



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MATHEUS YOSHIMITSU TATSUTA NAKAMAE

**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE RMN NA INVESTIGAÇÃO
DO MODO DE AÇÃO ANTI-UREOLÍTICA DE DERIVADOS
DE AMINOÁCIDOS**

Londrina

2023

MATHEUS YOSHIMITSU TATSUTA NAKAMAE

**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE RMN NA INVESTIGAÇÃO
DO MODO DE AÇÃO ANTI-UREOLÍTICA DE DERIVADOS
DE AMINOÁCIDOS**

Dissertação apresentada junto à Universidade Estadual de Londrina – UEL como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Mestrado em Química – Área de concentração Química Orgânica, para a obtenção de título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Fernando César de Macedo Junior.

Londrina
2023

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

N163a Nakamae, Matheus Yoshimitsu Tatsuta.
Aplicação de técnicas de RMN na investigação do modo de ação anti-ureolítica de derivados de aminoácidos / Matheus Yoshimitsu Tatsuta Nakamae. - Londrina, 2023.
42 f.

Orientador: Fernando César de Macedo Jr.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2023.
Inclui bibliografia.

1. Espectroscopia de RMN - Tese. 2. Inibidores de Urease - Tese. 3. Tempo de Relaxação Longitudinal - Tese. 4. Paramagnetic Relaxation Enhancement - Tese. I. Macedo Jr, Fernando César de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

MATHEUS YOSHIMITSU TATSUTA NAKAMAE

**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE RMN NA INVESTIGAÇÃO
DO MODO DE AÇÃO ANTI-UREOLÍTICA DE DERIVADOS
DE AMINOÁCIDOS**

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Fernando César de Macedo Junior
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dr.^a Marcelle de Lima Ferreira Bispo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr Antonio Laverde Junior
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR

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

Prof.^a Dr.^a Anna Paola Butera
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 02 de março de 2023.

NAKAMAE, Matheus Yoshimitsu Tatsuta. **Aplicação de técnicas de RMN na investigação do modo de ação anti-ureolítica de derivados de aminoácidos.** 2023. Dissertação (Pós-graduação em química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023

RESUMO

Ureases são um grupo de metaloenzimas responsáveis pela catálise da hidrólise da ureia em amônia e carbamato, encontradas na natureza, produzidas por plantas, fungos e bactérias. Estas enzimas possuem consideráveis interesses agrícola e medicinal, uma vez que ela são responsáveis por parte da perda de nitrogênio disponível no solo e consequente redução da eficiência de fertilizantes a base de ureia, assim como são um fator de virulência de microrganismos patogênicos ureolíticos. O desenvolvimento de inibidores de ureases apresenta-se como uma das principais estratégias para enfrentar esses problemas. Estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa apontaram tioidantoínas e hidantoínas derivadas de aminoácidos como inibidores promissores. Nesse trabalho, buscamos investigar as interações desses compostos com a urease de *Canavalia ensiformis* (UCE) utilizando técnicas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de tempo de relaxação longitudinal (T1), espectroscopia ordenada por difusão (DOSY) e PRE (*Paramagnetic relaxation enhancement*). Dados de STD previamente obtidos pelo grupo de pesquisa foram refinados pelos experimentos de tempo de relaxação, nos fornecendo o mapeamento dos grupos de epítomos considerando a relaxação do ligante (GEM-CRL). Os resultados de PRE indicam que todos o ligantes interagem nas proximidades do centro ativo da UCE, embora apresentem perfis de inibição diferentes e os resultados de DOSY nos mostram que a hidantoína derivada da L-metionina apresenta uma interação mais forte com a enzima, embora ela seja uma inibidora mais fraca em relação à tioidantoína da L-valina. Os experimentos de tempo de relaxação e PRE apresentam uma metodologia simples e podem facilmente ser integrados a uma rotina de trabalho envolvendo o estudo de interações intermoleculares ligante-enzima por RMN.

Palavras-chave: RMN. DOSY. Tempo de relaxação longitudinal. PRE. GEM-CRL. Urease. *Canavalia ensiformis*. Inibidores. Tioidantoína. Hidantoína.

NAKAMAE, Matheus Yoshimitsu Tatsuta. **NMR techniques application in the investigation of the mode of action of anti-ureolytic amino acid derivates.** 2023. Dissertation (Post-graduation in Chemistry) – State University of Londrina, Londrina, 2023

ABSTRACT

Ureases are a group of metalloenzymes responsible for the catalysis of the urea hydrolysis into ammonia and carbamate, found in nature produced by plants, fungi and bacteria. The enzyme is of considerable agricultural and medicinal interest due to being responsible for the loss of nitrogen available on the soil and, consequently, reduction of urea-based fertilizer efficiency, as well as a virulence factor in ureolytic pathogenic microorganism. The development of urease inhibitors make up one of the main strategies to face those problems. Previous studies on our research group found amino acid derived thiohydantoins and hydantoins as promising urease inhibitors. In this work, we aim to investigate the interactions between those compounds and the urease from *Canavalia ensiformis* (UCE) utilizing nuclear magnetic resonance spectroscopy techniques of longitudinal relaxation (T_1), diffusion ordered spectroscopy (DOSY) and paramagnetic relaxation enhancement (PRE). STD data previously obtained by our research group were refined by T_1 relaxation experiments providing us an epitope mapping considering the relaxation of the ligand (GEM-CRL). The results of PRE points that all ligands interact in the proximities of the active site of the UCE although they present different inhibition profiles, and DOSY results showed that the hydantoin derived from L-methionine have a stronger interaction with the enzyme than the thiohydantoin derived from L-valine even though it has a weaker inhibitory activity. The T_1 relaxation experiment and the PRE experiments are of simple methodologies and can be easily integrated into the workflow of a ligand-enzyme intermolecular interaction study by NMR.

Keywords: NMR. DOSY. Longitudinal Relaxation. PRE. GEM-CRL. Urease. *Canavalia ensiformis*. Inhibitors. Thiohydantoin. Hydantoin

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	ESTUDO DE INTERAÇÃO LIGANTE-PROTEÍNA: RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	7
1.2	TEMPO DE RELAXAÇÃO LONGITUDINAL.....	8
1.2.1	Mecanismo de Relaxação.....	9
1.2.2	Medindo T_1 – Experimento de Inversão e Recuperação.....	10
1.3	EFEITO NUCLEAR OVERHAUSER.....	11
1.4	DIFERENÇA DE TRANSFERÊNCIA DE SATURAÇÃO – STD.....	15
1.4.1	Sequência de Pulso STD.....	16
1.5	MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS POR STD.....	17
1.5.1	Mapeamento de Epítomos Considerando a Relaxação do Ligante (GEM-CRL).....	17
1.6	PARAMAGNETIC RELAXATION ENHANCEMENT (PRE).....	18
1.7	ESPECTROSCOPIA ORDENADA POR DIFUSÃO – DOSY.....	19
1.8	UREASE.....	21
2	OBJETIVOS	26
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	26
2.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	26
3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	27
3.1	SELEÇÃO DE LIGANTES E PREPARO DAS AMOSTRAS.....	27
3.2	EXPERIMENTOS DE INVERSÃO-RECUPERAÇÃO (T_1) DO LIGANTE.....	27
3.3	EXPERIMENTOS DE INVERSÃO-RECUPERAÇÃO (T_1) DO SOLVENTE – PRE.....	28
3.4	ESPECTROSCOPIA ORDENADA POR DIFUSÃO – DOSY.....	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1	TEMPO DE RELAXAÇÃO LONGITUDINAL DOS LIGANTES.....	29
4.2	MAPEAMENTO DE GRUPO DE EPÍTOPOS CONSIDERANDO A RELAXAÇÃO DO LIGANTE.....	31
4.3	PARAMAGNETIC RELAXATION ENHANCEMENT.....	33
4.4	DOSY.....	34
5	CONCLUSÃO	38
	REFERENCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

1.1 ESTUDO DE INTERAÇÃO LIGANTE-PROTEÍNA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

O fenômeno de interação de um ligante com receptores macromoleculares, é uma chave fundamental para compreensão de processos biológicos. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma ferramenta importante na identificação de substâncias bioativas e no estudo de suas interações com macromoléculas alvo em solução (MEYER; PETERS, 2003).

A espectroscopia de RMN se apresenta como uma ferramenta particularmente importante no estudo de interações entre ligante e macromolécula devido ao fato dos estudos serem realizados em solução, ou seja, a macromolécula não precisa ser imobilizada em uma superfície ou uma coluna, e ela se encontra em um estado quase fisiológico, preservando sua flexibilidade conformacional e sua acessibilidade estérica por todos os lados. Adicionalmente, uma gama razoável de métodos de RMN permitem a análise de diversos compostos simultaneamente, permitindo o desenvolvimento de uma rotina de triagem de compostos eficiente (GOSSERT, JAHNKE, 2016).

Os experimentos de RMN para o estudo de interações intermoleculares ligante-proteína podem ser divididos em duas categorias amplas: técnicas que observam o ligante, onde detecta-se a resposta de um ligante pequeno na presença da macromolécula; e técnicas onde observa-se as ressonâncias da proteína em si. Em geral, técnicas que observam o ligante são mais comumente utilizadas devido à vantagem de não necessitarem de uma proteína marcada isotopicamente (CLARIDGE, 2016)

Teoricamente, qualquer parâmetro de RMN pode servir para medir a atividade de um ligante sobre uma proteína, desde que o parâmetro seja suficientemente sensível ao fenômeno de interação. Os parâmetros mais comumente utilizados incluem o deslocamento químico, a velocidade de relaxação, constantes de difusão e o efeito nuclear Overhauser (NOE) (MEYER; PETERS, 2003).

Em técnicas que baseadas na detecção do ligante, na maioria dos casos, observa-se a resposta RMN do ligante livre, requerendo então que o ligante esteja em um equilíbrio de troca rápida com o receptor, onde o parâmetro de RMN observado é a resposta ponderada entre os estados livre e ligado. Isso pode ser expresso por:

$$M_{\text{obs}} = \chi_F M_F + \chi_B M_B \quad \text{Eq. 1}$$

onde M_{obs} representa a resposta RMN observada, χ_F e χ_B são as frações molares do ligante livre e ligado, respectivamente, de forma que $\chi_F + \chi_B = 1$ e M_F e M_B são os parâmetros de RMN do ligante livre e ligado, respectivamente (CLARIDGE, 2016).

1.2 TEMPO DE RELAXAÇÃO LONGITUDINAL

A relaxação longitudinal envolve eventos de troca de energia entre os estados de spin nuclear e a “rede” (*lattice*), termo este usado para designar os níveis de energia translacional e rotacional contínuos de um sistema como um todo. Se a população de uma transição de spins nucleares em um estado de alta energia se encontra em um valor maior do que o equilíbrio, ela tende a relaxar de volta para o estado de equilíbrio através de eventos onde um núcleo individual transita de um estado de spin de alta energia para um de baixa energia. Este fenômeno se encontra intimamente ligado com os movimentos realizados pela molécula (NEUHAUS, 2011).

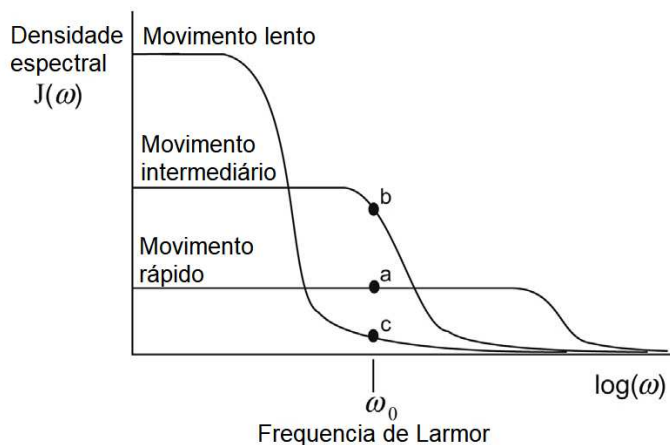
O requerimento fundamental para que ocorra a relaxação longitudinal de um núcleo, é a presença de um campo magnético oscilando na frequência de Larmor do núcleo em questão. Esses campos magnéticos locais podem emergir dos diversos movimentos realizados pela molécula (vibração, rotação, difusão etc.), no entanto, somente a reorientação caótica da molécula ocorre em uma taxa que é apropriada para a relaxação do spin nuclear. Esse movimento aleatório ocorre em uma ampla gama de frequências de acordo com as colisões e associações experienciadas pela molécula (CLARIDGE, 2016)

A distribuição das frequências desses campos magnéticos associados com o movimento da molécula é uma função do tempo de correlação rotacional, τ_c da molécula, chamada de densidade espectral $J(\omega)$ e apresenta um perfil diferente para moléculas com reorientação rápida, intermediária e lentas (Fig.1). Moléculas pequenas com rápida reorientação apresentam apenas uma pequena componente na frequência de Larmor e, por consequência, apresentam uma taxa de relaxação baixa (T_1 alto). Uma redução na velocidade de reorientação, no entanto, faz com que a taxa de relaxação do composto aumente, resultando em um valor de T_1 menor (CLARIDGE, 2016).

O tempo de relaxação das ressonâncias de um ligante sofre então uma alteração quando ele se liga a uma macromolécula como uma enzima, uma vez que deixamos de observar somente o ligante livre em solução, com movimentos rápidos, e passamos a observar também

as propriedades relacionadas com os movimentos lentos de um receptor macromolecular quando o ligante se associa com ele.

Figura 1: Representação da função de densidade espectral para moléculas com reorientação rápida, intermediária e lenta.



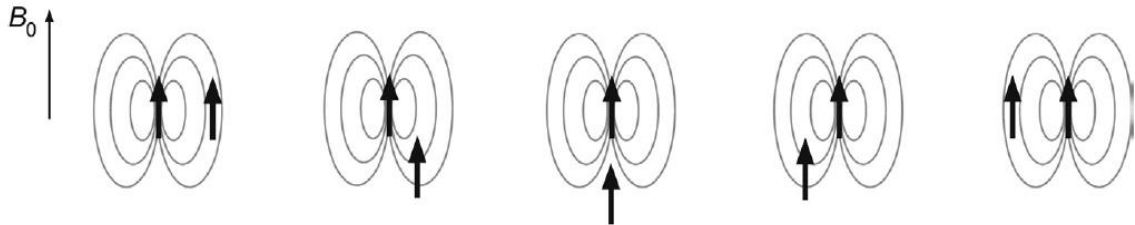
Fonte: Adaptado de Claridge (2016)

1.2.1 Mecanismo de Relaxação

O mecanismo de relaxação mais importante para muitos núcleos de spin $\frac{1}{2}$ se dá através da interação dipolar entre spins. O núcleo em uma molécula “sente” o campo magnético de um núcleo vizinho. Esses campos magnéticos são idênticos em forma a um dipolo magnético e podem ser comparados analogamente a uma barra de imã contendo um polo norte e um polo sul. Devido ao movimento reorientacional aleatório realizado pela molécula em solução, as posições relativas dos dois núcleos no espaço se alteram ao longo do tempo (Figura 2) e o campo magnético local experienciado por um núcleo devido a presença de um núcleo vizinho também irá oscilar ao longo do tempo (GOSSERT, JAHNKE, 2016; CLARIDGE, 2016).

O campo magnético experienciado por um núcleo também pode oscilar devido a presença de uma nuvem de elétrons ao redor do núcleo. Se os elétrons não estão distribuídos simetricamente ao redor do núcleo, o efeito de blindagem que eles exercem irá oscilar de acordo com a orientação da molécula em relação ao campo magnético externo estático, resultando num efeito denominado Anisotropia de Deslocamento Químico ou CSA (do inglês: *Chemical Shift Anisotropy*) (GOSSERT, JAHNKE, 2016).

Figura 2. Representação gráfica da relaxação dipolo-dipolo. Os dois núcleos vizinhos são representados por setas, indicando dipolos magnéticos. B_0 representa o campo magnético externo estático



Fonte: Adaptado de CLARIDGE, 2016

Dependendo da frequência desses diversos campos magnéticos oscilantes experienciados pelo núcleo, eles podem induzir uma transição entre os estados de spins no núcleo, causando assim o fenômeno da relaxação (GOSSERT, JAHNKE, 2016)

A relaxação dipolar pode se dar também quando um spin nuclear interage com um par de elétrons desemparelhados, cujo momento magnético é 658 vezes maior do que os de um próton, fornecendo assim uma fonte de relaxação bastante eficiente. Esse mecanismo é denominado Relaxação Paramagnética e pode ser explorado como um método para auxiliar na detecção de interações ligante-enzima (Vide seção 1.6) (CLARIDGE, 2016).

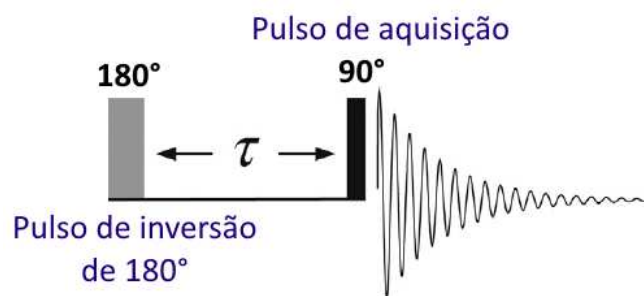
1.2.2 Medindo T_1 – Experimento de Inversão e Recuperação

Para medir o tempo de relaxação longitudinal de um núcleo, em essência, precisamos perturbar o sistema de spins, tirando-o de seu equilíbrio térmico e então monitorar sua recuperação em função do tempo. O experimento de Inversão-Recuperação faz isso através de uma sequência simples de dois pulsos (Figura 3). Inicialmente, um pulso de 180° inverte a população de spins, a qual lentamente se reverte através do fenômeno de relaxação a uma taxa determinada por T_1 . Como a magnetização no eixo Z não é observável em RMN, um segundo pulso de 90° é aplicado para colocar o vetor de magnetização sobre o plano x-y após um período τ . Repetindo o experimento com diferentes intervalos de tempo τ nos permite monitorar o processo de relaxamento dos spins em questão (CLARIDGE, 2016). A intensidade da magnetização medida no experimento é diretamente dependente de T_1 por:

$$M_t = M_0(1 - 2e^{-\tau/T_1}) \quad \text{Eq. 2}$$

onde M_t é a magnetização detectada e M_0 é a magnetização no equilíbrio. O tempo de relaxação T_1 pode então ser obtido realizando o *fitting* das intensidades dos sinais da molécula à essa equação. Atualmente, a maioria dos softwares utilizados na realização de experimentos de RMN dispõem de algoritmos para a realização do cálculo do valor de T_1 a partir de um conjunto de espectros.

Figura 3. Sequência de pulsos do experimento de inversão-recuperação



Fonte: Adaptado de CLARIDGE, 2016

1.3 EFEITO NUCLEAR OVERHAUSER

O efeito nuclear Overhauser é definido como uma mudança na intensidade de uma ressonância que ocorre quando uma outra ressonância é saturada. Em geral, a magnitude da mudança de intensidade relativa entre o estado de equilíbrio e na presença de NOE é dado por:

$$f_I(S) = \frac{I - I^0}{I^0} \times 100\% \quad \text{Eq. 3}$$

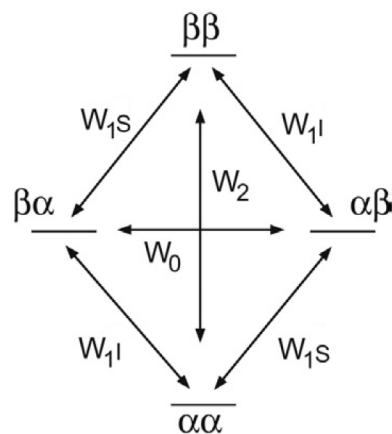
onde I é a intensidade da ressonância observada quando o spin S é saturado, e I^0 é a intensidade no equilíbrio. Convencionalmente, o spin observado é denominado I e o spin saturado S . A detecção de NOE apreciável entre dois spins indica que há uma distância internuclear relativamente pequena entre os dois (NEUHAUS, 2011).

A origem do NOE advém de uma forma particular de relaxação longitudinal chamada relaxação cruzada dipolo-dipolo. Quando uma ressonância S é saturada, a diferença de população entre as transições de S é forçada à zero, colocando o sistema fora de equilíbrio. Como mencionado na seção 1.2, um sistema fora de equilíbrio tentará retornar ao seu estado de

equilíbrio através da alteração da sua população de spins, e essas mudanças de estados de spins se dão através de processos de relaxação longitudinal. Devemos então levar em consideração, quais são os caminhos de relaxação que estão disponíveis aos spins envolvidos (CLARIDGE, 2016).

Para um sistema de dois spins, seis caminhos podem ser identificados (Figura 5), dos quais, quatro deles correspondem a transições simples quântica (do inglês: *single quantum transition*) (W_{1I} e W_{1S}) envolvendo a inversão de um único spin. As outras duas transições $\alpha\beta$ - $\beta\alpha$ e $\alpha\alpha$ - $\beta\beta$ envolvem a inversão simultânea de ambos os spins S e I, e embora essas transições ocorram na prática, elas não podem ser observadas diretamente em um experimento de RMN. Elas são consideradas “proibidas” pelas regras de seleção da mecânica quântica (NEUHAUS, 2011; CLARIDGE, 2016).

Figura 5. Diagrama de níveis de energia para um sistema de dois spins mostrando as seis possíveis transições entre os estados de spins.



Fonte: Adaptado de NEUHAUS, 2011 e CLARIDGE, 2016.

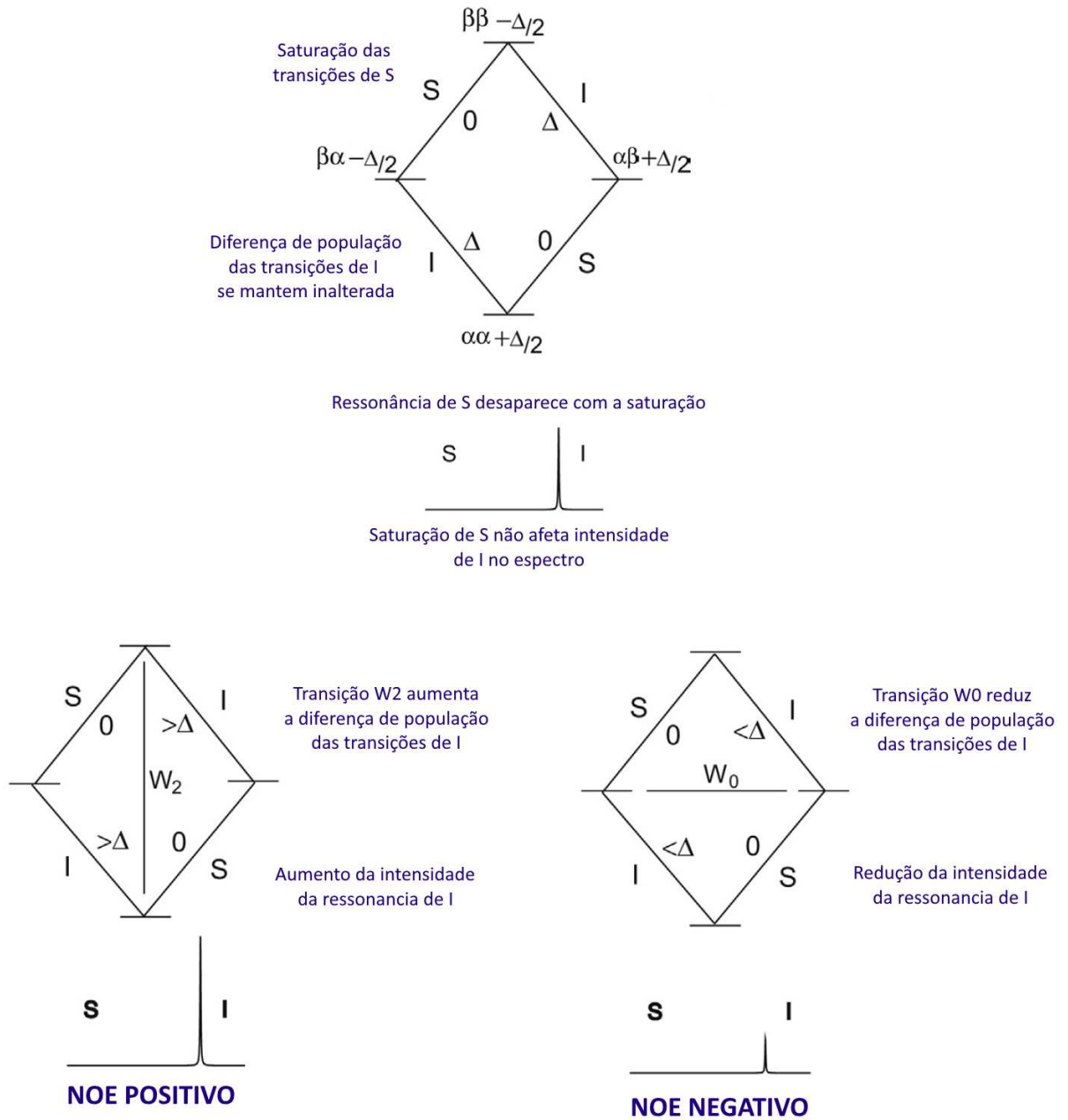
A transição W_2 $\alpha\alpha$ - $\beta\beta$ é denominada transição duplo quântica (do inglês: *double quantum transition*) e a mudança de energia acomodada pela rede corresponde à soma das energias das transições de spins individuais, ou seja, para que transições W_2 ocorram, o campo magnético local gerado pelos movimentos da rede deve conter oscilações na frequência da soma $\omega_I + \omega_S$ (sendo estes a frequência de Larmor dos spins I e S). Já a transição W_0 $\alpha\beta$ - $\beta\alpha$, é referida como uma transição zero quântica (do inglês: *zero quantum transition*), e o campo magnético local gerado pela rede deve conter oscilações na frequência da diferença $\omega_I - \omega_S$. Essas transições são coletivamente referidas como caminhos de relaxação cruzada (NEUHAUS, 2011; CLARIDGE, 2016).

Os dois caminhos de relaxação cruzada influenciam o NOE diretamente. Considerando a situação anteriormente mencionada onde a ressonância S se encontra saturada: a diferença de população entre as transições de S (W_{1S} na figura 5) é equalizada e reduzida a zero (ou seja, $\alpha\alpha = \alpha\beta$ e $\beta\alpha = \beta\beta$). Neste cenário, existe uma população de spins S em um estado de maior energia superior que existiria quando o sistema se encontra em equilíbrio. A diferença de população entre as transições de I (W_{1I} na figura 5) não é alterada nessa situação e se mantém em equilíbrio, dessa forma, as transições W_{1I} não contribuem para que o sistema retorne ao estado de equilíbrio (NEUHAUS, 2011; CLARIDGE, 2016)

Neste cenário, o processo W_2 tentará reduzir a população do estado $\beta\beta$, transferindo-os para $\alpha\alpha$ em uma tentativa de restabelecer o equilíbrio das transições de S. No entanto, ao fazer isso, ele irá também alterar as populações das transições de I, aumentando a diferença de população entre os estados das transições W_{1I} , resultando em um aumento da intensidade do sinal de I, denominado então como NOE positivo. Similarmente, o processo W_0 também tenta restabelecer o equilíbrio das transições de S, porém através da transferência de spins do estado $\beta\alpha$ para $\alpha\beta$, causando então uma diminuição na diferença de população entre as transições W_{1I} , resultando em uma redução na intensidade da ressonância de I, denominado então como NOE negativo (NEUHAUS, 2011; CLARIDGE, 2016). Esse processo é resumido na figura 6. Ambos os processos W_2 e W_0 competem entre si, logo o efeito NOE observado em um espectro é determinado pelo processo predominante.

Transições W_2 e, por consequência, NOE positivo, é predominante em moléculas pequenas com rápidos movimentos e baixo tempo de correlação rotacional uma vez que a frequência necessária para que a mesma ocorra é duas vezes maior do que uma transição simples quântica ($W_2 \rightarrow \omega_I + \omega_S$). Por outro lado, campos magnéticos correspondente à frequência de Larmor não são gerados suficientemente em moléculas grandes com movimentos mais lentos (ou moléculas pequenas em soluções de alta viscosidade) e alto tempo de correlação, devido ao fato de sua reorientação no espaço ocorrer muito lentamente,. Nessa situação, as transições W_0 se tornam importantes para o processo de relaxação, uma vez que a energia envolvida nessas transições são pequenas, sendo a diferença das frequência dos núcleos envolvidos ($W_0 \rightarrow \omega_I - \omega_S$) (ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY; ATIA-TUL-WAHAB, 2016).

Figura 6. Diagrama de níveis de energia e diferenças de população para um sistema de dois spins S e I durante um processo de relaxação cruzada.



Fonte: Adaptado de CLARIDGE, 2016

1.4 DIFERENÇA DE TRANSFERÊNCIA DE SATURAÇÃO – STD

A diferença da transferência de saturação, ou STD (do inglês *Saturation transfer difference*) é uma das técnicas de detecção utilizadas para registrar e medir a interação de pequenas moléculas com macromoléculas, sendo amplamente utilizada na triagem de novos compostos bioativos (ROWE *et al.* 2015). Inicialmente desenvolvida por Moriz Mayer e Bernd Meyer (MAYER; MEYER, 1999), o experimento utiliza-se do efeito nuclear Overhauser para detectar a ligação de ligantes à receptores.

O método depende da saturação de ressonâncias da proteína receptora através da irradiação seletiva de seus prótons. Essa saturação se dispersa rapidamente através da rede de prótons da macromolécula através da difusão de spins. Qualquer molécula que se ligar ao receptor com um tempo de residência significativa sofrerá saturação parcial dos seus prótons. Como o ligante se encontra em um equilíbrio entre o estado ligado e livre, ele carregará consigo esta saturação para a solução, sendo então possível observar uma alteração nos sinais do ligante livre (CLARIDGE, 2016). Ligantes que não interagem com o receptor não irão sofrer transferência de saturação e, por consequência, seus sinais permanecerão inalterados (VIEGA *et al.* 2011).

Na prática, o experimento envolve a aquisição de um espectro onde a proteína é saturada seletivamente, chamado de espectro *on-resonance*, com intensidade I_{SAT} , obtido pela irradiação de uma região do espectro que contem somente ressonâncias da proteína, normalmente entre 0,50 a -1,00 ppm; e um espectro de referência, chamado de *off resonance*, com intensidade I_0 , obtido pela irradiação em uma região que não apresenta ressonâncias de nenhuma espécie envolvida na mistura, sendo normalmente >25,0 ppm (VIEGA *et al.* 2011).

O espectro STD é então obtido pela subtração do espectro *on resonance* e *off resonance* ($I_{STD} = I_0 - I_{SAT}$), onde somente os sinais dos ligantes que receberam transferência de saturação da proteína serão visíveis, obtendo-se uma resposta com intensidade $f_{STD} = I_{STD}/I_0$. Os demais sinais que não receberam saturação apresentação a mesma intensidade nos espectros *on* e *off* e por consequência, após subtração, não aparecerão no espectro de diferença (VIEGA *et al.* 2011).

A magnitude do efeito STD f_{STD} , pode ser melhor avaliado através do uso do fator de amplificação A_{STD} , definido por Mayer e Meyer (2001) como:

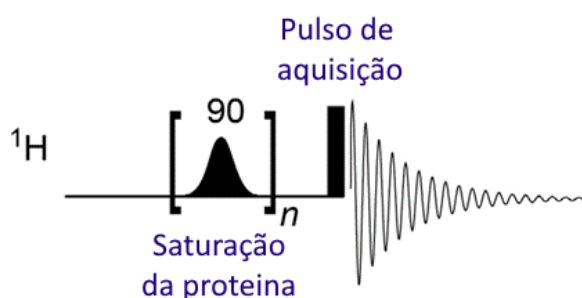
$$A_{STD} = \frac{I_0 - I_{SAT}}{I_0} \times \frac{[L]}{[P]} = \frac{I_{STD}}{I_0} \times \frac{[L]}{[P]} = f_{STD} \times \frac{[L]}{[P]} \quad \text{Eq. 4}$$

onde o efeito STD relativo de um dado próton (I_{STD} / I_0) é proporcional ao excesso do ligante L em relação à proteína P ($[L]/[P]$) (MAYER; MEYER, 2001).

Para um determinado tempo de saturação, A_{STD} pode também ser descrito como o número médio de moléculas saturadas do ligante por molécula do receptor. À princípio, um tempo de saturação e uma concentração de ligante maior permite que mais moléculas do ligante sejam saturadas (VIEGA *et al.* 2011).

1.4.1 Sequência de Pulso STD

Figura 7 – Sequência de pulso padrão do experimento STD



Fonte: Adaptado de CLARIDGE *et al.* 2016

O requerimento essencial para o experimento de STD é a saturação seletiva das ressonâncias da proteína. Isso pode ser realizado de forma similar a experimentos clássicos de NOE com a irradiação longa de baixa potência. O protocolo padrão utiliza a aplicação de pulsos seletivos repetidamente para saturação das ressonâncias da proteína, seguido então de um pulso duro para aquisição (CLARIDGE *et al.* 2016)

Em geral, é recomendado o uso de solventes deutérios na preparação de amostras para experimentos de STD, no entanto, não é incomum que uma quantidade significativa de água ainda esteja presente na amostra. Nesses casos, é possível adicionar gradientes de supressão à sequência de pulso de STD para suprimir a ressonância da água protonada.

1.5 MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS POR STD

O experimento de STD pode ser utilizado para identificar os prótons do ligante que se associam mais intimamente com o sítio de ligação do receptor, fazendo-se assim o mapeamento dos grupos de epítomos, ou GEM (do inglês, *group epitope mapping*) do ligante. O processo parte do princípio de que os prótons do ligante mais próximos do sítio de ligação do receptor sofrerão uma transferência de saturação maior, resultando em maiores intensidades de STD (MEYER; PETER, 2003).

No entanto, essa interpretação do efeito STD é propensa a algumas complicações uma vez que ele não leva em consideração os efeitos da relaxação dos prótons do ligante que podem influenciar o mapeamento dos epítomos (KEMPER *et al.* 2010).

Durante o período de pré-saturação, a saturação se dispersa sobre toda a proteína e progressivamente é transferida para o ligante. No entanto, toda magnetização, incluindo a saturação transferida, decai devido à relaxação. A taxa de relaxação para os prótons do ligante no estado livre pode variar significativamente, implicando assim em uma variação na capacidade dos prótons do ligante de reter suas saturações quando estão livres de seus receptores e, por conseguinte, uma variação em sua intensidade de STD (YAN *et al.* 2003).

1.5.1 Mapeamento de Epítomos Considerando a Relaxação do Ligante (GEM-CRL)

Contudo, os valores do efeito STD podem ser corrigidos para refletir mais precisamente as interações observadas através da ponderação destes valores pelos valores experimentais do tempo de relaxação longitudinal (T_1) dos prótons do ligante, obtendo-se assim, o mapeamento do grupo de epítomos considerando a relaxação do ligante ou GEM-CRL (do inglês, *group epitope mapping considering relaxation of the ligand*) (KEMPER *et al.* 2010).

O novo valor do efeito STD é definido por Kemper *et al.* (2010) como:

$$q \approx \frac{f_{STD}}{T_1} \times \frac{K_D + [L]}{[P]} \quad \text{Eq. 5}$$

onde q representa a taxa em que o ligante recebe magnetização da proteína. Observa-se que os termos envolvidos na equação apresentam um paralelo com o fator de amplificação A_{STD} proposto por Mayer e Meyer (2001). Dessa forma, se K_D é conhecido, é possível calcular q diretamente, no entanto, mesmo se o valor de K_D for desconhecido, é possível determinar a taxa

relativa com a qual a magnetização é transferida para um próton individual do ligante através da aproximação:

$$q \propto \frac{f_{STD}}{T_1} \times \frac{[L]}{[P]} \quad \text{ou} \quad q \propto \frac{A_{STD}}{T_1} \quad \text{Eq. 6}$$

essa taxa de transferência de magnetização q reflete a proximidade do ligante à proteína mais precisamente do que somente a medida do efeito STD (KEMPER *et al.* 2010).

1.6 PARAMAGNETIC RELAXATION ENHANCEMENT (PRE)

Entre os experimentos baseados na observação do ligante, existe uma subcategoria de experimentos, chamados de experimentos de competição, onde observa-se os sinais de uma molécula sonda que pode ou não ser deslocada do seu sítio de ligação pelo ligante de interesse (BERTINI, 2008).

Uma possível abordagem para um experimento de competição é a medida do tempo de relaxação dos prótons de moléculas de água da solução para a investigação de interações intermoleculares. Em geral, a grande razão molar entre a água e a proteína em solução aquosa e a quantidade relativamente pequena de moléculas de água ligadas à proteína que são deslocadas pelos ligantes quando este interage com a proteína, tornaria inviável o uso da água como molécula de sonda, pois a diferença no espectro seria insignificante. (BERTINI, 2008)

No entanto, a presença de um centro paramagnético na proteína altera fortemente os parâmetros de uma água ligada à proteína. Uma vez que a razão magnetogírica de um elétron é 658 vezes maior do que a de um próton, a taxa de relaxação de prótons na vizinhança de um centro paramagnético é fortemente aumentada. Dessa forma, utilizamos o princípio de que, para qualquer proteína presente em um meio aquoso, moléculas de água estarão presentes na vizinhança do centro paramagnético e a taxa de relaxação de seus prótons será aumentada. Essa água, ao se difundir no meio, resultará em um aumento na taxa de relaxação longitudinal do solvente. Qualquer ligante que se ligar na vizinhança do centro paramagnético pode impedir que moléculas de água acessem esse centro, levando a uma redução na taxa de relaxação (CLARIDGE, 2016).

Uma vez que as ureases são metaloenzimas contendo átomos de níquel em seu sítio ativo (vide seção 1.8), essas enzimas são interessantes para o uso da água como molécula sonda na investigação de interações intermoleculares. Neste caso, a enzima nativa apresenta um centro

paramagnético, descartando-se dessa forma a necessidade de substituição do íon metálico ou de adição de radicais orgânicos.

1.7 ESPECTROSCOPIA ORDENADA POR DIFUSÃO - DOSY

O estudo de difusão molecular em solução potencialmente nos fornece uma gama de informações das propriedades físicas da molécula, incluindo tamanho e forma molecular, fenômenos de agregação, encapsulação e complexação. A auto difusão de uma molécula advém de seu movimento translacional aleatório (movimento Browniano) resultante da energia térmica do sistema, e pode ser caracterizado quantitativamente pelo coeficiente de auto difusão D . O deslocamento médio quadrado de uma única molécula em uma única direção durante um período t pode ser definido como:

$$Z_{\text{rms}} = (2Dt)^{1/2} \quad \text{Eq. 7}$$

onde Z_{rms} é a raiz quadrada média da distância deslocada. O coeficiente D é então a medida da taxa com a qual uma molécula se desloca e é o parâmetro físico que buscamos medir ao realizar experimentos de difusão por RMN (CLARIDGE, 2016).

O coeficiente de difusão é inversamente relacionado com o tamanho da espécie difundindo em um ambiente: moléculas grandes ou complexos apresentam um coeficiente de difusão menor e, por consequência, um ligante que interage com uma proteína irá então demonstrar uma difusão translacional reduzida, podendo então ser utilizada em estudos de interação ligante-macromolécula (CLARIDGE, 2016).

A difusão translacional não é um parâmetro muito sensível para detectar essas interações, e experimentos de difusão são raramente utilizados para o propósito de triagem de moléculas. No entanto, uma característica única de experimentos de difusão como o DOSY, é que a atenuação dos sinais do ligante são uniformes ao longo de toda a molécula e o efeito é diretamente proporcional à força da ligação. Em geral, fenômenos de ligação observados por RMN apresentam uma dependência bastante complexa com alguns ou todos os seguintes parâmetros: distância internuclear, anisotropia de deslocamento químico, o ambiente químico que a molécula se encontra e velocidade de troca. Em contraste, os efeitos de difusão são os únicos que se correlacionam diretamente com a força da interação (GOSSERT, JAHNKE, 2016).

A difusão é medida em RMN através da codificação espacial da posição da molécula na amostra através do uso de gradientes de campo magnéticos pulsados (Figura 8). Na maioria dos experimentos de RMN, o campo magnético ao redor da amostra é mantido o mais homogêneo possível para a obtenção de sinais de alta resolução no espectro. A equação de Larmor nos fornece a frequência de ressonância ω de um spin, em função da constante giromagnética γ do núcleo e a força do campo magnético local B:

$$\omega = -\gamma B \quad \text{Eq. 8}$$

a aplicação de um gradiente de campo g_z ao longo do eixo Z faz com que o campo magnético varie ao longo do eixo Z da amostra, adicionando um termo gradiente à B na equação 8 (PAGES, *et al.* 2017).

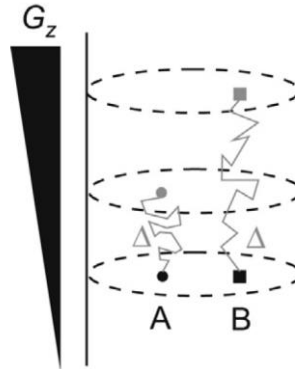
$$\omega_Z = -\gamma(B + g_z) = \omega - \gamma g_z \quad \text{Eq. 9}$$

Aplicar o gradiente através de um pulso rápido, introduz uma evolução adicional às fases dos sinais da molécula. Quando o gradiente é desligado, os spins reverterem às suas frequências de precessão originais. Esse pulso de gradiente tem como função codificar os spins da amostra com ângulos de fase que dependem diretamente da sua posição no eixo Z no tubo da amostra. Após um intervalo de tempo, um segundo pulso de gradiente de mesma duração e magnitude é aplicado à amostra, porém com sinal oposto, fazendo então com que os spins retornem a um estado focalizado (EVANS, 2019).

No entanto, os spin serão completamente focalizados pelo segundo gradiente somente se o núcleo em questão estiver exatamente na mesma posição física que ele se encontrava no momento da aplicação do primeiro gradiente. Devido ao intervalo de tempo existente entre a aplicação dos dois gradientes, as moléculas podem se mover dentro do tubo da amostra através de movimentos Brownianos, de modo que durante a aplicação do segundo gradiente, o campo magnético local experienciado pelo núcleo não corresponde ao primeiro, resultando então em uma focalização parcial do sinal. Por consequência, o sinal detectado será atenuado e a magnitude desta atenuação é diretamente dependente da distância que o núcleo se moveu durante o intervalo de tempo entre os dois gradientes (figura 8), sendo assim, dependente do coeficiente de difusão da molécula (CLARIDGE, 2016)

O DOSY também é utilizado para realizar a separação dos sinais de uma molécula dos sinais da outra quando ambas se encontram em uma mistura. Isso se torna possível devido as diferentes taxas de difusão que as moléculas apresentam quando se encontram em uma solução (CLARIDGE, 2016)

Figura 8. Representação esquemática da atenuação do sinal por difusão da molécula. O campo magnético local experienciado pelas moléculas durante o primeiro pulso (em preto) não equivale a aquele experienciado durante o segundo pulso (em cinza)



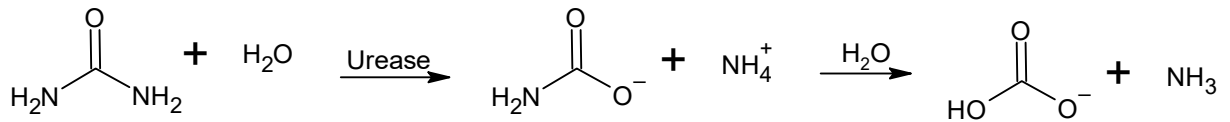
Fonte: Adaptado de CLARIDGE, 2016

A e B representam moléculas diferentes com taxas de difusão diferentes. Embora ambas experienciam um mesmo campo magnético local no momento do primeiro pulso, dado um mesmo intervalo de tempo Δ , elas se encontrarão em posições diferentes devido à discrepância de suas taxas de difusão e por consequência experienciaram campos magnéticos diferentes durante o segundo pulso, apresentando então uma focalização parcial distinta, tornando assim possível discernir quais sinais pertencem a cada um dos dois compostos simultaneamente à determinação de suas equivalentes taxas de difusão (CLARIDGE, 2016).

1.8 UREASE

As ureases (ureia amidoidrolases, EC 3.5.1.5) são um grupo de metaloenzimas pertencente às superfamílias das amidoidrolases e fosfotriestereases, cuja principal característica comum é a presença de um centro metálico em seu sítio ativo. Dentre as metaloenzimas dinucleares, que contém dois centros metálicos, a urease é a única a possuir íons Ni (II) em seu sítio ativo (KRAJEWSKA, 2009).

A principal função da urease é hidrolisar a ureia, resultando na produção de amônia e carbamato como produtos finais (Figura 9), sendo capaz de aumentar a taxa de reação em aproximadamente 10^{14} vezes em comparação à reação não catalisada (UPADHYAY, 2012).

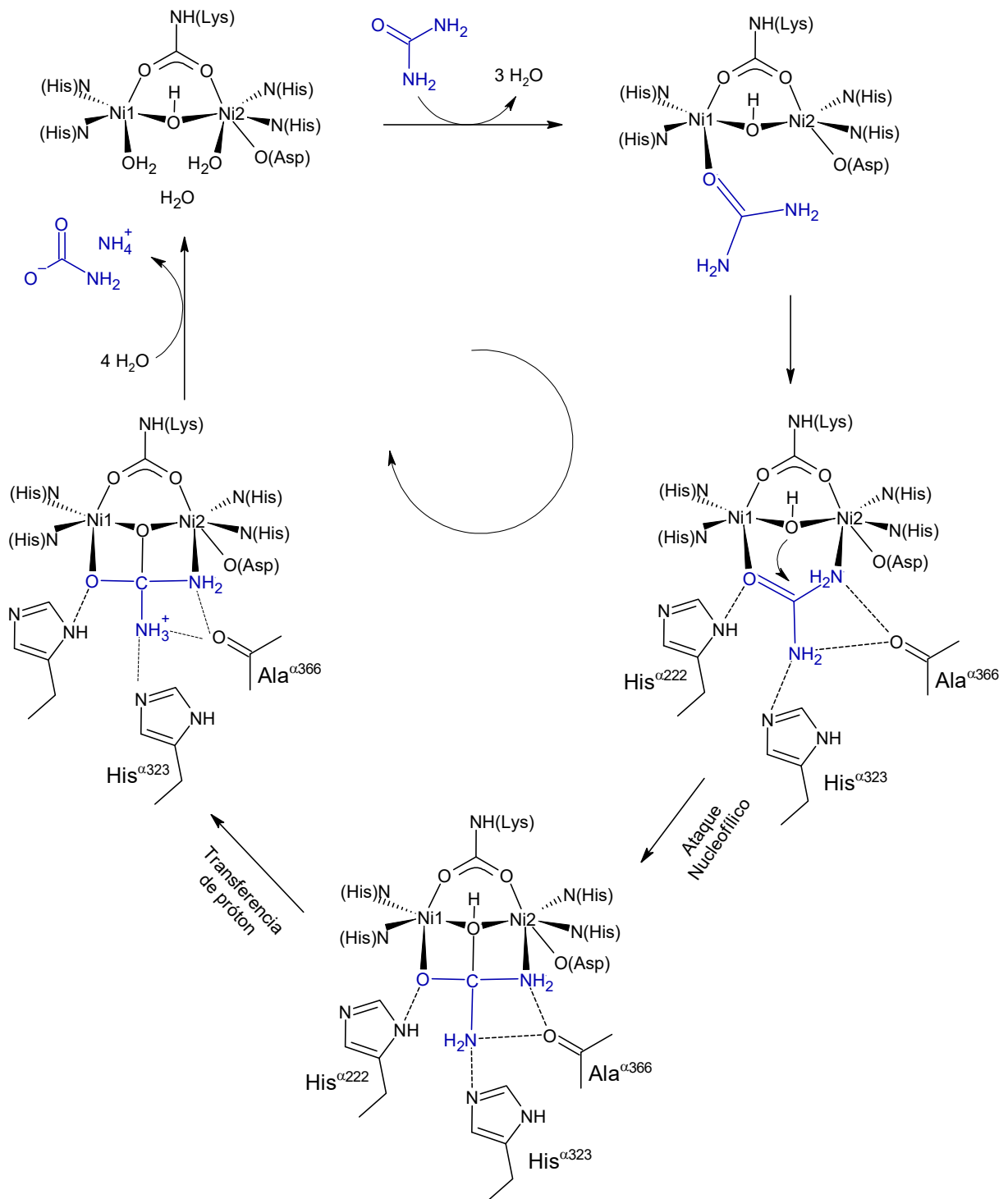
Figura 9. Reação de hidrólise da ureia

De acordo com Kappaun *et al* (2018), o centro metálico é responsável por ativar o substrato e a água para reação (Figura 10). A ureia ao entrar no sítio ativo da urease, liga-se a um dos íons Ni (II) através do oxigênio da carbonila, tornando o carbono da ureia mais eletrofílico e, conseqüentemente, mais susceptível a um ataque nucleofílico. Em seguida, um dos nitrogênios da ureia se liga ao outro íon Ni (II), estabelecendo uma ligação bidentada com a ureia. Essa ligação facilita o ataque nucleofílico da água no carbono da carbonila, levando a formação de um intermediário tetraédrico, e resultando por fim na liberação de NH₃ e carbamato.

Essas enzimas podem ser encontradas na natureza, sendo produzidas por bactérias, fungos, algas e plantas, onde elas catalisam a degradação da ureia para suprir esses organismos com uma fonte de nitrogênio para seu crescimento. As ureases também são consideradas como um fator de virulência de diversas bactérias patogênicas, desempenhando um papel essencial na manutenção de células bacterianas em tecidos celulares (KAFARSKI; TALMA, 2018). Dessa forma, as ureases apresentam grande aplicabilidade, principalmente nas áreas de agricultura e medicina.

O interesse agrícola em volta dessa enzima advém do fato da ureia ser um dos fertilizantes a base de nitrogênio mais utilizados mundialmente, particularmente devido ao seu alto teor de N (46%), baixo custo por unidade de N, disponibilidade na maioria dos mercados, solubilidade em água, baixa capacidade de corrosão e compatibilidade com outros fertilizantes (MODOLO *et al.* 2018). No entanto, a eficácia do uso de ureia como fertilizante é reduzida devido a presença de urease no solo que, através da ação catalítica, hidrolisa a ureia levando e conseqüente perda de N através da emissão de amônia por volatilização. Este processo constitui também, portanto, um problema ambiental (CANTARELLA *et al.* 2008).

Figura 10. Proposta de mecanismo catalítico da hidrólise enzimática da ureia pela urease. Adaptado de Kappaun *et al* (2018).



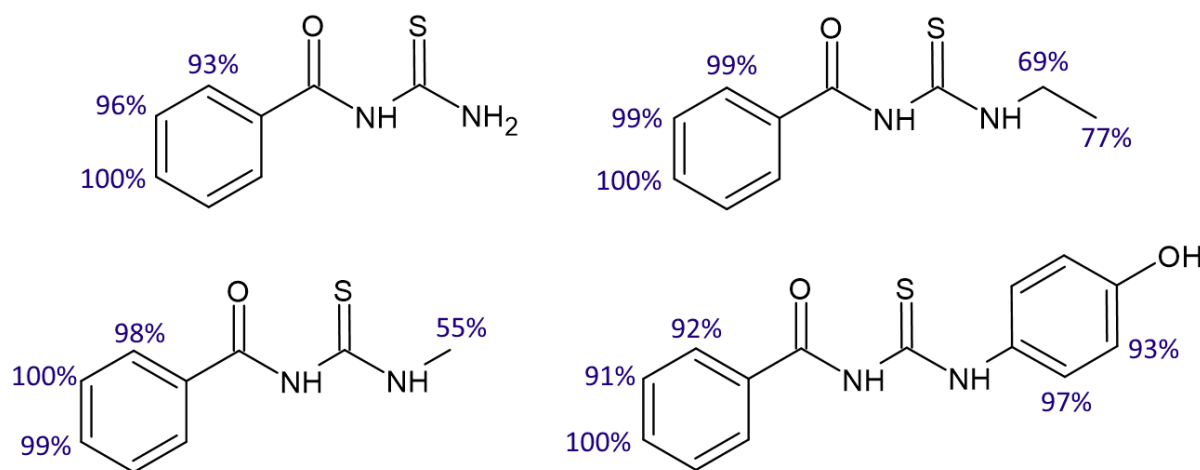
Já na área medicinal, uma das ureases bacterianas mais frequentemente estudadas é a da *Helicobacter pylori*, um agente associado ao potencial desenvolvimento de gastrite, úlcera péptica e câncer de estômago. A *H. pylori*, embora seja sensível a ambientes de baixo pH, é capaz de sobreviver em ambientes ácidos como o estômago (pH 1-2) utilizando-se

da urease para produzir amônia e criar um microambiente favorável para a sobrevivência da bactéria (KONIECZNA *et al.* 2012). Substâncias capazes de inibir a atividade ureolítica se apresentam então como um ponto de partida promissor na busca de novos fármacos no combate à infecção por *H. pylori*.

Uma grande variedade de substâncias foram relatadas apresentando atividade inibitória sobre a atividade catalítica da urease, dos quais diversos deles são análogos da ureia que competem com o substrato natural pelo sítio ativo da urease (MODOLO *et al.* 2018).

Em estudos anteriores em nosso grupo de pesquisa sobre o desenvolvimento de inibidores de urease, Brito (2017) investigou compostos da classe de benzoiltioureas (Figura 11) como potenciais inibidores da urease *in vitro* e no solo *in natura*. Em estudos de RMN por STD, Brito relatou um efeito STD positivo, evidenciando a interação desses compostos com a enzima, e o mapeamento dos epítomos elucidaram a forma que elas se aproximaram do sítio de interação com a enzima

Figura 11. Estrutura dos inibidores de urease benzoiltioureas e seus respectivos mapeamentos de epítomos utilizando a porcentagem de efeito STD

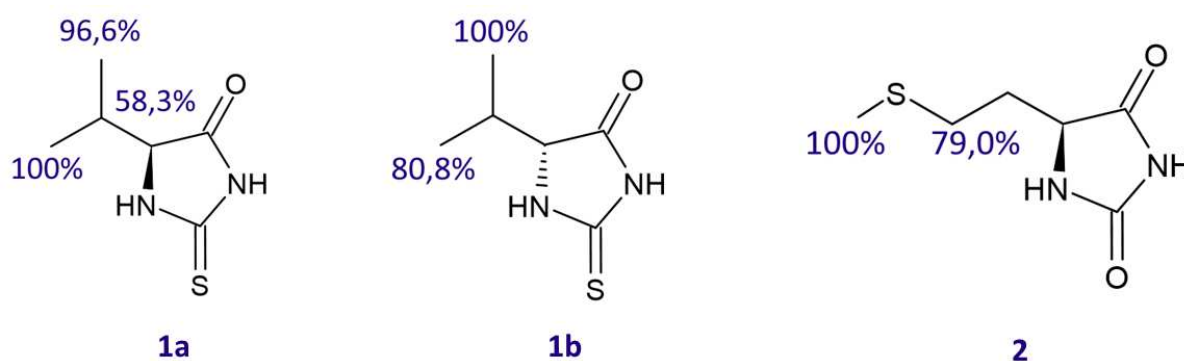


Fonte: Adaptado de Brito, 2017

Camargo (2021) investigou inibidores da classe de tioidantoínas e hidantoínas derivadas de aminoácidos frente a UCE. Os compostos mais ativos das séries sintetizadas foram estudados mais extensivamente, realizando-se análise de RMN STD e mapeamento de epítomos. Camargo relata a importância da cadeia lateral dos compostos em seus papéis como inibidores, evidenciados pelo efeito STD mais pronunciado das metilas terminais (Figura 12).

Investigando a importância da configuração absoluta dos compostos, Camargo relata também estudos de RMN com o enantiômero da tioidantoína da L-valina (Figura 12 - 1a), o composto mais ativo da série sintetizada. Seu enantiômero, derivado da D-valina (Figura 12 - 1b) apresentou um efeito anti-ureolítico significativamente menor ao derivado da L-valina, e em análise por RMN STD, observou-se que o comportamento demonstrado pelas metilas terminais de 1b foi o oposto de seu enantiômero 1a, evidenciando a importância da configuração para que haja interação adequada com seu alvo enzimático.

Figura 12. Estrutura da tioidantoína derivada da L-valina (1a), seu enantiômero (1b) e a hidantoína derivada da L-metionina (2)



Fonte: Adaptado de Camargo, 2021.

Desta maneira, este trabalho busca dar continuidade aos estudos de interação intermoleculares entre a enzima urease de *Canavalia ensiformis* realizando a otimização dos mapeamentos de epítomos por STD obtidos em estudos de inibidores de urease por nosso grupo de pesquisa através da introdução de experimentos de tempo de relaxação longitudinal, experimentos de difusão e o uso de *Paramagnetic Relaxation Enhancement* para averiguar a possível interação desses ligantes com o íon Ni (II) presente no sítio ativo da enzima.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem como objetivo utilizar técnicas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) para investigar interações entre a enzima urease de *Canavalia ensiformis* (UCE) e três inibidores derivados de aminoácidos, sendo duas tioidantoínas e uma hidantoína, visando refinar dados previamente obtidos no nosso grupo de pesquisa, bem como obter informações adicionais que permitam ampliar o entendimento do modo de ação inibitória destes derivados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudo do tempo de relaxação (T_1) dos ligantes para refinamento de dados de mapeamento de epítomos previamente obtidos por STD.

Estudo do tempo de relaxação da água do solvente para investigar interação dos ligantes com o íon Ni (II) do sítio ativo da UCE através da técnica de PRE.

Estudo da taxa de difusão dos ligantes na presença e ausência da UCE.

3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1 SELEÇÃO DE LIGANTES E PREPARO DAS AMOSTRAS

Diante dos resultados obtidos por Carvalho *et al.* (2021), selecionamos os dois compostos mais ativos apresentados nos estudos (Fig.12 - 1a e 2) para a realização de estudos adicionais de interação com a UCE. Foi também selecionado a tioidantina derivada da D-valina (Fig.12 - 1b) para se avaliar o comportamento de um composto menos ativo, bem como para comparação com seu enantiômero para os estudos de mapeamento de epítomos. Estudos de PRE e difusão foram realizados somente com os ligantes 1a e 2.

As amostras foram preparadas seguindo-se o protocolo previamente desenvolvido por Camargo (2022), soluções estoque dos três ligantes em estudo foram preparadas na concentração de 5 mM, utilizando-se água deuterada, D₂O, como solvente e uma pequena quantidade de DMSO-*d*₆ para a solubilização dos compostos. Foi preparado também uma solução estoque de urease de *Canavalia ensiformis* (Tipo III, CAS 9002-13-5) em tampão fosfato em D₂O (pH 7,50; 75 mM de fosfato de sódio, 150 mM de cloreto de sódio) na concentração de 0,05 mM. As amostras utilizadas nas análises de RMN foram preparadas a partir dessas soluções estoque de modo que a solução final apresente um teor de DMSO-*d*₆ inferior a 1%.

3.2 EXPERIMENTOS DE INVERSÃO-RECUPERAÇÃO (T₁) DO LIGANTE

Para os experimentos de relaxação longitudinal (T₁), os espectros foram obtidos utilizando-se da sequência de pulso **tlir** fornecido pela Bruker®. As amostras foram preparadas em três razões ligante enzimas distintas para a aquisição dos espectros: 100:1 (2,0 mM do ligante para 0,02 mM da enzima), 10:1 (0,2 mM do ligante para 0,02 mM da enzima) e 1:1 (0,2 mM de ligante e enzima).

Os experimentos foram realizados seguindo-se o protocolo padrão do experimento de inversão-recuperação fornecidos pela Bruker®, com um tempo de espera (D1) de 10s para os três ligantes (aproximadamente 3 a 5 vezes o tempo do maior T₁ presente na molécula) e usando 10 intervalos de tempo entre os pulsos de 180° e 90°, variando entre 0,001 a 5,000s. Os espectros foram obtidos em 32 scans e a janela espectral foi limitada à região de 0,4 ppm à 4,6 ppm para todos os três ligantes, uma vez que essa região abrange todos os sinais dos ligantes enquanto exclui o sinal do solvente.

Os espectros obtidos foram então processados utilizando-se da ferramenta de análise de dinâmica do software TopSpin v4.1.1, obtendo-se então o T_1 para cada sinal dos ligantes.

3.3 EXPERIMENTOS DE INVERSÃO-RECUPERAÇÃO (T_1) DO SOLVENTE - PRE

Para os experimentos da medida do tempo de relaxação do solvente, as mesmas soluções dos experimentos de T_1 dos ligantes foram utilizadas para aquisição dos espectros. Foi utilizado um tempo de espera D1 de 60s e 10 intervalos de tempo entre os pulsos de 180° e 90° variando entre 0,010 e 50,00s, valor este, dez vezes maior do que os intervalos utilizado para os ligantes. Devido à grande intensidade do sinal do solvente, os espectros foram obtidos com somente 1 scan, limitando-se a janela espectral à região de 3,7 ppm a 5,7 ppm.

Os espectros obtidos foram então processados utilizando-se da ferramenta de análise de dinâmica do software TopSpin v4.1.1, obtendo-se então o T_1 do solvente.

3.4 ESPECTROSCOPIA ORDENADA POR DIFUSÃO - DOSY

Para experimentos de DOSY 2D, foram utilizadas soluções dos ligantes 1a e 2 puras na concentração de 2 mM e suas respectivas misturas com a UCE na razão ligante/enzima 1:1 (0,2 mM de ligante e enzima)

Espectros foram obtidos utilizando-se da sequência de pulsos **ledbpgppr2s** fornecida pela Bruker® seguindo-se os protocolos padrões para experimento DOSY fornecidos por ela. Foram obtidos espectros utilizando-se de 16 amplitudes de gradiente diferentes, realizando-se a aquisição com 64 scans em uma janela espectral de 11 ppm.

Os espectros foram processados utilizando-se dos softwares TopSpin v.4.1.1 e GNAT (General NMR Analysis Toolbox) v.1.3.2. O espectro resultante é pseudo-2D, apresentando o deslocamento químico dos prótons em ppm em um dos eixos e os coeficientes de difusão calculados em $10^{-10}\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ao longo do outro eixo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

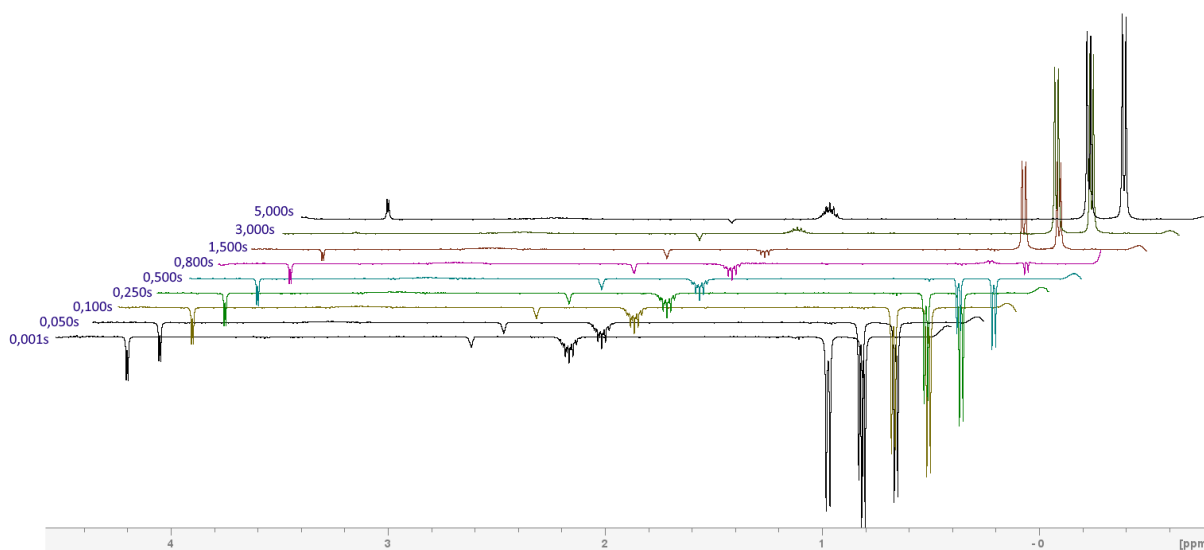
4.1 TEMPO DE RELAXAÇÃO LONGITUDINAL DOS LIGANTES

No experimento de inversão e recuperação para obtenção do tempo de relaxação longitudinal T_1 dos ligantes, assim como toda resposta de RMN obtida de um sistema que se encontra em um equilíbrio de troca rápida, o valor de T_1 observado é o valor ponderado entre os estados livres e ligado, de modo que:

$$T_{1\text{obs}} = \chi_F T_{1F} + \chi_B T_{1B} \quad \text{Eq. 10}$$

onde T_{1F} é o tempo de relaxação do ligante livre, T_{1B} é o tempo de relaxação do ligante quando ele se encontra complexado com a urease e, χ_F e χ_B são as frações molares do ligante livre e ligado respectivamente (de forma que $\chi_F + \chi_B = 1$). O T_1 de uma molécula pode ser obtido experimentalmente através do experimento de inversão-recuperação (Figura 13), realizando-se a obtenção de espectros com diferentes intervalos de tempo entre o pulso de inversão e o de aquisição e então, realizando o *fitting* das intensidades dos sinais do ligante.

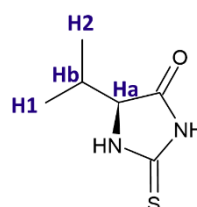
Figura 13. Espectros de prótons da tioidantoína da L-valina em D_2O [2,0 mM], tampão fosfato pH 7,5, obtidos durante o experimento de inversão e recuperação e seus respectivos intervalos de tempo entre o pulso de inversão e de aquisição.



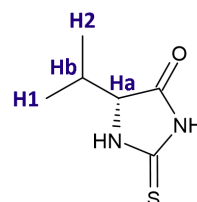
Como mencionado anteriormente na seção 1.2, o tempo de relaxação de uma molécula está intimamente relacionada com os movimentos realizados por ela dentro de uma solução. Moléculas pequenas, como os ligantes em estudo, apresentam rápida reorientação e consequentemente um tempo de relaxação maior, enquanto macromoléculas apresentam um movimento reorientacional mais lento e um tempo de relaxação menor.

Devido a essa diferença de comportamento de um ligante e de uma macromolécula como uma enzima, o tempo de relaxação pode ser utilizado como um indicador de interação ligante-enzima. Em uma mistura ligante-enzima com um grande excesso de ligante, o comportamento observado para o T_1 do ligante deve ser bastante similar ao de um experimento realizado com uma solução pura do ligante (uma vez que $\chi_F \gg \chi_B$). Conforme aproximamos a razão ligante/enzima do equivalente molar 1:1, se este de fato se liga à enzima, a fração molar do ligante complexado χ_B irá aumentar, consequentemente resultando em uma redução no valor de T_1 .

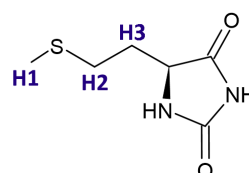
Tabela 1. Tempos de relaxação em segundos (s) para as diferentes ressonâncias dos ligantes em uma solução aquosa pura e em mistura com UCE em diferentes razões ligante/enzima



Ligante 1a / Enzima	H1	H2	Hb	Ha
Pura	1,208	1,300	2,866	2,635 ^a
100:1	1,200	1,271	2,737	1,207 ^a
10:1	1,253	1,180	---	---
1:1	0,853	0,868	0,725	---



Ligante 1b / Enzima	H1	H2	Hb	Ha
Pura	1,194	1,287	2,676	2,870 ^a
100:1	1,194	1,236	3,043	1,634 ^a
10:1	1,331	1,003	3,283	---



Ligante 2 / Enzima	H1	H2	H3
Pura	2,061	1,659	3,730
100:1	2,013	1,600	5,818
10:1	2,207	1,768	---
1:1	1,633	1,477	2,002

^a Sinais com baixa intensidade no espectro obtido

Na tabela 1, são apresentados os valores de T_1 obtidos para cada um dos três ligantes em estudo em solução pura, assim como em mistura com a urease em diferentes razões ligante/enzima. Conforme esperado, observou-se uma redução significativa no valor de T_1 para uma mistura na razão 1:1 em relação a uma mistura 100:1, indicando que o ligante de fato se complexa com a urease em solução.

Estes mesmos valores de T_1 obtidos foram então posteriormente utilizados para refinar o mapeamento do grupo de epítomos por STD previamente realizados pelo grupo de pesquisa.

4.2 MAPEAMENTO DE GRUPO DE EPÍTOPOS CONSIDERANDO A RELAXAÇÃO DO LIGANTE

Em estudos prévios, Carvalho (2021) relata experimentos de STD para os três ligantes em estudo. Os valores de A_{STD} e a porcentagem do efeito STD (%STD) são apresentados na tabela 2. A presença de sinais nos espectros de STD é uma prova de que as moléculas de fato interagem com a urease.

Conforme mencionado na seção 1.5, o valor de %STD é comumente utilizado para se realizar o mapeamento dos epítomos da molécula, partindo do princípio de que os prótons mais próximos do sítio de ligação com a macromolécula durante o fenômeno de interação são aqueles que receberão uma maior transferência de saturação, resultando em um sinal de maior intensidade no espectro de STD. Este sinal então é designado como apresentando um efeito STD de 100%, e a porcentagem dos demais sinais são calculados relativos a este de 100%.

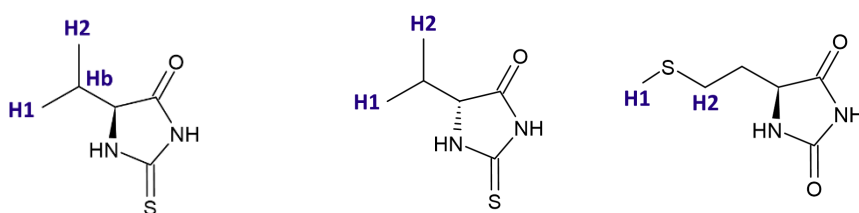
Pelos valores da tabela 2 e demonstrado na figura 14, observamos que os grupos metilas do ligante 1a são os que ocupam a região mais próxima ao sítio de ligação com a urease. Observa-se que o próton presente no carbono beta-carbonílico ($H\beta$) apresenta uma redução significativa em seu valor de %STD em relação às metilas, refletindo sua distância maior do sítio de ligação. Nota-se que no composto 1b, enantiômero do composto 1a e também um inibidor mais fraco, o comportamento observado para as metilas é o oposto daquele observado para o 1a e o próton do carbono beta-carbonílico não é observado, indicando que a configuração do composto possui um papel fundamental em sua interação com a urease.

Nessa interpretação do efeito STD assume-se que todos os prótons do ligante apresentam uma taxa de relaxação idêntica, de modo que a diferença nas intensidades dos sinais decorrentes da transferência de saturação se dão puramente devido a sua proximidade com a macromolécula saturada. No entanto, os prótons dos ligantes apresentam tempo de relaxação diferentes entre si, conforme apresentado na Tabela 1. Prótons que relaxam mais lentamente

devem apresentar uma intensidade menor do que aqueles que relaxam mais rapidamente devido à saturação parcial dos spins que, ao relaxarem mais lentamente, não são capazes de se recuperarem suficientemente entre cada pulso da sequência de aquisição.

Dessa forma, uma correção dos valores observados de A_{STD} levando-se em consideração o tempo de relaxação individual de cada próton pode nos fornecer um mapeamento de epítomos mais preciso. O procedimento para realizar essa correção é descrito por Kemper *et al.* (2010) (equação 6, seção 1.5.1). Na tabela 2, são apresentados os valores de A_{STD} ponderados pelo T_1 (GEM-CRL) e suas respectivas porcentagens de efeito STD (%GEM-CRL).

Tabela 2. Valores medidos para os efeitos STD para os três ligantes, o tempo de relaxação T_1 medidos e valores calculados para o efeito STD considerando a relaxação do ligante (GEM-CRL) (Razão ligante-enzima 100:1)

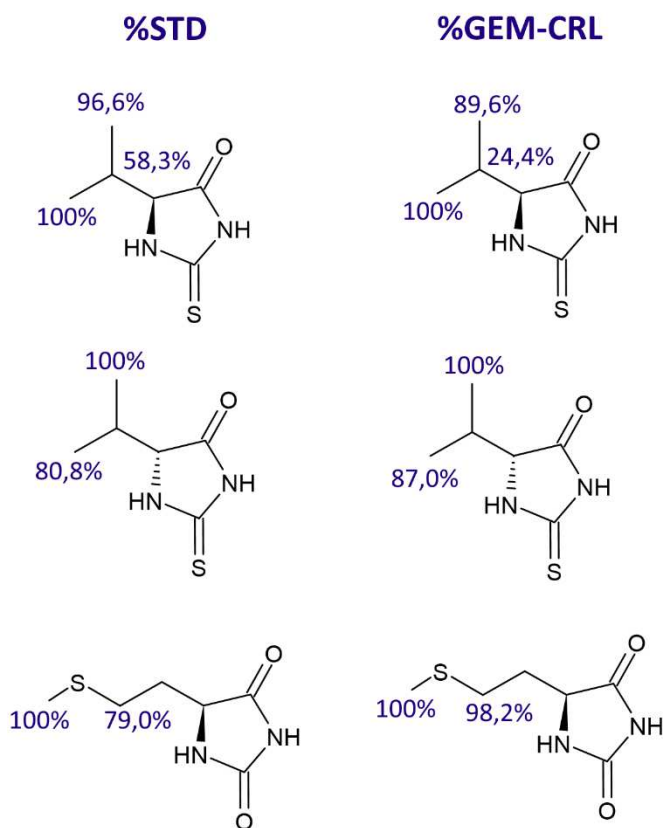


Ligante	1a			1b		2	
Sinal	H1	H2	Hβ	H1	H2	H1	H2
A_{STD}	1,43	1,38	0,83	1,43	1,77	2,14	1,69
% STD	100	96,6	58,3	80,8	100	100	79,0
T_1	1,21	1,30	2,87	1,19	1,29	2,06	1,66
GEM-CRL	1,18	1,06	0,29	1,20	1,38	1,04	1,02
%GEM-CRL	100	89,6	24,4	87,0	100	100	98,2

Fonte: CAMARGO, *et al.* 2022

É possível observar pelos valores de %GEM-CRL que para o composto 1a, existe uma discrepância maior do que inicialmente estimado para o próton Hβ, apresentando um efeito STD quatro vezes menor do que a metila H1.

Figura 14. Comparação dos valores de %STD e %GEM-CRL para os ligantes 1a, 1b e 2 respectivamente



Observando-se os valores de %GEM-CRL obtidos para seu enantiômero 1b, nota-se que o comportamento oposto das metilas inicialmente observado pelo %STD se torna ainda mais evidente. Em uma análise inicial, o composto 1b apresentava uma diferença de aproximadamente 20% (100% para 80,8%) entre as duas metilas, enquanto que o composto 1a indicava uma interação quase idêntica entre as duas metilas (100% e 96,6%), mas após levar em consideração as taxas de relaxação de cada próton, observa-se que ambos os compostos apresentam uma interação bastante similar entre si para as duas metilas, porém opostas, com H1 e H2 apresentando respectivamente valores de 100 e 89,6% para 1a e 87,0 e 100% para 1b.

Por outro lado, para o ligante 2, a %GEM-CRL nos indica que ambos os prótons apresentam uma interação similar entre si, ao invés da discrepância inicialmente sugerida pela %STD, sugerindo que toda a cadeia lateral do composto 2 se aproxima do sítio de ligação, enquanto a %STD nos indicava que a interação se dava mais pela metila terminal da cadeia.

4.3 PARAMAGNETIC RELAXATION ENHANCEMENT

Na medida do tempo de relaxação do sinal da água do solvente, similar aos experimentos anteriores com a relaxação do ligante, buscamos por alterações no T_1 decorrentes de interações da enzima com o ligante. No entanto, diferente dos experimentos anteriores, a mudança observável é decorrente não do aumento da fração molar do estado ligado do ligante e sim da intensificação da relaxação devido aos efeitos de um centro paramagnético ou PRE (do inglês: *paramagnetic relaxation enhancement*).

Como mencionando na seção 1.6, PRE advém das interações magnéticas dipolares entre os elétrons desemparelhados de um centro paramagnético e um núcleo, resultando em um aumento nas taxas de relaxações nucleares, ou seja, uma redução no tempo de relaxação. Esse aumento se deve ao fato de elétrons desemparelhados possuírem momento magnético muito maiores do que prótons (CLORE *et al.* 2015).

O experimento parte do princípio de que em uma solução aquosa, o centro paramagnético estará rodeado por moléculas de água e quando um ligante interage com a vizinhança desse centro, ele irá inevitavelmente deslocar essas moléculas de água, que carregarão consigo para o meio o efeito paramagnético, um processo similar à como as moléculas do ligante carregam consigo a saturação recebida pela proteína para o meio da solução no experimento de STD.

Os valores obtidos na tabela 3 sugerem que ambos os dois ligantes interagem de alguma forma com a vizinhança do sítio paramagnético da enzima, que para a UCE são os íons níquel (II) presentes em seu sítio ativo. Os ligantes ao interagirem com as proximidades do sítio ativo da UCE, deslocam as moléculas de água que se encontram nos arredores dos íons Ni (II), onde observamos então uma redução do T_1 do solvente da solução.

Tabela 3. Valores medidos para o tempo de relaxação do sinal da água do solvente em misturas contendo ligantes e UCE em diferentes razões ligante/enzima

	Tempo de relaxação (s)	
	Ligante 1a	Ligante 2
100:1	17,401	16,935
10:1	16,371	15,991
1:1	11,110	10,076

Fonte: Autoria própria

É valido destacar que, embora os dois inibidores sejam relatados como apresentando perfis de inibição diferentes, sendo o ligante 1^a um inibidor misto possuindo

afinidade tanto com o complexo ligante-enzima quanto com a enzima livre; e o ligante 2 um inibidor incompetitivo, possuindo afinidade somente com o complexo ligante-enzima (CARVALHO *et al.* 2022), ambos apresentaram interação com a vizinhança do sítio ativo da UCE.

4.4 DOSY

Nos experimentos de DOSY, foram obtidos espectros dos ligantes 1a e 2 puros e também em mistura com a UCE em uma razão ligante/enzima de 1:1. O experimento nos fornece um espectro pseudo-2D, onde o eixo horizontal nos apresenta o deslocamento químico dos prótons em ppm, e o eixo vertical nos apresenta os coeficientes de difusão em $10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (ou $\log(\text{m}^2 \text{ s}^{-1})$ se utilizar o *fitting* logarítmico ao invés do linear).

De um modo geral, todos os sinais de prótons pertencentes a uma mesma molécula apresentam uma mesma difusão com pequenas variações. Dessa forma, é possível determinar o coeficiente de difusão de um composto simplesmente observando-se o valor no eixo vertical que corresponde com a linha de sinais do seu composto.

Nas figuras 15 e 16 são apresentados os espectros de DOSY para amostras dos ligantes 1a e 2, respectivamente. Os sinais referentes aos ligantes são identificados por uma linha reta. Nos espectros B, onde o ligante se encontra em uma mistura com a UCE, os diversos sinais observados na região entre 3,0 a 5,0 ppm, correspondem à mistura de açúcares utilizados como estabilizantes da enzima. O sinal da água residual que deveria estar em aproximadamente 4,8 ppm não é observado devido a utilização de supressão de água na sequencia de pulso de aquisição. Os valores de coeficiente de difusão para os ligantes são resumidos na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4. Valores de coeficiente de difusão para os ligantes 1a e 2 na presença e ausência de UCE na solução de amostra

Ligante 1a	Coeficiente de Difusão ($10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$)	Erro Padrão
Ligante puro	5,719	± 0,014
Mistura com UCE (1:1)	4,678	± 0,025
Ligante 2		
Ligante puro	5,736	± 0,024
Mistura com UCE (1:1)	4,220	± 0,018

Ao comparar ambos os espectros e os valores de coeficiente de difusão observados para os ligantes, nota-se que ambos apresentaram uma mudança de difusão na presença da enzima: o ligante 1a apresentou um coeficiente de difusão de $5,719 \cdot 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ na ausência da enzima e $4,678 \cdot 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ em sua presença, uma diferença $\Delta D = 1,041 \cdot 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$; e o ligante 2 apresentou um coeficiente de difusão de $5,736 \cdot 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ na ausência da enzima e $4,220 \cdot 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ em sua presença, uma diferença $\Delta D = 1,516 \cdot 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$

Ambos os ligantes apresentam um coeficiente de difusão similar entre si em uma solução pura, em concordância com o fato que ambos são moléculas pequenas com massas moleculares similares (ligante 1a MM = $158,05 \text{ g mol}^{-1}$ e ligante 2 MM = $174,22 \text{ g mol}^{-1}$), no entanto, na presença da UCE, o ligante 2 (%I = 85,9) apresentou uma redução em seu coeficiente de difusão maior do que o ligante 1a (%I = 90,5), indicando uma interação mais forte com a enzima, embora ele seja o inibidor mais fraco entre os dois.

Figura 15. Espectros de RMN de DOSY 2D para (A) o ligante 1a puro, e (B) sua mistura com a UCE em razão ligante/enzima 1:1

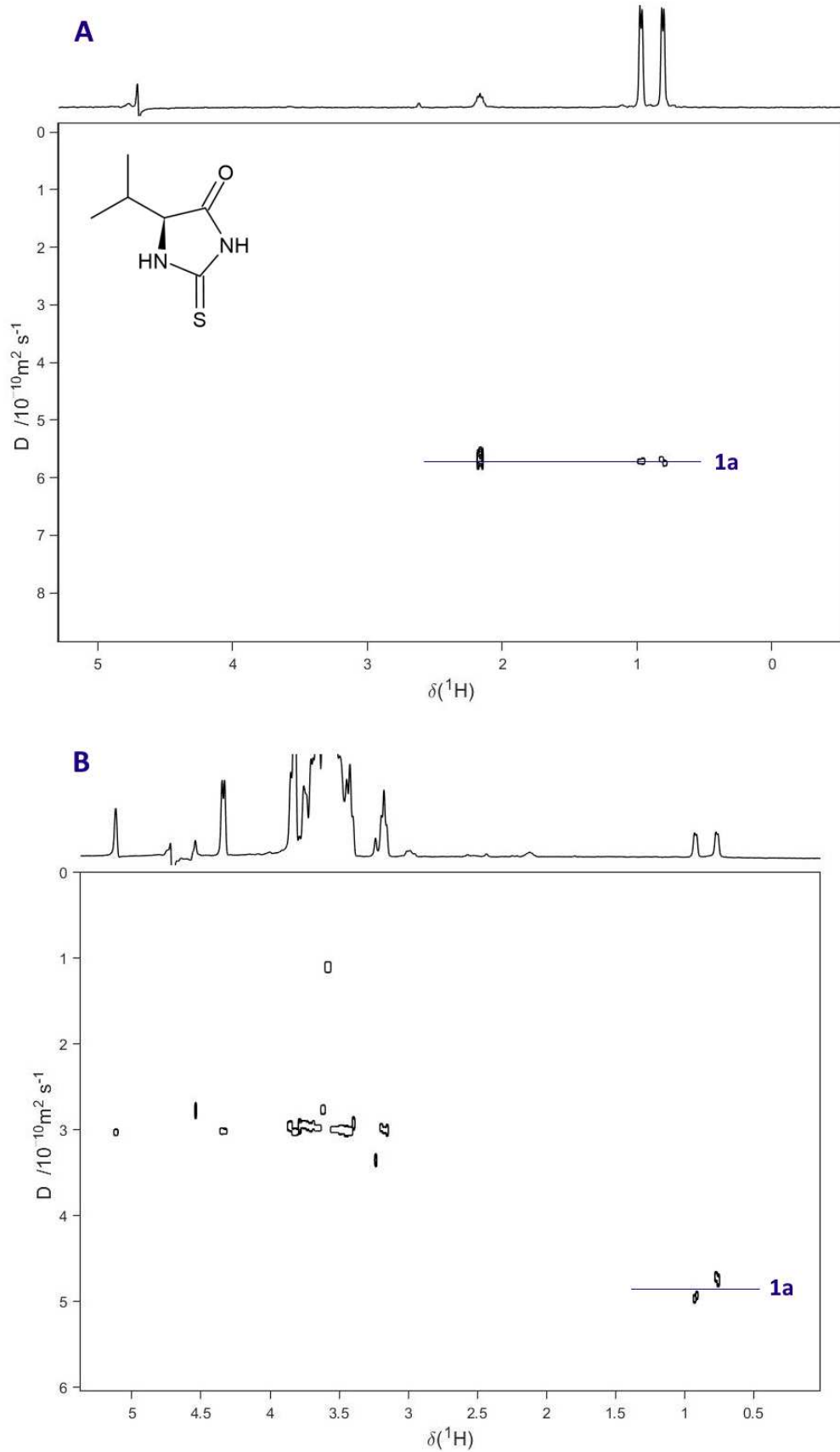
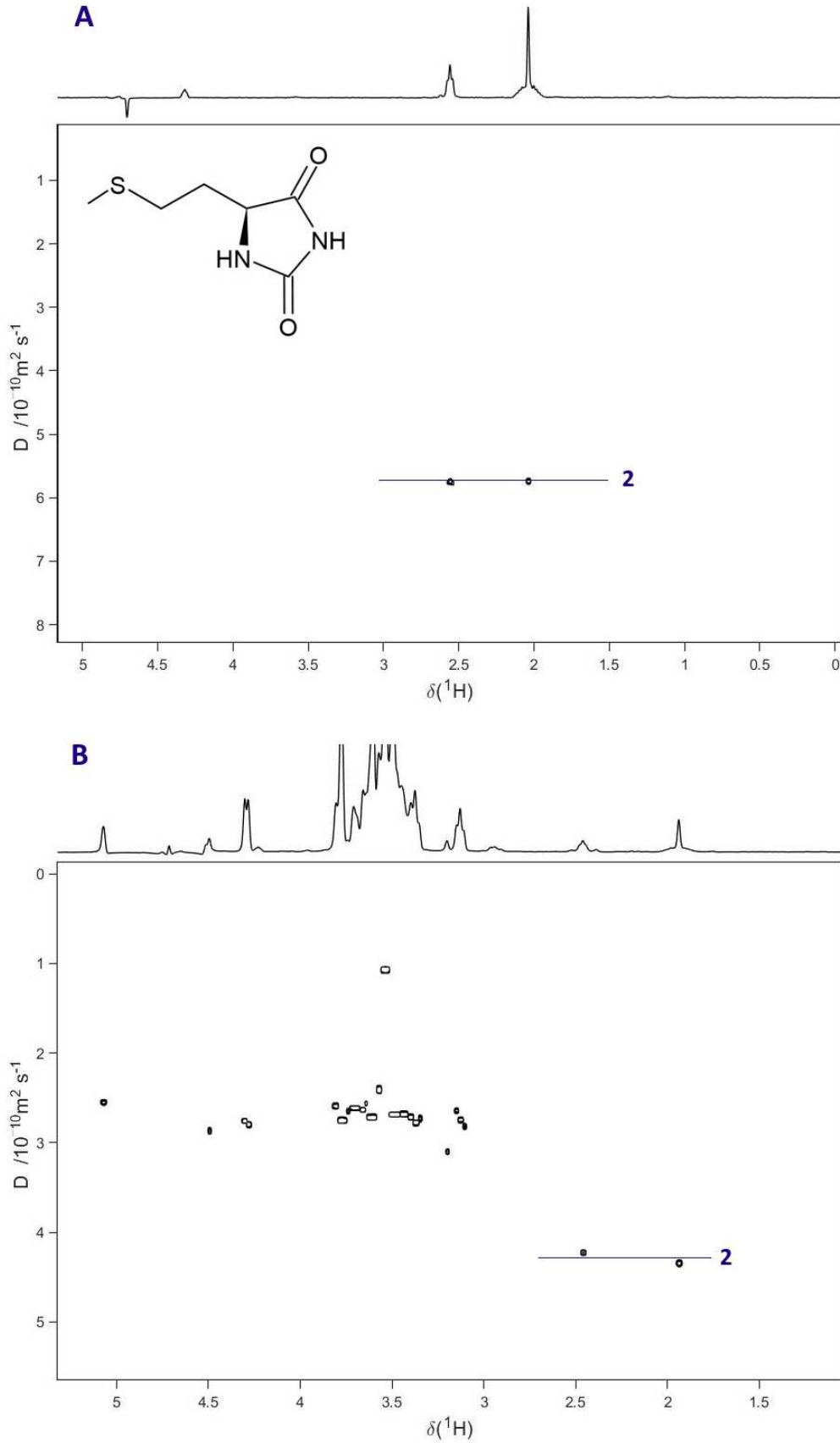


Figura 16. Espectros de RMN de DOSY 2D para (A) o ligante 2 puro, e (B) sua mistura com a UCE em razão ligante/enzima 1:1



5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos através da técnica de RMN STD foram condizentes com experimentos previamente realizados pelo grupo de pesquisa para os ligantes testados em interação com a urease de *Canavalia ensiformis*, evidenciando a importância da configuração absoluta da tioidantina em sua interação com a UCE.

Experimentos de tempo de relaxação se mostram uma ferramenta útil para o refinamento de dados de STD, fornecendo um mapeamento de epítomos mais preciso e ilustrando o efeito do tempo de relaxação dos diferentes prótons do ligante. A simplicidade da metodologia envolvida permite que ela seja integrada facilmente ao fluxo de trabalho em estudos de interação intermolecular ligante-enzima utilizando STD.

O uso de água como molécula de sonda se mostrou eficiente nos estudos envolvendo a intensificação da relaxação pela influência de um centro paramagnético, nos mostrando que ambos os ligantes testados interagem com a UCE nas proximidades do seu sítio ativo, que contém os íons Ni (II), embora apresentem perfis de inibição distintos, com o ligante 1a apresentando inibição mista e o ligante 2 sendo incompetitivo.

Resultados obtidos por DOSY 2D corroboram com o fato que ambos os ligantes interagem com a enzima diretamente, uma vez que ambos apresentaram uma redução na taxa de difusão quando em mistura com a UCE. O ligante 2 apresentou uma interação mais forte com a enzima do que o ligante 1a, embora ele seja o inibidor mais fraco.

REFERENCIAS

ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY, Muhammad Iqbal; ATIA-TUL-WAHAB. **Solving Problems with NMR Spectroscopy**. Second Edition ed. Boston: Academic Press, 2016.

BERTINI, Ivano et al. Water-based ligand screening for paramagnetic metalloproteins. **Angewandte Chemie International Edition**. v.47, n.24, p.4533-4537, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/anie.200800327>

BRITO, TIAGO DE OLIVEIRA. **Benzoiltioureias : síntese, atividades antimicobacteriana e antiureolítica e estudo de interação com urease por RMN**. 2017. - Universidade Estadual de Londrina, 2017

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

CANTARELLA, Heitor; et al. Ammonia Volatilisation from urease inhibitor-treated urea Applied to sugarcane trash blankets. **Scientia Agricola (Piracicaba Braz.)** v.65, n.4, p.397-401, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162008000400011>

CAMARGO, Priscila Goes, et al. Thiohydantoins and hydantoins derived from amino acids as potent urease inhibitors: Inhibitory activity and ligand-target interactions. **Chemico-Biological Interactions**. v.365, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110045>

CAMARGO, Priscila Goes. **Hidantoinas e Tioidantoinas: Síntese, avaliação antiureolítica e estudos de interações por ressonância magnética nuclear e docking molecular**. 2021. Universidade Estadual de Londrina, 2021.

CLARIDGE, Timothy D. W. **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry**. Third Edition, Ed. Elsevier, 2016.

CLORE, G. Marius. Chapter 17: Practical Aspects of Paramagnetic Relaxation Enhancement in Biological Macromolecules. In: QIN, Peter Z.; WARNCKE, Kurt. **Methods in Enzymology**. Academic Press, 2015, v. 564, p.485-497. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.06.032>.

EVANS, Robert. The interpretation of small molecule diffusion coefficients: Quantitative use of diffusion-ordered NMR spectroscopy. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**. v.117, p.33-69, 2020.

GOSSERT, Alvar D.; JAHNKE, Wolfgang. NMR in drug discovery: A practical guide to identification and validation of ligand interacting with biological macromolecules. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v.97, p.82-125, 2016.

KAFARSKI, Pawel; TALMA, Michal. Recent advances in design of new urease inhibitors: a review. **Journal of Advanced Research**. v.13. p.101-112, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.01.007>

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

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>

KRAJEWSKA, Barbara; Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.59; p.9-21, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.01.003>

KONIECZNA, Iwona et al. Bacterial Urease and its Role in Long-Lasting Human Diseases. **Current Protein and Peptide Science**. v.13, p.789-806, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2174/138920312804871094>

MAYER, Moriz; MEYER, Bernd. Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. **Angewandte Chemie International Edition**. v.38, n.12, p.1784-1788, 1999

MAYER, Moriz; MEYER, Bernd. 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**. v.123, p.6108-6117. 2001.

MEYER, Bernd; PETERS, Thomas. NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors. **Angewandte Chemie International Edition**. v.42, n.8, p.864-890, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/anie.200390233>

MODOLO, Luzia V et al. A minireview on what we have learned about urease inhibitors of agricultural interest since mid-2000s. **Journal of Advanced Research**. v.13, p.29-37, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.04.001>

PAGES, G; GILARD, V; MARTINO, R; MALET-MARTINO, M. Pulse-field gradient nuclear magnetic resonance measurement (PFG NMR) for diffusion ordered spectroscopy (DOSY) mapping. **Analyst**. v.142, p.3771-3796, 2017.

ROWE, M. L.; WAGSTAFF, J. L.; HOWARD, M. J. NMR in ligand binding studies. In: FISCHER, J. **Modern NMR Techniques for Synthetic Chemistry**. 1st Ed. Boca Raton: CRC, Press, 2015, p.63-123.

UPADHYAH, Lata Sheo Bachan; Urease Inhibitors: A review. **Indian Journal of Biotechnology**. v.11, p.381-388, 2012.

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** v. 88, n. 7, p. 990–994, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ed101169t>

YAN, Jiangli et al. The effect of relaxation on the epitope mapping by saturation transfer difference NMR. **Journal of Magnetic Resonance**. v.163, p.270-276, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1090-7807\(03\)00106-X](https://doi.org/10.1016/S1090-7807(03)00106-X)