica Nova**, [S. l.], v. 41, n. 6, p. 662–677, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170210>

POLACCO, Joseph C.; HOLLAND, Mark A. Roles of Urease in Plant Cells. **International Review of Cytology**, [S. l.], v. 145, n. C, p. 65–103, 1993. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60425-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60425-8)

RAREY, Matthias *et al.* A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 261, n. 3, p. 470–489, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0477>

RAUF, A. *et al.* Synthesis and urease inhibition studies of barbituric and thiobarbituric acid

derived sulphonamides. **Journal of the Chinese Chemical Society**, [S. l.], v. 58, n. 4, p. 528–537, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jccs.201190017>

RAUF, Abdul *et al.* Synthesis, characterization, and urease inhibition of 5-substituted-8-methyl-2H-pyrido[1,2-a]pyrimidine-2,4(3H)-diones. **Medicinal Chemistry Research**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 60–74, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00044-010-9491-2>

REGO, Yuri F. *et al.* A review on the development of urease inhibitors as antimicrobial agents against pathogenic bacteria. **Journal of Advanced Research**, [S. l.], v. 13, p. 69–100, 2018 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.05.003>

REGO, Yuri F. *et al.* A review on the development of urease inhibitors as antimicrobial agents against pathogenic bacteria. **Journal of Advanced Research**, [S. l.], v. 13, p. 69–100, 2018 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.05.003>

REIS, Esther Camilo dos. **DOCKING E ANÁLISE DO MODO DE LIGAÇÃO DE TRÊS MOLÉCULAS PEQUENAS, UM BENZIMIDAZOL E DOIS COMPOSTOS DE CRÔMIO, NOS SULCOS DO DNA 5'-CGCGAATTCGCG-3'**. 2008. - Universidade Estadual Paulo Julio de Mesquita Filho, [s. l.], 2008.

REYES, Samuel; BURGESS, Kevin. On formation of thiohydantoins from amino acids under acylation conditions. **Journal of Organic Chemistry**, [S. l.], v. 71, n. 6, p. 2507–2509, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jo052576i>

RIDDLES, Peter W. *et al.* Cloning and sequencing of a jack bean urease-encoding cDNA. **Gene**, [S. l.], v. 108, n. 2, p. 265–267, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90443-F](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90443-F)

RODRIGUES, R. P. *et al.* Virtual screening strategies in drug design. **Revista Virtual de Química**, [S. l.], v. 4, n. 6, p. 739–776, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20120055>

SANT'ANNA, Carlos Mauricio R. Molecular modeling methods in the study and design of bioactive compounds: An introduction. **Revista Virtual de Química**, [S. l.], v. 1, n. 1, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20090007>

SCHOBER, Patrick; SCHWARTE, Lothar A. Correlation coefficients: Appropriate use and interpretation. **Anesthesia and Analgesia**, [S. l.], v. 126, n. 5, p. 1763–1768, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002864>

SCHÖRGHUBER, Julia *et al.* Novel approaches in selective tryptophan isotope labeling by using *Escherichia coli* overexpression media. **ChemBioChem**, [S. l.], v. 16, n. 5, p. 746–751, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cbic.201402677>

SEARCY, R. L. *et al.* A STUDY OF THE SPECIFICITY OF THE BERTHELOT COLOUR REACTION. **Clinica Chimica Acta**, [S. l.], v. 12, p. 170–175, 1965.

SOUSA, Thiago Celeira de; ALMEIDA, Ursula Tatiane de F. H.; BASTOS, Dauana Arruda de Oliveira. H. pylori: Implicações atuais e a resistência à terapia antimicrobiana revisão de literatura. **Pará Research Medical Journal**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 1–7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.4322/prmj.2017.028>

SPITZER, Russell; JAIN, Ajay N. Surflex-Dock: Docking benchmarks and real-world application. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, [S. l.], v. 26, n. 6, p. 687–699, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10822-011-9533-y>

SUMNER, James B. Enzyme Urease. **J. Biol. Chem.**, [S. l.], v. 69, p. 435–441, 1926.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, [S. l.], v. 31, n. 2, p. NA-NA, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>

URECH, Friedrich. XXI. Ueber Lacturaminsäure und Lactylharnstoff. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, [S. l.], v. 165, n. 1, p. 99–103, 1873. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jlac.18731650110>

VIEGAS, Aldino *et al.* Saturation-transfer difference (STD) NMR: A simple and fast method for ligand screening and characterization of protein binding. **Journal of Chemical Education**, [S. l.], v. 88, n. 7, p. 990–994, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ed101169t>

WANG, Zerong. Urech Hydantoin Synthesis. *In: Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*. [S. l.: s. n.]. p. 2856–2859. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9780470638859.conrr639>

WANG, Zerong Daniel; SHEIKH, Samia O.; ZHANG, Yulu. A simple synthesis of 2-thiohydantoins. *Molecules*, [S. l.], v. 11, n. 10, p. 739–750, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/11100739>

WARE, Elinor. The Chemistry of the Hydantoins. *Chemical Reviews*, [S. l.], v. 2, p. 404–456, 1950. Disponível em: <https://doi.org/10.5059/yukigoseikyokaishi.17.468>

WEATHERBURN, M. W. Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia. *Analytical Chemistry*, [S. l.], v. 39, n. 8, p. 971–974, 1967. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac60252a045>

WHITEHURST, Garnett B.; WHITEHURST, Brooks M. ( 12 ) **United States Patent**. Concessão: 2014.

WILLIAMSON, Mike P. **Chapter 3 Applications of the NOE in Molecular Biology**. 1. ed. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2009. v. 65*E-book*. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0066-4103\(08\)00203-2](https://doi.org/10.1016/S0066-4103(08)00203-2)

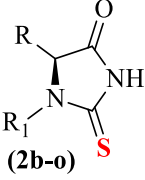
WOLF, Antje; ZIMMERMANN, Marc; HOFMANN-APITIUS, Martin. Alternative to consensus scoring - A new approach toward the qualitative combination of docking algorithms. *Journal of Chemical Information and Modeling*, [S. l.], v. 47, n. 3, p. 1036–1044, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ci6004965>

YAMADA, Tsuioshi; ABDALLA, Silvia Regina Stipp. Informações recentes para otimização da produção agrícola. *Informações Agrônomicas*, [S. l.], v. 03, n. 117, p. 28, 2007.

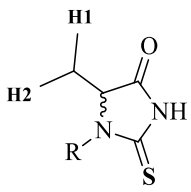
**APÊNDICES**

## APÊNDICE A

**Tabela A1.** Rendimentos para a síntese de tioidantoínas **2b-o** derivadas de aminoácidos, sintetizadas em trabalho anterior (CARVALHO, 2017).

	Entrada	Aminoácido	R	R <sub>1</sub>	Tioidantoína	Rendimento (%)
 ( <b>2b-o</b> )	1	<i>L</i> -val	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH	H	<b>2b</b>	62
	2	<i>L</i> -leu	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub>	H	<b>2c</b>	85
	3	<i>L</i> -met	CH <sub>3</sub> S(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	H	<b>2d</b>	72
	4	<i>L</i> -fen	Bz-CH <sub>2</sub>	H	<b>2e</b>	71
	5	<i>L</i> -tir	<i>p</i> -OH-Bz-CH <sub>2</sub>	H	<b>2f</b>	63
	6	<i>L</i> -trp	3-indol-CH <sub>2</sub>	H	<b>2g</b>	33
	7	Gli	H	H	<b>2h</b>	52
	8	<i>L</i> -ala	CH <sub>3</sub>	H	<b>2i</b>	92
	9	<i>L</i> -tre	CH <sub>3</sub> CH	H	<b>2j</b>	56
	10	<i>L</i> -asx	COOHCH <sub>2</sub>	H	<b>2k</b>	27
	11	<i>L</i> -glu	COOH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	H	<b>2l</b>	80
	12	<i>L</i> -pro	Pirrolidina	H	<b>2m</b>	37
	13	<i>L</i> -his	Imidazol-CH <sub>2</sub>	H	<b>2n</b>	35
	14	<i>L</i> -val	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH	COCH <sub>3</sub>	<b>2o</b>	42

**Tabela A2.** Valores de A<sub>STD</sub> para todos os prótons que apresentaram efeito STD, nos experimentos com diferentes concentrações (0,20 a 2,00 mM) dos compostos **2a**, **2b** e **2o** avaliados.

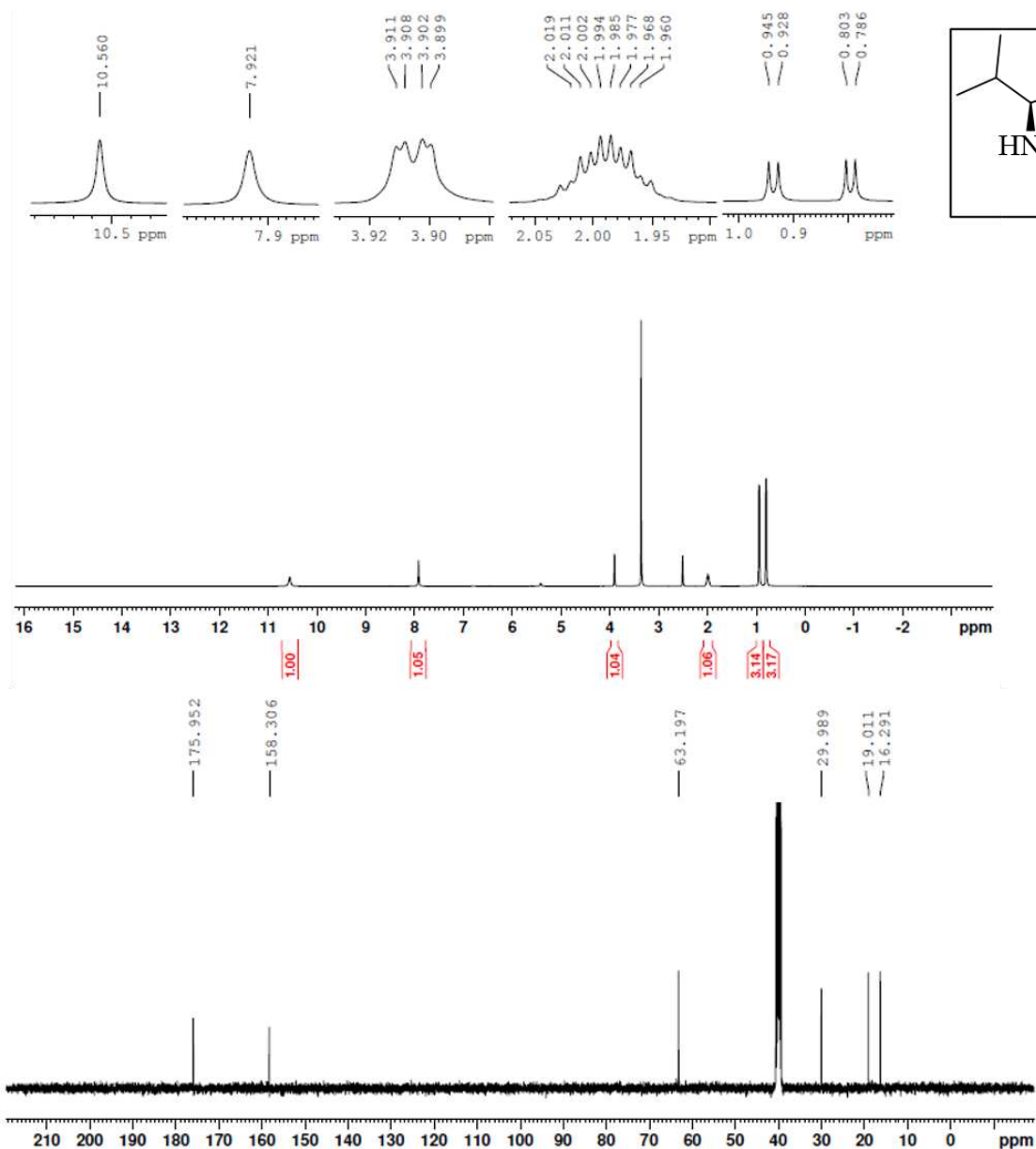
 R= H ( <b>2a</b> , <b>2b</b> ) R= COCH <sub>3</sub> ( <b>2o</b> )	A <sub>STD</sub>						
	<b>2a</b>		<b>2b</b>		<b>2o</b>		
[Ligante]	H1	H2	H1	H2	H1	H2	H3*
<b>0,20</b>	-	-	0,20	0,18	-	-	-
<b>0,40</b>	0,44	0,42	0,32	0,28	0,69	0,66	0,18
<b>0,80</b>	0,71	0,65	0,56	0,52	1,19	1,07	0,31
<b>1,00</b>	1,00	0,84	0,70	0,64	1,26	1,15	0,37
<b>1,40</b>	1,18	1,09	1,03	0,98	1,48	1,44	0,43
<b>2,00</b>	2,41	2,23	-	-	2,52	2,32	0,72

\*Hidrogênios metílicos do grupo acetil (COCH<sub>3</sub>).

## APÊNDICE B

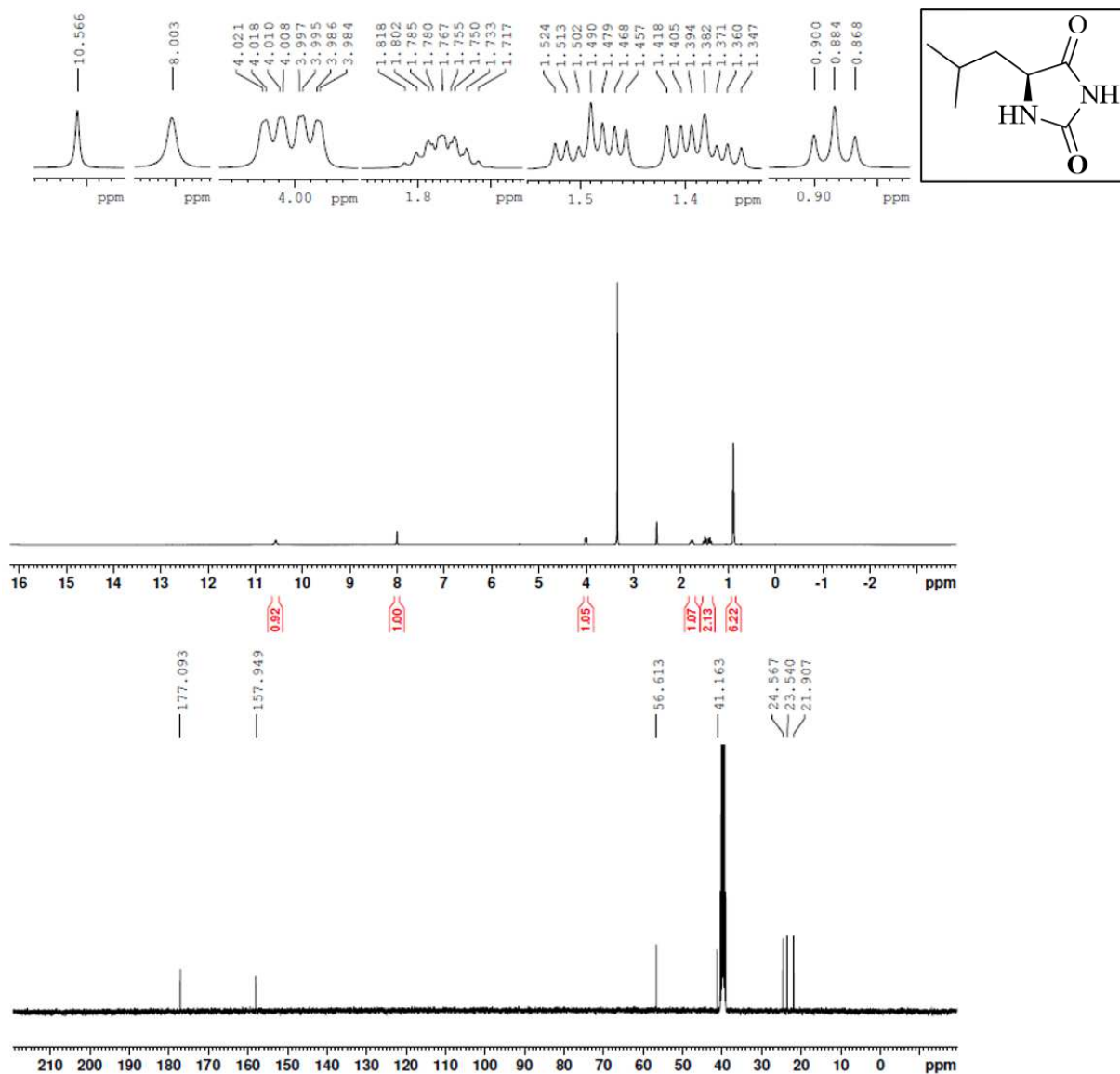
Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para os compostos sintetizados.

**Figura A1.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz) para **1b** em DMSO- $d_6$ .



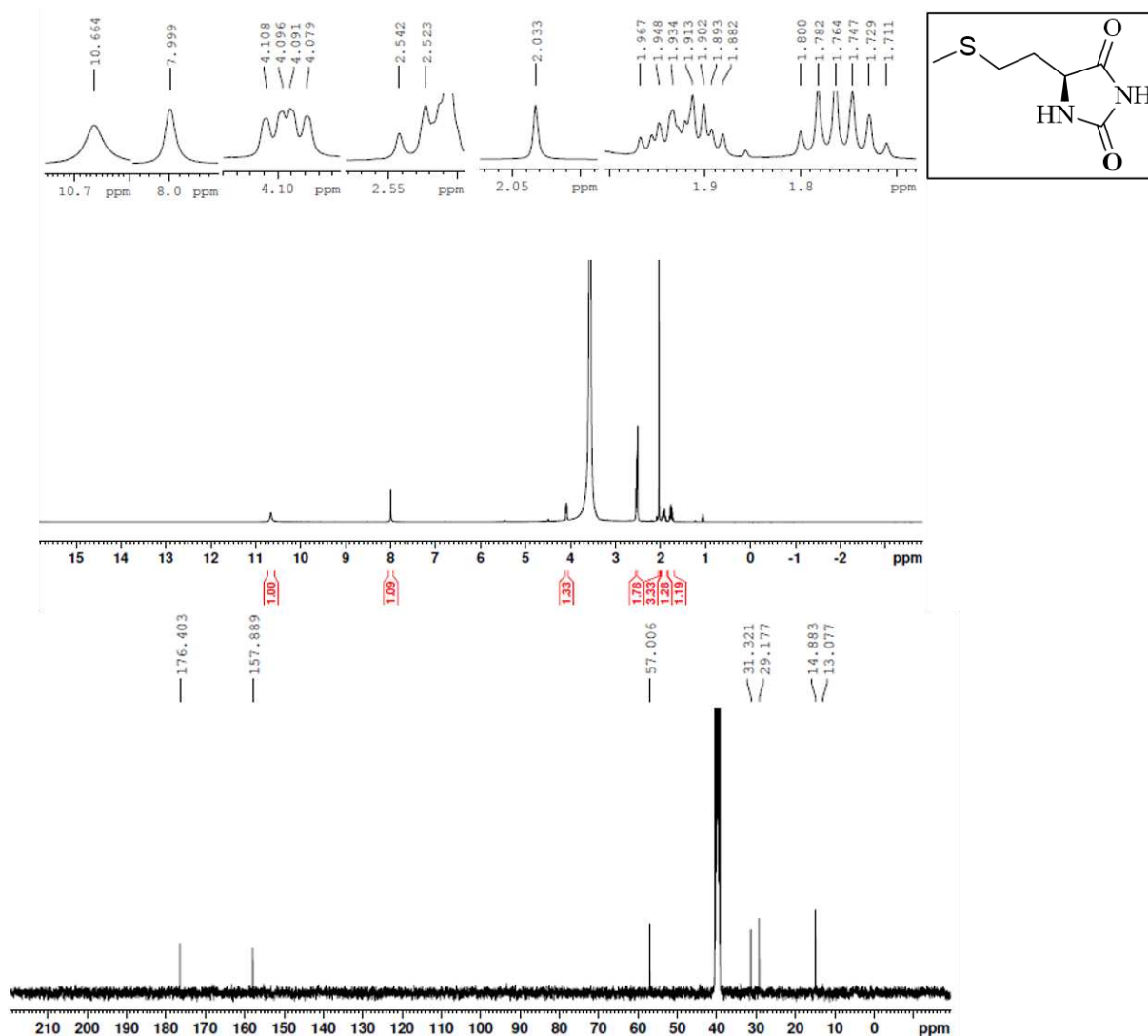
**(S)-5-isopropil-imidazolidin-2,4-diona (1b)** . Rendimento 1,20 g (39%); sólido amarelo; pf 145-146 °C; RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10,6 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), 3,90 (dd,  $J_1=1,14$  Hz,  $J_2=3,43$  Hz, 1H), 1,95-2,02 (m, 1H), 0,94 (d,  $J=6,96$  Hz, 3H), 0,79 (d,  $J=6,79$  Hz, 3H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  175,9 (C=O), 158,3 (C=O), 63,20 (CH), 29,99 (CH), 19,01 (CH $_3$ ), 16,29 (CH $_3$ ).

**Figura A2.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz) para **1c** em DMSO- $d_6$ .



**5-isobutil-imidazolidin-2,4-diona (1c).** Rendimento 2,25 g (72%); sólido amarelo; pf 215–216 °C; RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11,69 (s, 1H), 10,08 (br, 1H), 4,00 (ddd,  $J_1 = 0,86$  Hz,  $J_2 = 4,37$  Hz,  $J_3 = 9,41$  Hz, 1H), 1,72–1,82 (m, 1H), 1,35–1,52 (m, 2H), 0,88 (t,  $J = 6,60$  Hz, 6H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  177,09 (C=O), 157,95 (C=O), 56,61 (CH), 41,16 (CH), 24,57 (CH<sub>2</sub>), 23,54 (CH<sub>3</sub>), 21,91 (CH<sub>3</sub>).

**Figura A3.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz) para **1d** em DMSO- $d_6$ .



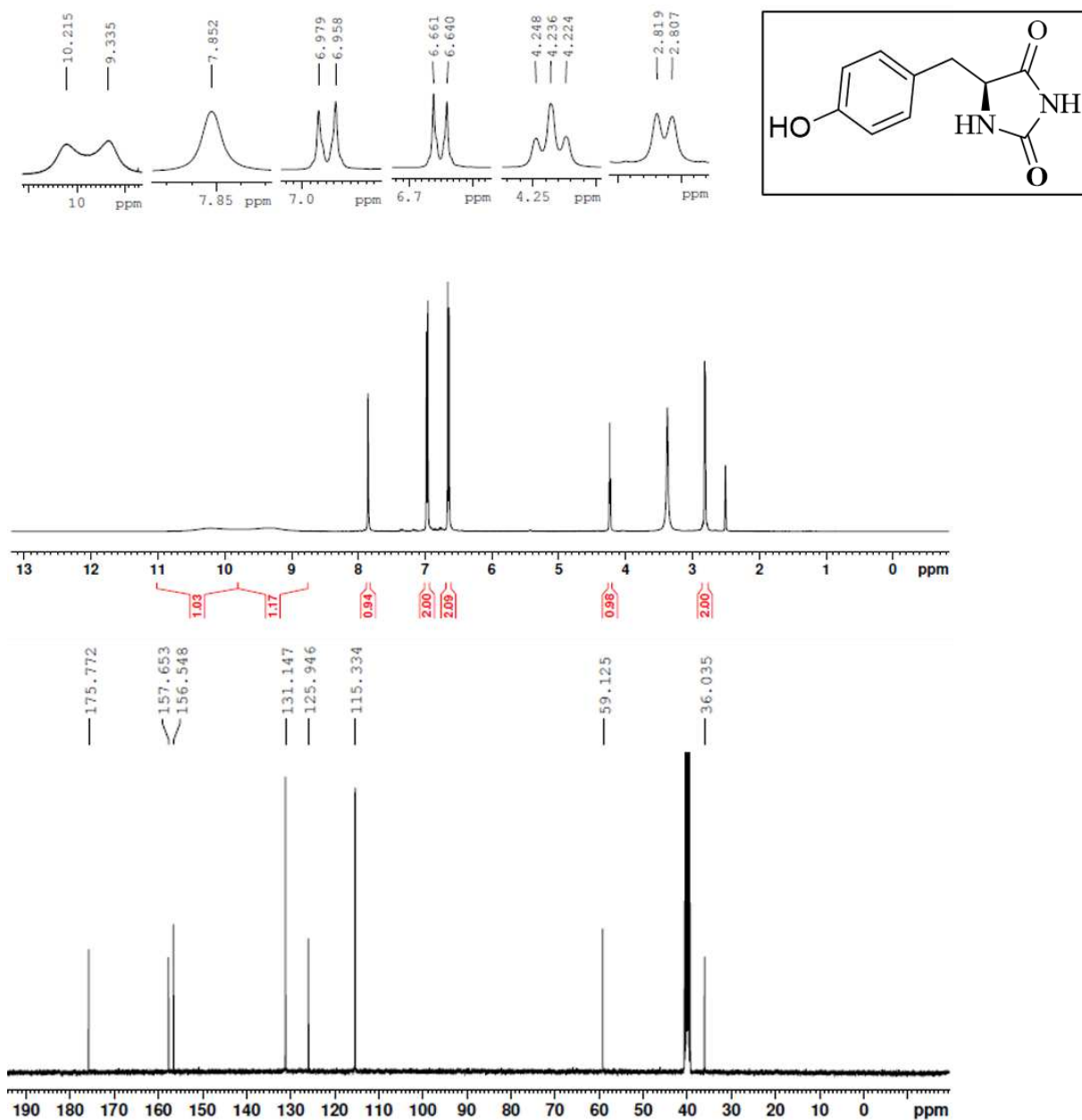
**5-(2-(metiltio)etil)-imidazolidin-2,4-diona (1d).** Rendimento 1,72 g (49%); sólido amarelo; pf 104-105 °C; RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10,6 (s, 1H), 8,00 (s, 1H), 4,09 (m, 1H), 2,50-2,54 (m, 2H), 2,03 (s, 3H), 1,88-1,97 (m, 1H), 1,71-1,80 (m, 1H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  176,40 (C=O), 157,89 (C=O), 57,01 (CH), 31,32 (CH $_2$ ), 14,88 (CH $_3$ ), 29,18 (CH $_2$ ).

**Figura A4.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz) para **1e** em  $\text{DMSO-d}_6$ .



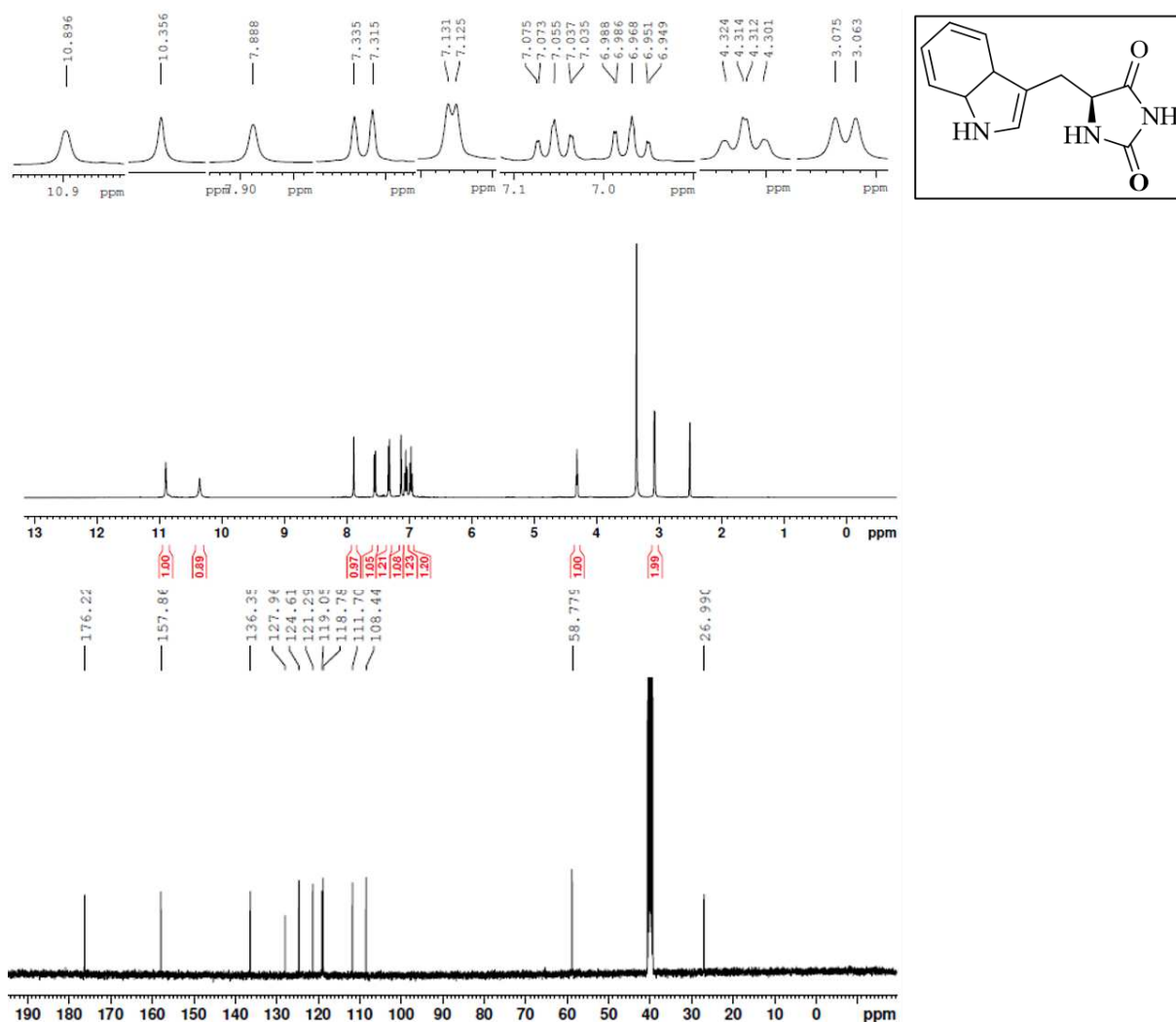
**5-benzil-imidazolidin-2,4-diona (1e).** Rendimento 3,12 g (82%); sólido amarelo; pf 183-185 °C; RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  10,4 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), 7,16-7,29 (m, 5H), 4,33 (t, J = 4,59 Hz, 1H), 2,93 (d, J = 4,87 Hz, 2H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  175,75 (C=O), 157,61 (C=O), 135,93 (C), 130,20 (CH), 128,56 (CH), 127,17 (CH), 58,86 (CH), 36,71 (CH<sub>2</sub>).

**Figura A5.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz) para **1f** em DMSO- $d_6$ .



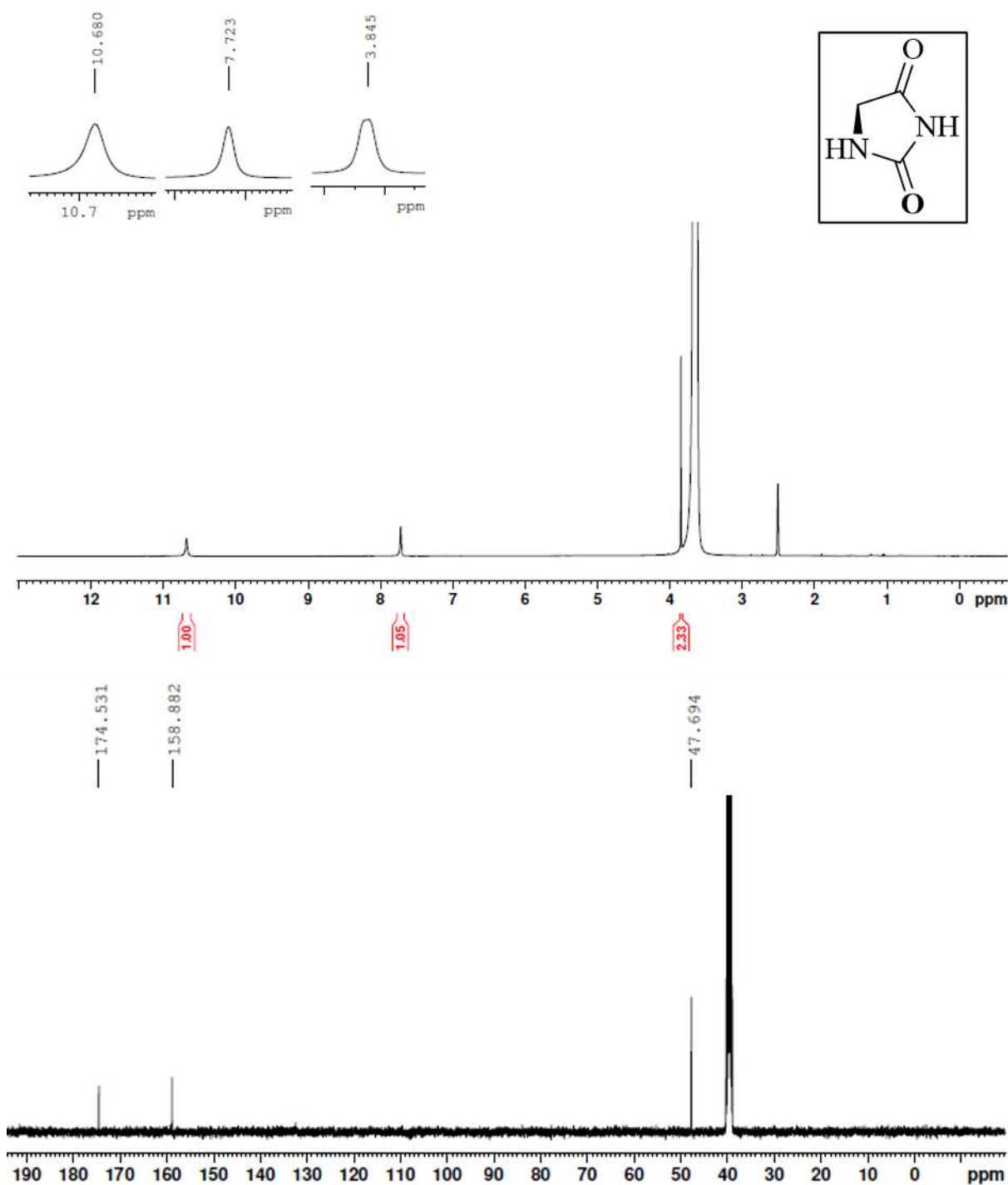
**5-(4-hidroxibenzil)-imidazolidin-2,4-diona (1f).** Rendimento 3,71 g (90%); sólido amarelo; pf 258-259 °C; RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10,22 (br, 1H), 9,34 (br, 1H), 7,85 (s, 1H), 6,96 (d,  $J$ = 8,46 Hz, 2H), 6,65 (d,  $J$ = 8,55 Hz, 2H), 4,24 (t,  $J$ = 4,52 Hz, 1H), 2,81 (d,  $J$ = 4,83 Hz, 2H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  175,77 (C=O), 157,65 (C=O), 156,55 (C-O), 131,15 (C), 125,95 (CH), 115,33 (CH), 59,12 (CH), 36,03 (CH $_2$ ).

**Figura A6.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz) para **1g** em  $\text{DMSO-d}_6$ .



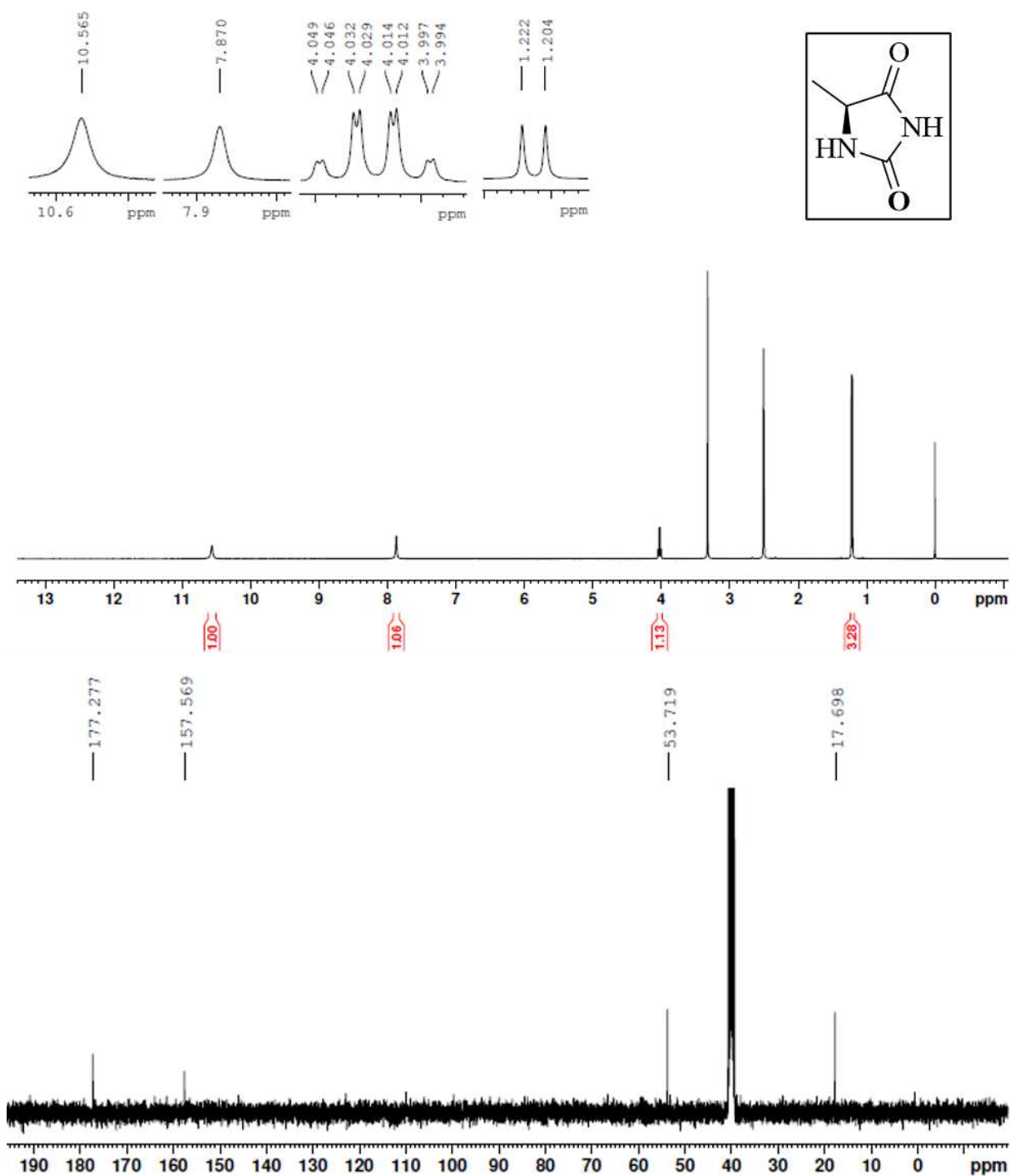
**5-((1H-indol-3-yl)methyl)-imidazolidin-2,4-diona (1g).** Rendimento 3,71 g (81%); sólido amarelo; pf 209-210 °C; RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  10,9 (s, 1 H), 10,4 (s, 1H), 7,89 (s, 1H), 7,55 (d,  $J=7,87$  Hz, 1H), 7,32 (d,  $J=8,03$  Hz, 1H), 7,13 (d,  $J=2,25$  Hz, 1H), 7,06 (m, 1H), 7,31-7,33 (m, 1H), 7,11 (d,  $J=2,37$  Hz, 1H), 7,04-7,08 (m, 1H), 6,97 (m, 1H), 6,95-7,00 (m, 1H), 4,30-4,32 (m, 1H), 3,07 (d,  $J=4,89$ , 2H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  176,23 (C=O), 157,87 (C=O), 136,36 (C), 127,97 (C), 124,61 (C), 121,30 (CH), 119,06 (CH), 118,79 (CH), 111,71 (CH), 108,44 (CH), 58,78 (CH), 26,99 ( $\text{CH}_2$ ).

**Figura A7.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz) para **1h** em DMSO- $d_6$ .



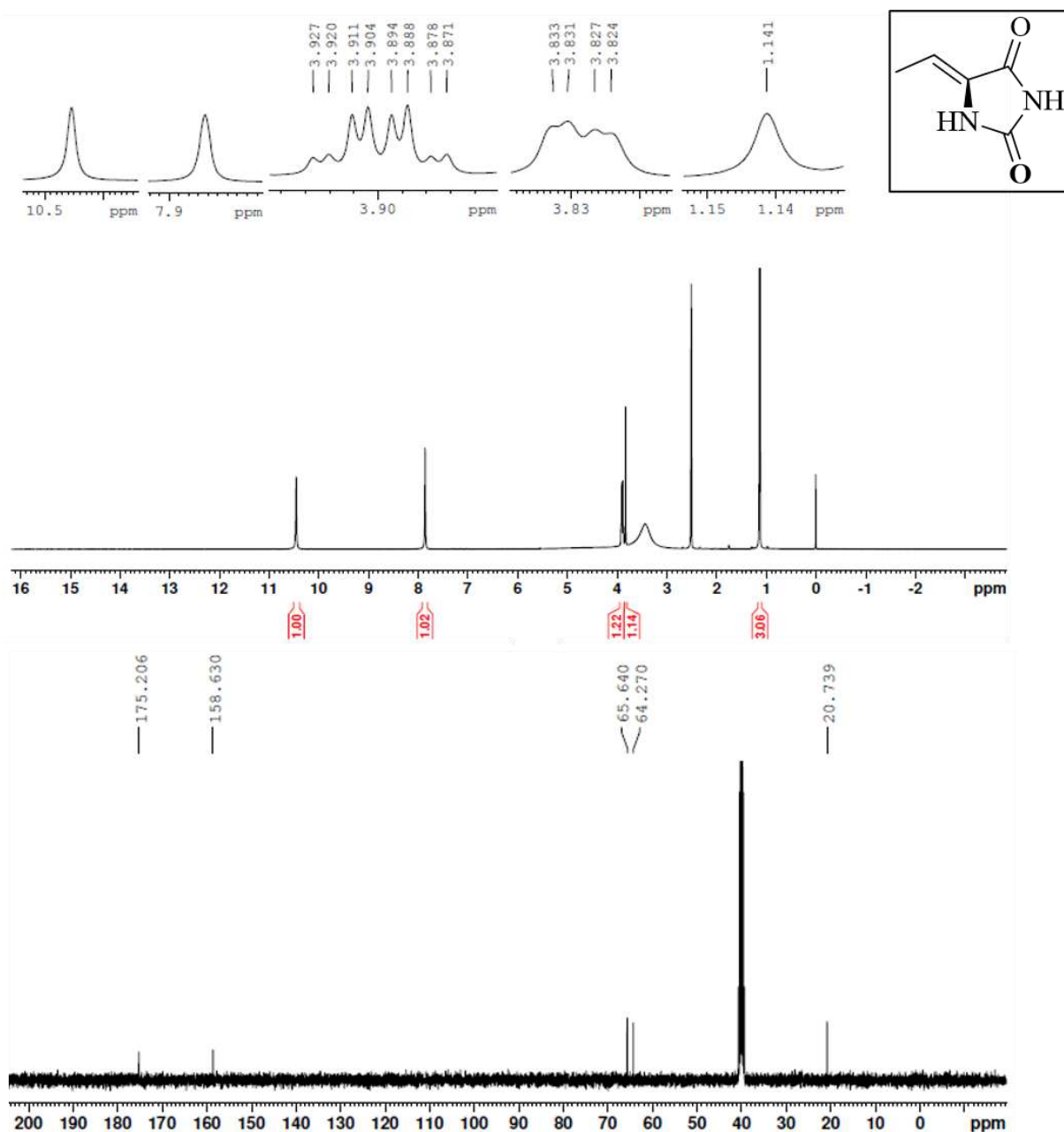
**Imidazolidin-2,4-diona (1h).** Rendimento 0,037 g (62%); sólido branco; pf 221-222 °C; RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10,7 (s, 1H), 7,72 (s, 1H), 3,85 (s, 2H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  174,53 (C=O), 158,88 (C=O), 47,69 (CH<sub>2</sub>).

**Figura A8.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz) para **1i** em DMSO- $d_6$ .



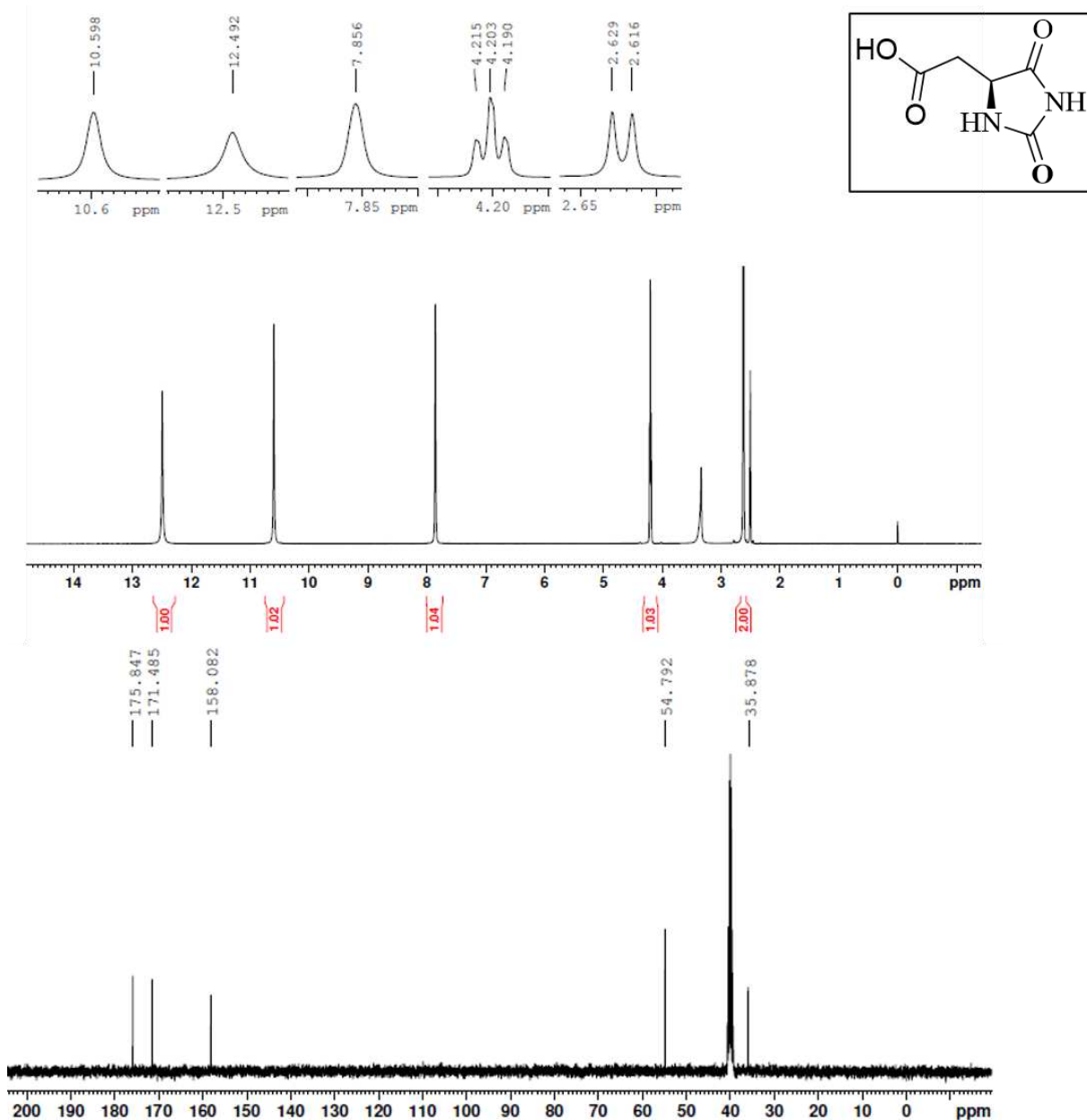
**5-metil-imidazolidin-2,4-diona (1i):** Rendimento 0,14 g (24%); sólido branco; pf 167-168 °C; RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10,56 (s, 1H), 7,87 (s, 1H), 4,02 (ddd,  $J_1 = 1,08$  Hz,  $J_2 = 6,91$  Hz,  $J_3 = 13,8$  Hz, 1H), 1,21 (d,  $J = 6,92$  Hz, 3H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  177,28 (C=O), 157,57 (C=O), 53,72 (CH), 17,70 (CH<sub>3</sub>).

**Figura A9.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz) para **1j** em DMSO- $d_6$ .



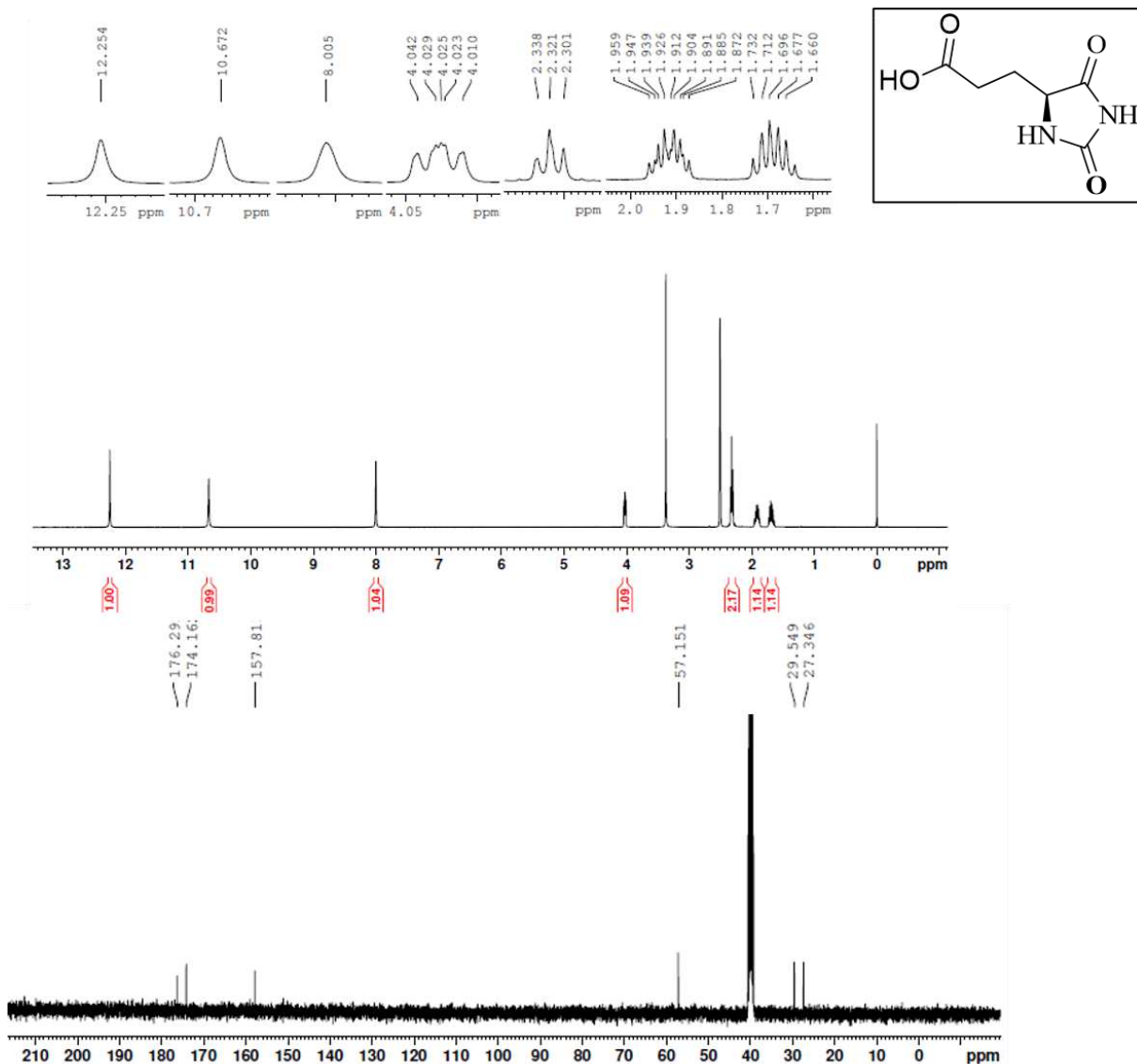
**(Z)-5-etilideno-imidazolidin-2,4-diona (1j).** Rendimento 0,57 g (90%); cristal branco; pf 208–209 °C; RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10,4 (s, 1H), 7,86 (s, 1H), 3,90 (ddd  $J_1=2,63$  Hz,  $J_2=6,49$  Hz,  $J_3=13,04$  Hz, 1H), 3,83 (dd,  $J_1=0,83$  Hz,  $J_2=2,44$  Hz, 1H), 1,13 (d,  $J=6,53$  Hz, 3H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  175,21 (C=O), 158,63 (C=O), 65,64 (C), 64,27 (CH), 20,74 (CH<sub>3</sub>).

**Figura A10.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz) para **1k** em DMSO- $d_6$ .



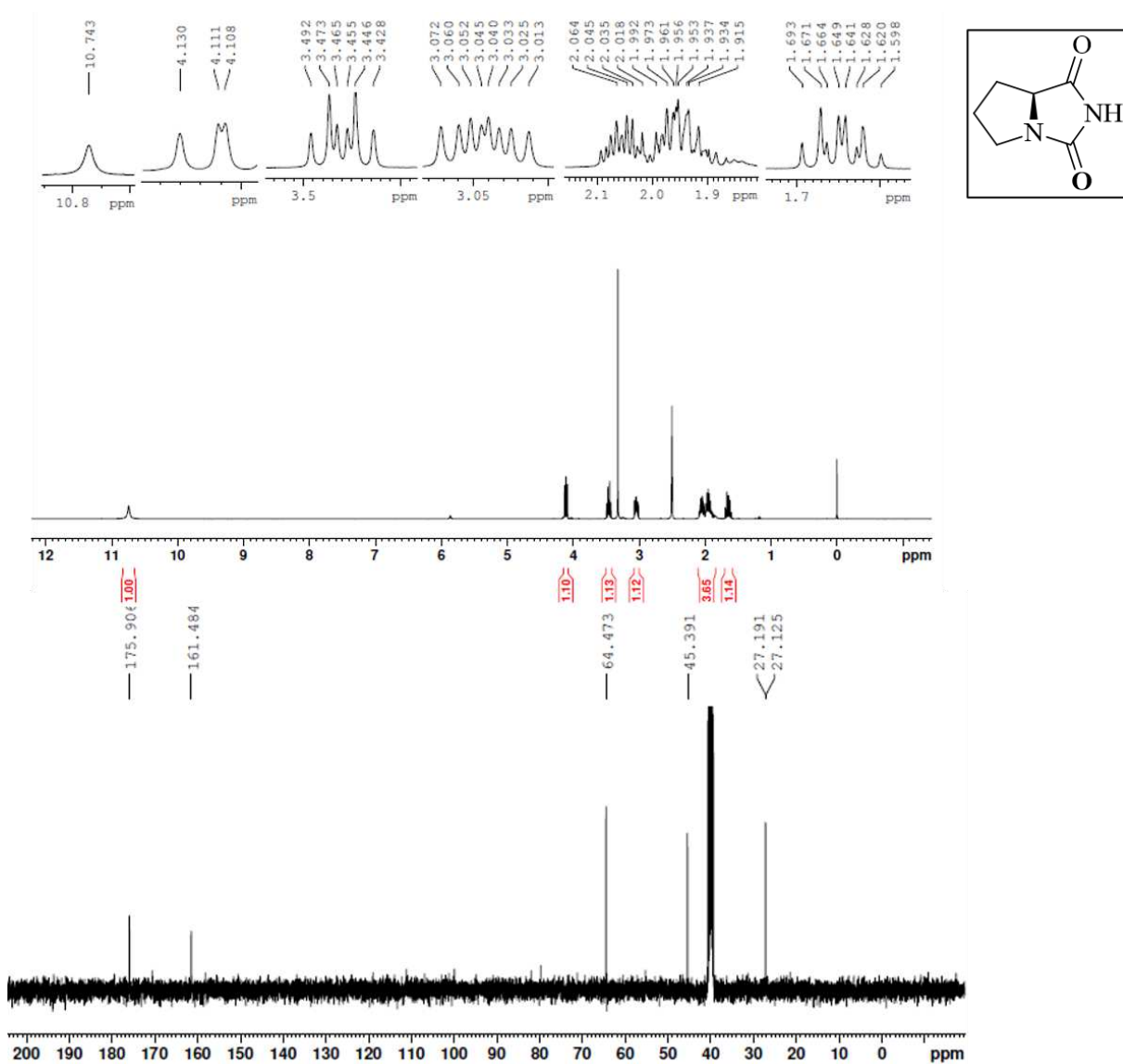
**2-(2,5-dioxoimidazolidin-4-il)acetamida (1k).** Rendimento 0,18 g (23%); sólido branco; pf 224-225°C; RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12,5 (s, 1H), 10,6 (s, 1H), 7,85 (s, 1H), 4,20 (t,  $J = 5,14$  Hz, 1H), 2,62 (d,  $J = 5,25$  Hz, 2H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  175,85 (C=O), 171,48 (C=O), 158,08 (C=O), 54,79 (CH), 35,88 (CH<sub>2</sub>).

**Figura A11.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz) para **11** em DMSO- $d_6$ .



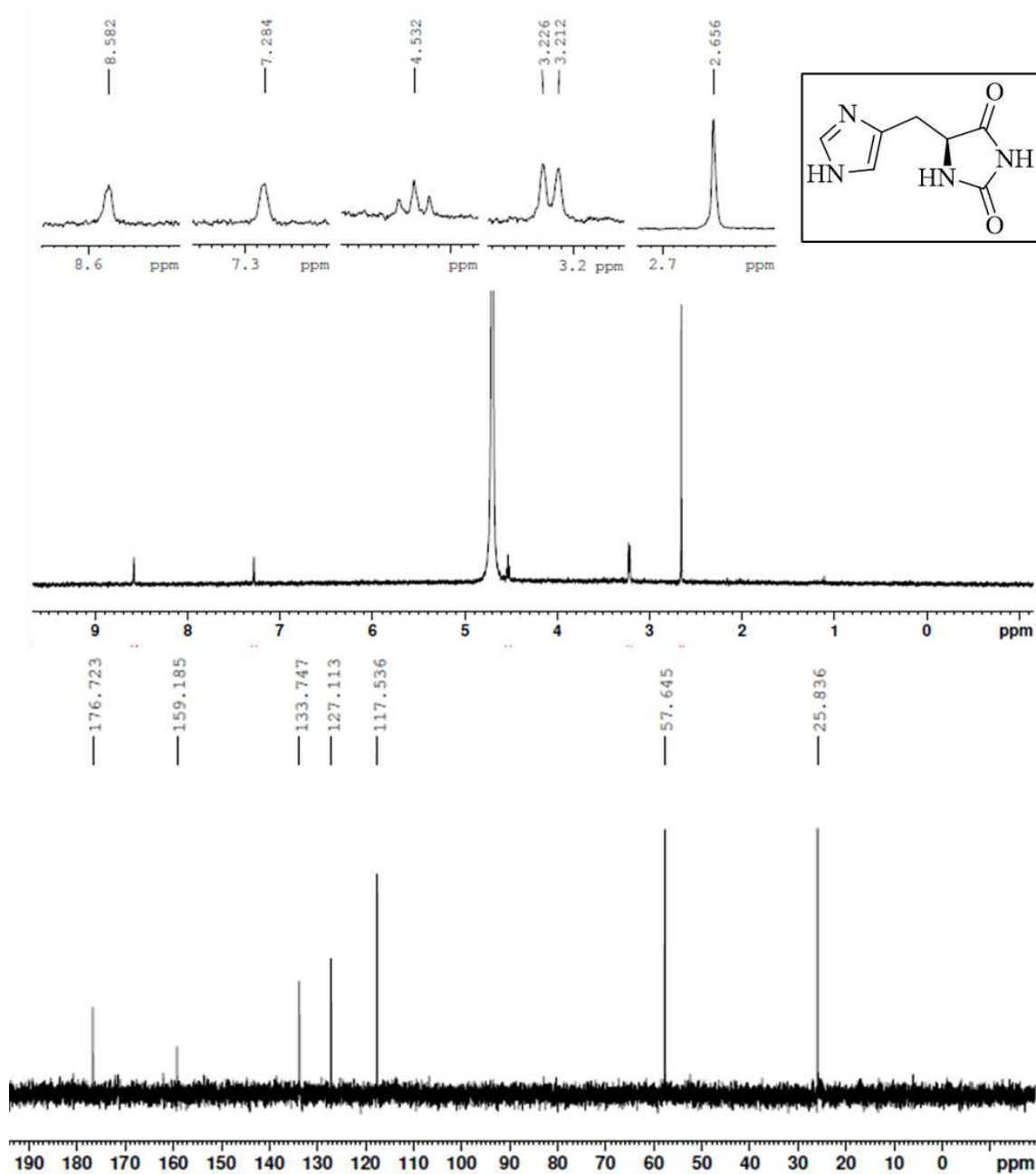
**3-(2,5-dioxoimidazolidin-4-il)propanamida (11).** Rendimento 0,026 g (23%); sólido branco; pf 184-185 °C; RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12,2 (s, 1H), 10,7 (s, 1H), 8,01 (s, 1H), 4,03 (m, 1H), 2,32 (t,  $J = 7,51$  Hz, 2H), 1,91 (m, 1H), 1,68 (m, 1H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  176,29 (C=O), 174,16 (C=O), 157,81 (C=O), 57,15 (CH), 29,55 (CH $_2$ ), 27,35 (CH $_2$ ).

**Figura A12.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz) para **1m** em DMSO- $d_6$ .



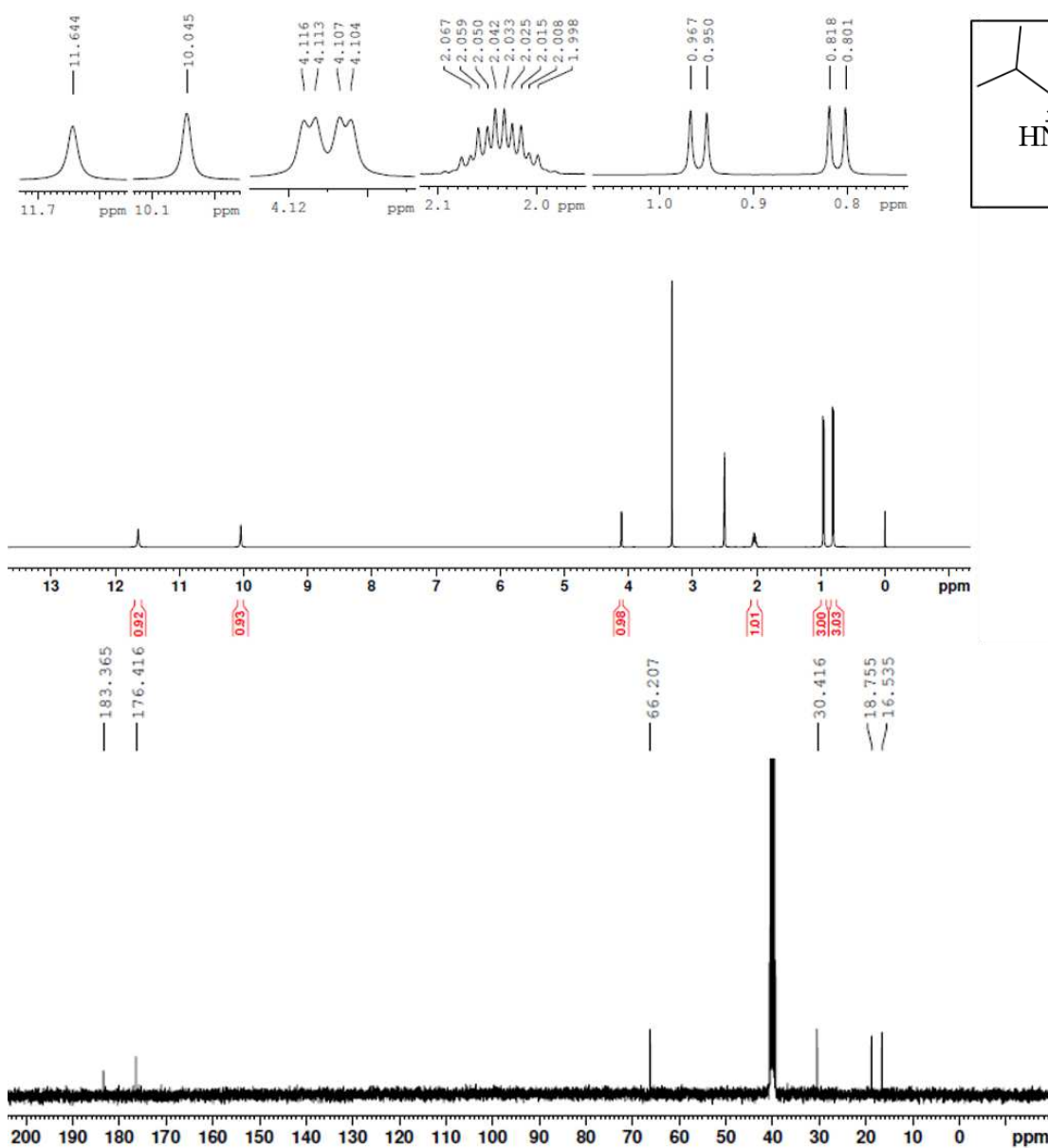
**Tetrahydro-1H-pirrol[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona (1m).** Rendimento 0,18 g (25%); sólido branco; pf 153–155°C; RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10,7 (s, 1H), 4,09-4,13 (m, 1H), 3,43-3,49 (m, 1H), 3,01-3,07 (m, 1H), 1,90-2,08 (m, 3H), 1,60-1,69 (m, 1H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  175,91 (C=O), 161,48 (C=O), 64,47 (CH), 45,39 (CH $_2$ ), 27,19 (CH $_2$ ), 27,13 (CH $_2$ ).

**Figura A13.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz) para **1n** em  $\text{D}_2\text{O}$ .



**5-((1H-imidazol-4-il)metil)-imidazolidin-2,4-diona (1n).** Rendimento 67,85 mg (35%); sólido amarelo; pf 224–228°C; RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  2,92 (ddd,  $J_1=4,84-15,38$ ,  $J_2=5,70-15,38$  Hz, 2H), 4,44 (t,  $J=5,72$  Hz, 1H), 6,80 (d,  $J=0,96$  Hz, 1H), 7,54 (d,  $J=1,12$  Hz, 1H), 9,93 (s, 1H), 11,56 (br, 1H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  28,93 ( $\text{CH}_2$ ), 61,00 (CH), 116,69 (CH), 132,64 (CH), 135,19 (C) 176,45 (C=O), 184,36 (C=S).

**Figura A14.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz) para **2a** em  $\text{DMSO-d}_6$ .



**(R)-5-isopropil-imidazolidin-2,4-diona (2a).** Rendimento 0,48 g (31%); sólido amarelo; pf 139–140 °C; RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  11,6 (s, 1H), 10,0 (s, 1H), 4,11 (dd,  $J_1=1,13$  Hz  $J_2=3,62$  Hz, 1H), 2,00-2,08 (m, 1H), 0,95 (d,  $J=7,02$  Hz, 3H), 0,81 (d,  $J=6,91$  Hz, 3H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,13 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  183,36 (C=S), 176,42 (C=O), 66,21 (CH), 30,42 (CH), 18,75 ( $\text{CH}_3$ ), 16,54 ( $\text{CH}_3$ ).