



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANILO HENRIQUE CARLO

**TIOIDANTOÍNAS E HIDANTOÍNAS COMO INIBIDORES DE
UREASE MICROBIANA:
ESTUDO DE INTERAÇÕES RECEPTOR-LIGANTE POR
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

Londrina
2024

DANILO HENRIQUE CARLO

**TIOIDANTOÍNAS E HIDANTOÍNAS COMO INIBIDORES DE
UREASE MICROBIANA:
ESTUDO DE INTERAÇÕES RECEPTOR-LIGANTE POR
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Fernando César de Macedo Júnior

Londrina
2024

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

D186t Carlo, Danilo Henrique .
Tioidantoínas e Hidantoínas como inibidores de Urease microbiana : Estudo de interações receptor-ligante por Ressonância Magnética Nuclear / Danilo Henrique Carlo. - Londrina, 2024.
86 f. : il.

Orientador: Fernando César de Macedo Júnior.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2024.
Inclui bibliografia.

1. Inibidores de Urease - Tese. 2. Urease de *Cryptococcus neoformans* - Tese. 3. Ressonância Magnética Nuclear - Tese. I. Macedo Júnior, Fernando César de . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

DANILO HENRIQUE CARLO

**TIOIDANTOÍNAS E HIDANTOÍNAS COMO INIBIDORES DE
UREASE MICROBIANA:
ESTUDO DE INTERAÇÕES RECEPTOR-LIGANTE POR
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Fernando César de Macedo Júnior
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Maria Ines Rezende
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Sérgio Antonio Fernandes
Universidade Federal de Viçosa

Londrina, 31 de julho de 2024.

A Deus todo poderoso, sem o qual estas páginas estariam em branco.

“Acaso será impotente a mão do Senhor? Verás sem demora se se fará ou não o que eu te disse”.

Números 11:23.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador prof. Dr. Fernando Macedo, pelo aceite da orientação, por todos os ensinamentos, e pela paciência e dedicação em transmitir os conhecimentos que me faltavam.

Aos membros do laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos:

- À professora Dra. Sueli Ogatta, chefe do laboratório, que aceitou iniciar a parceria;

- Ao professor Dr. Eliandro Reis Tavares;

- À Jussevania P. Santos, por toda a ajuda, e o enorme auxílio com os experimentos de liofilização;

- A todos os demais membros do laboratório, que de alguma forma contribuíram com o andamento dos experimentos;

E um agradecimento especial ao doutorando Paulo Henrique Guilherme Borges, com quem os experimentos de cultivo de microrganismo e produção de lisado foram executados. Por toda a parceria desenvolvida durante os anos do projeto, e a prontidão em fornecer materiais de qualidade.

Aos membros da banca, Dr. Sérgio Antonio Fernandes e Dra. Maria Ines Rezende, por todo o conhecimento transmitido, e todas as correções e observações extremamente pertinentes à melhoria do trabalho.

Aos doutores Alexandre Orsato, e Ernani Abicht Basso, pelo aceite em comporem a banca suplente.

Ao professor Dr. Henrique Esteves, pela participação na banca de qualificação.

Às técnicas do laboratório de espectroscopia da UEL, Aline e Nayara, por todo o auxílio durante o uso e a manutenção do espectrômetro de RMN.

À Dra. Priscila Camargo, pela síntese dos ligantes utilizados, pelo auxílio com os experimentos de atividade ureolítica, e por todo o conhecimento compartilhado sobre a linha de pesquisa, que foram de enorme ajuda. Também ao Dr. Ângelo de Fátima, pela síntese dos ligantes.

A Matheus Yoshimitsu, pelo auxílio com os experimentos de PRE.

Aos membros do LASMMED, pelo fornecimento de materiais, e auxílio em experimentos: ao professor Dr. Alexandre Orsato, que forneceu os equipamentos para as diálises; a Gabrielle Callegari, por todo o auxílio nos experimentos de diálise; e a

Anna Heloysa F. Ayala e Mariana Luiza Silva, pelo apoio durante a utilização do laboratório.

Ao professor Dr. Admilton G. Oliveira Junior, e a Maria Luiza A. Nicoletto, do Laboratório de Biotecnologia Microbiana, pelo empréstimo de equipamentos e por todo o auxílio fornecido durante experimentos.

Ao Laboratório de Ecologia Microbiana, chefiado pelo professor Dr. Galdino Andrade Filho, pelo empréstimo de equipamentos.

Ao laboratório de Análise de Materiais e Moléculas, pelo fornecimento do liofilizador, e às técnica Thais K. Diniz e Paula P. Silva.

Aos membros do LPMBA: Fabrício, Giovanna, Matheus, Prof^a. Dra. Anna Paola, por toda a parceria e apoio.

A toda a minha família, por todo o apoio.

À CAPES, pela bolsa concedida, e pelo auxílio financeiro fornecido para o desenvolvimento do projeto.

“Por mais impenetrável que pareça, se você não tentar, então nunca poderá fazê-lo.”

(Andrew Wiles)

“Estou entre aqueles que acreditam que a ciência tem grande beleza. O cientista em seu laboratório não é apenas um técnico: é também uma criança posicionada diante de um fenômeno natural que a impressiona como um conto de fadas.”

(Marie Curie)

RESUMO

CARLO, Danilo Henrique. **Tioidantoínas e Hidantoínas como inibidores de Urease microbiana**: estudo de interações receptor-ligante por ressonância magnética nuclear. 2024. 86 f. Dissertação (mestrado em Química) – Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, 2024.

Ureases são metaloenzimas da classe das hidrolases que possuem um sítio ativo binuclear de Ni(II). Sua função é a catálise da reação de hidrólise da ureia, a qual apresenta implicações importantes em diferentes contextos. No âmbito medicinal, a enzima produzida por microrganismos patogênicos, de origem bacteriana ou fúngica, pode contribuir para a sua sobrevivência e proliferação no tecido infectado, e para o aumento da sua virulência. Por isso, o desenvolvimento de inibidores de urease, e o entendimento dos seus modos de ação são de grande relevância. Neste trabalho, Tioidantoínas e Hidantoínas relatadas como inibidores da urease vegetal de *Canavalia ensiformis* são estudadas como inibidores da urease microbiana presente em lisados de culturas do fungo *Cryptococcus neoformans*. Os resultados de inibição contra a atividade ureolítica presente nestes lisados diferiram do modelo vegetal em vários quesitos: os enantiômeros derivados da L-Valina (**1**) e D-Valina (**2**) foram ativos com a mesma porcentagem de inibição (86%), ao passo que os valores relatados frente à urease vegetal são de 90 e 27%, respectivamente; a Hidantoína derivada da L-metionina (**3**) foi determinada como um fraco inibidor da urease fúngica (14,9%), contrastando com seu alto desempenho contra a vegetal (86%); a inibição da Tioidantoína derivada da L-metionina (**4**, análoga de **3**) com valores similares aos de **1** e **2** (84%), reforça a importância do grupo tiocarbonila para a interação com a enzima. Ensaios de RMN por Diferença de Transferência de Saturação (STD) foram realizados com o lisado bruto a fim de determinar parâmetros de interação intermolecular e cinética de inibição. Os desafios desta abordagem, sobretudo devido à presença de glicerol nos lisados celulares, foram em grande parte superados através de diálise e liofilização. Assim, com mínima manipulação do lisado bruto, obtiveram-se soluções ureolíticas aquosas livres de interferentes de baixo peso molecular. Esses progressos geraram um aumento de 33 vezes na razão sinal/ruído dos espectros de STD, viabilizando a identificação dos sítios dos inibidores envolvidos intimamente com a ligação com a enzima (mapeamento de epítomos). As porcentagens de efeito STD

do ligante **1**, de 100 e 95% para os grupos metila diastereotópicos da cadeia lateral isopropílica, indicaram ausência de estereoespecificidade para a interação. Os ensaios de RMN de *Paramagnetic Relaxation Enhancement* (*PRE*), utilizados pela primeira vez para urease, foram valiosos para o estudo de interação entre urease fúngica e ligante **1**. O efeito paramagnético exercido pelo sítio ativo bimetálico de Ni(II) da enzima sobre o solvente elevou a velocidade de relaxação longitudinal (R_1) da água em $0,3 \text{ s}^{-1}$. A adição do inibidor **1** em concentrações de 1,0 a 3,0 mM reduziu R_1 sucessivamente, restaurando o valor inicial no último ponto de titulação, caracterizando assim a afinidade do ligante pelo sítio ativo. De forma geral, este trabalho demonstra a eficácia da RMN para o estudo de interações de inibidores e ureases microbianas em lisados proteicos de maneira seletiva e confiável.

Palavras-chave: Urease; *Cryptococcus neoformans*; Tioidantoínas; Hidantoínas; inibidores.

ABSTRACT

CARLO, Danilo Henrique. **Thiohydantoins and Hydantoins as inhibitors of microbial Urease**: study of receptor-ligand interactions by nuclear magnetic resonance. 2024. 86 p. Dissertation (Master's degree in Chemistry) – State University of Londrina, 2024.

Ureases are metalloenzymes from the class of hydrolases which bear a Ni(II) binuclear active site. Their function is the catalysis of the urea hydrolysis reaction, which presents important implications in different contexts. In the medicinal scope, the enzyme produced by pathogenic microorganisms, from either bacterial or fungal origin, may contribute to their survival and proliferation on the infected tissue, and to the increase in their virulence. Therefore, the development of urease inhibitors, as well as the understanding of their action modes are of crucial relevance. In the present work, Thiohydantoins and Hydantoins reported as inhibitors of the vegetal urease of *Canavalia ensiformis* are studied as inhibitors of the microbial urease present in lysate cultures of the fungus *Cryptococcus neoformans*. The results of inhibition against the ureolytic activity present on these lysates diverged from the vegetal model in several aspects: the enantiomers derived from L-Valine (**1**) and D-Valine (**2**) were active with the same inhibition percentage (86%), whereas the reported values concerning the vegetal urease are of 90 and 27%, respectively; the Hydantoin derived from L-methionine (**3**) was determined as a weak inhibitor of the fungal urease (14,9%), contrasting from its high performance observed against the vegetal urease (86%); the inhibition of the Thiohydantoin derived from L-methionine (**4**, analogous to **3**) with similar values to those of **1** and **2** (84%), reinforces the importance of the thiocarbonyl group for the enzyme interaction. NMR assays by Saturation Transfer Difference (STD) were applied on the crude lysate with the aim of determining intermolecular interaction and inhibition kinetics parameters. The challenges for this approach, mainly due to the presence of glycerol on the cell lysates, were in great part overcome through dialysis and lyophilization. Thus, with minimal manipulation of the crude lysate, ureolytic aqueous solutions free from low molecular weight interferents were obtained. These progresses generated a 33-fold increase on the signal to noise ratio of the STD spectra, rendering viable the identification of the inhibitor sites intimately involved with the enzyme binding (epitope mapping). The STD effect percentages of ligand **1**, of

100 and 95% for the diastereotopic methyl groups from the isopropyl side chain, were indicative of the absence of stereospecificity for the interaction. The NMR assays of Paramagnetic Relaxation Enhancement (PRE), employed for the very first time for urease, were valuable for the study of interaction between fungal urease and ligand **1**. The paramagnetic effect exerted by the enzyme's bimetallic Ni(II) active site over the solvent lead to an enhancement of water longitudinal relaxation rate (R_1) by 0.3 s^{-1} . The addition of **1** at concentrations ranging from 1,0 to 3,0 mM successively reduced R_1 , restoring the initial value at the last titration point, and thus characterizing the ligand affinity towards the active site. In a general way, this work shows the efficacy of NMR for the study of interactions between inhibitors and microbial ureases on protein lysates in a selective and reliable protocol.

Key-words: Urease; *Cryptococcus neoformans*; Thiohydantoins; Hydantoins; inhibitors.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** – Comparação estrutural entre a urease bacteriana de *Sporosarcina pasteurii* (A) e a urease vegetal de *Canavalia ensiformis* (B)..... 20
- Figura 02** – Estruturas de tioureia (A) e hidroxitioureia (B)..... 24
- Figura 03** – Benzoiltiureias, com respectivas porcentagens de inibição de urease. 25
- Figura 04** – Estrutura geral de Tioidantoínas e Hidantoínas, e porcentagens de inibição (%) frente à UCE de três compostos do trabalho de *Camargo et al.*..... 26
- Figura 05** – Estrutura do híbrido de fenilureia-piridínio..... 27
- Figura 06** – Derivados de nitrotiazolacetamidas conjugadas a tioquinazolinonas..... 27
- Figura 07** – Experimento de NOE-Diff para um composto heterocíclico em solução de metanol-deuterado. Espectro de RMN de referência (A); espectro de NOE-Diff com irradiação do próton 2 (B); espectro de NOE-Diff com irradiação do próton 3..... 32
- Figura 08** – Representação esquemática do experimento de STD, com um ligante em forma de nuvem, e prótons rotulados de 1 a 7. (A) Representação da irradiação da proteína complexada com um ligante; (B) Representação da irradiação da proteína complexada com um ligante; (B) Representação da irradiação em off (-30 ppm); (C) Espectros de referência (*STD-off*) e espectro de STD..... 35
- Figura 09** – Mapeamento de epítomos de Tioidantoínas e Hidantoínas em interação com UCE..... 37
- Figura 10** – Sítio ativo paramagnético da Urease..... 39
- Figura 11** – Aumento exponencial da magnetização longitudinal..... 40
- Figura 12** – Sequência de pulsos do experimento de inversão-recuperação, com a aplicação de valores pequenos e grandes de τ 41
- Figura 13** – Curva padrão de cloreto de amônio..... 50
- Figura 14** – Atividade ureolítica do lisado 01 em função do tempo..... 51
- Figura 15** – Espectros do experimento de STD do ligante **4** com a UCE. Espectro de referência (*off-resonance*) (A) e espectro de STD (B). Parâmetros: [UCE] = 0,02 mM; [4] = 2,00 mM; tampão fosfato (em D₂O), pH 7,4; STD: T_{sat} = 1,5 s; Gauss 1.1000 = 10 ms; Sinc 1.1000 = 2 ms; nº scans = 64.... 55

- Figura 16** – Espectros do experimento de STD do ligante **1** com o lisado ureolítico de *C. neoformans*, (lote 01 - 70,5 U L⁻¹). Espectro de referência (*off-resonance*) (A) e espectro de STD (B). Parâmetros: **[1]** = 2,00 mM; Tsat = 1,5 s; Gauss1.1000 = 10 ms; S Sinc1.1000 = 2 ms; nº scans: 64..... 57
- Figura 17** – Espectros do experimento de STD do ligante **2** com o lisado ureolítico de *C. neoformans*, (lote 01 - 70,5 U L⁻¹). Espectro de referência (*off-resonance*) (A) e espectro de STD (B). Parâmetros: **[2]** = 2,00 mM; Tsat = 1,5 s; Gauss1.1000 = 10 ms; S Sinc1.1000 = 2 ms; nº scans: 64..... 58
- Figura 18** – Espectros do experimento de STD do ligante **4** com o lisado ureolítico de *C. neoformans*, (lote 01 - 70,5 U L⁻¹). Espectro de referência (*off-resonance*) (A) e espectro de STD (B). Parâmetros: **[4]** = 2,00 mM; Tsat = 1,5 s; Gauss1.1000 = 10 ms; S Sinc1.1000 = 2 ms; nº scans: 64..... 59
- Figura 19** – Esquema do procedimento de ultrafiltração..... 62
- Figura 20** – Espectro de RMN de ¹H do lisado bruto (em TLCK 100 µM, EDTA 1 mM, glicerol 10% (v/v) e tampão PBS 8,0% (A), e do retentado em tampão PBS % + glicose 7,4 mM (B), com supressão do sinal de água, e adição do ligante **1** a 2,0 mM..... 64
- Figura 21** – Espectro de RMN de ¹H do retentado 02, em tampão PBS 8% + glicose 7,4 mM, com supressão do sinal de água..... 65
- Figura 22** – Espectros do experimento de STD do ligante **1** com o liofilizado 01 (96,5 U L⁻¹). Espectro de referência (*off-resonance*) (A) e espectro de STD (B). Parâmetros: **[1]** = 2,00 mM; T sat = 1,5 s; Gauss 1.1000 = 10 ms; Sinc 1.1000 = 2 ms; nº scans: 64..... 67
- Figura 23** – Espectros do experimento de STD do ligante **1** com o liofilizado 02 (7,32 U L⁻¹). Espectro de referência (*off-resonance*) (A) e espectro de STD (B). Parâmetros: **[1]** = 2,00 mM; Tsat = 1,5 s; Gauss 1.1000 = 10 ms; Sinc 1.1000 = 2 ms; nº scans: 64..... 68
- Figura 24** – Espectros do experimento de STD do ligante **1** com o liofilizado 02 (7,32 U L⁻¹). Espectro de referência (*off-resonance*) (A) e espectro de STD (B). Parâmetros: **[1]** = 4,00 mM; Tsat = 1,5 s; Gauss 1.1000 = 10 ms; Sinc 1.1000 = 2 ms; nº scans: 64..... 69
- Figura 25** – Mapeamento de epítomos do ligante **1** com o liofilizado 01 (96,5 U L⁻¹). 72
- Figura 26** – Curva de magnetização longitudinal em função do tempo, para determinação de *T*₁ da água em lisado bruto (123,1 U L⁻¹). d1 = 3,0 s.. 73

- Figura 27** – Curva de magnetização longitudinal em função do tempo, para determinação de T_1 da água em lisado bruto ($123,1 \text{ U L}^{-1}$). $d1 = 1,0 \text{ s}$. 74
- Figura 28** – Taxa de relaxação da água no lisado bruto ($123,1 \text{ U L}^{-1}$) (.....), e em solução de controle diamagnético (.....) em função da concentração do ligante **1**. $\text{H}_2\text{O } 70\% / \text{D}_2\text{O } 30\%$ 76
- Figura 29** – Curva de magnetização longitudinal em função do tempo, para determinação de T_1 da água no liofilizado deuterado 2. $\text{D}_2\text{O } 90\% / \text{H}_2\text{O } 10\%$; $7,32 \text{ U L}^{-1}$. $d1 = 45,0 \text{ s}$ 78
- Figura 30** – Taxa de relaxação da água em solução liofilizada deuterada 2 ($7,32 \text{ U L}^{-1}$) em função da concentração do ligante **1**. $\text{D}_2\text{O } 90\% / \text{H}_2\text{O } 10\%$ 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Resultados do ensaio de inibição da UCN contida no lisado 01 (70,5 U L ⁻¹), com ligantes a 0,26 mM, e ureia a 5,26 mM.....	53
Tabela 02 – Efeitos STD para H1 e H2 (ligante 1), sob as duas soluções ureolíticas de liofilizado.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UCE	Urease de <i>Canavalia ensiformis</i>
UCN	Urease de <i>Cryptococcus neoformans</i>
UPV	Urease de <i>Proteus vulgaris</i>
STD	<i>Saturation Transfer Difference</i>
PRE	<i>Paramagnetic Relaxation enhancement</i>
d1	Tempo de espera (<i>delay</i>) de relaxação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	UREASE: FUNÇÃO E ESTRUTURA.....	19
1.2	UREASE: IMPACTO ECONÔMICO, AMBIENTAL E MEDICINAL.....	23
1.3	INIBIDORES DE UREASE.....	24
1.4	DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE E PERFIL INIBITÓRIO: O MÉTODO DO INDOFENOL...	28
1.5	TÉCNICAS DE OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UREASES.....	29
1.6	ESTUDOS DE INTERAÇÃO LIGANTE-PROTEÍNA POR RMN.....	31
1.6.1	Diferença de Transferência de Saturação.....	31
1.6.2	Paramagnetic Relaxation Enhancement.....	37
1.6.3	Relaxação Longitudinal, e Experimento de Inversão-Recuperação.....	39
2	OBJETIVOS	42
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	42
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
3	PARTE EXPERIMENTAL	43
3.1	OBTENÇÃO DO LISADO DE <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>	43
3.1.1	Crescimento do fungo.....	43
3.1.2	Produção do lisado.....	43
3.2	MEDIDA DA ATIVIDADE UREOLÍTICA DO LISADO.....	43
3.3	CURVA PADRÃO DE CLORETO DE AMÔNIO.....	44
3.4	ENSAIO DE INIBIÇÃO.....	44
3.5	PURIFICAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA.....	45
3.5.1	Ultra-Filtração.....	45
3.5.2	Diálise.....	46
3.5.3	Liofilização.....	46
3.6	ENSAIOS DE STD.....	46
3.6.1	Preparo de Amostras.....	46
3.6.2	Configurações gerais dos experimentos de STD.....	47
3.7	ENSAIOS DE PRE.....	48
3.7.1	Preparo de amostras.....	48
3.7.2	Experimento de inversão-recuperação.....	48

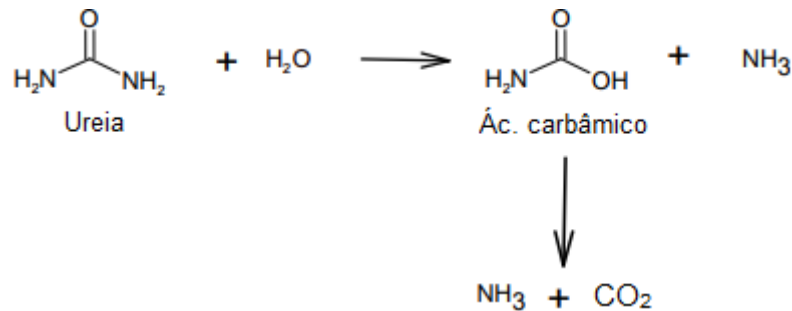
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1	OBTENÇÃO DO LISADO FÚNGICO E MONITORAÇÃO DA ATIVIDADE UREOLÍTICA.....	50
4.2	ATIVIDADE INIBITÓRIA DOS LIGANTES CONTRA UREASE DE <i>CRYPTOCOCCUS</i>	52
4.3	MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS DO LIGANTE 4 COM A UCE.....	55
4.4	ESTUDOS DE INTERAÇÃO POR STD PARA O LISADO MICROBIANO.....	56
4.5	PURIFICAÇÃO PARCIAL DA UREASE DE <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>	61
4.5.1	Ultra-filtração.....	61
4.5.2	Diálise/Liofilização.....	62
4.5.2.1	Diálise/Liofilização 01.....	63
4.5.2.2	Diálise/Liofilização 02.....	65
4.6	MONITORAÇÃO DA ATIVIDADE UREOLÍTICA DO LIOFILIZADO DEUTERADO.....	66
4.7	ESPECTROS DE STD PARA AS SOLUÇÕES LIOFILIZADAS DEUTERADAS.....	66
4.8	ENSAIO DE PRE COM O LISADO BRUTO.....	72
4.9	ENSAIO DE PRE COM A SOLUÇÃO LIOFILIZADA DEUTERADA.....	77
5	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 UREASE – FUNÇÃO E ESTRUTURA

As ureases (ureia amidohidrolase) são enzimas produzidas por organismos vegetais, bacterianos e fúngicos, mas não por animais,⁰¹ cuja função é a catálise da hidrólise da ureia, seu substrato natural. Na reação em questão, são produzidos amônia e ácido carbâmico, sendo este último instável, e decompondo-se em dióxido de carbono e uma molécula adicional de amônia (Esquema 01).⁰² A presença de urease aumenta a taxa da reação em 10^{14} vezes.⁰²

Esquema 01 – Hidrólise da ureia



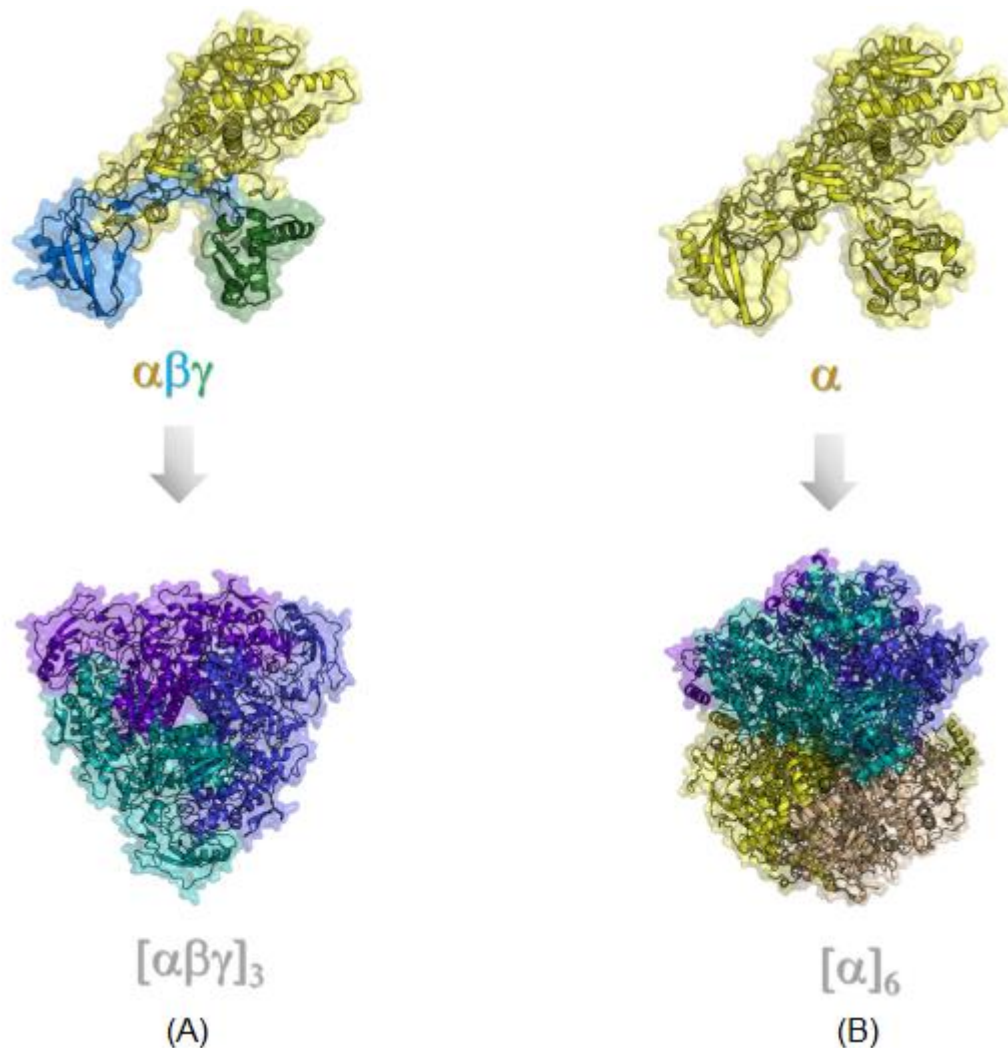
Fonte: adaptado da referência 02.

Os papéis desempenhados pela urease nos diversos meios biológicos em que a enzima se faz presente são variados, podendo ou não estar relacionados à sua ação catalítica. Sabe-se que o nitrogênio, de extrema importância para o crescimento de plantas, é por elas assimilado de forma eficiente graças à ação da urease, que permite a reciclagem deste nutriente através da catálise da ureia.⁰³ Porém, algumas funções já relatadas para a enzima demonstraram-se independentes de sua ação catalítica. Dentre estas, destaca-se a atividade inseticida, observada mesmo após a inativação da atividade ureolítica por inibidores fortes.⁰⁴

Estudos estruturais de ureases de diferentes organismos vivos indicam elevados graus de similaridade em suas sequências primárias de aminoácidos, provavelmente devido a um ancestral em comum.⁰⁵ Contudo, as unidades funcionais variam de uma enzima a outra, com relação ao número de cadeias polipeptídicas (subunidades). Ureases bacterianas, por exemplo, apresentam até três diferentes tipos de subunidades (α , β e γ).⁰⁶ Já as vegetais constituem-se de uma única

subunidade covalente (α).⁰⁶ Consequentemente, as estruturas finais que resultam da fusão de duas ou mais unidades funcionais são distintas para as diferentes versões de urease. Nas vegetais, a estrutura mais comum resulta da fusão de três unidades α , originando um trímero, que então se dimeriza em uma estrutura final hexamérica.⁰⁶ Para as bacterianas, o arranjo mais comum é composto de um trímero da unidade $\alpha\beta\gamma$ (Figura 01).

Figura 01 – Comparação estrutural entre a urease bacteriana de *Sporosarcina pasteurii* (A) e a urease vegetal de *Canavalia ensiformis* (B)



Fonte: adaptado da referência 06.

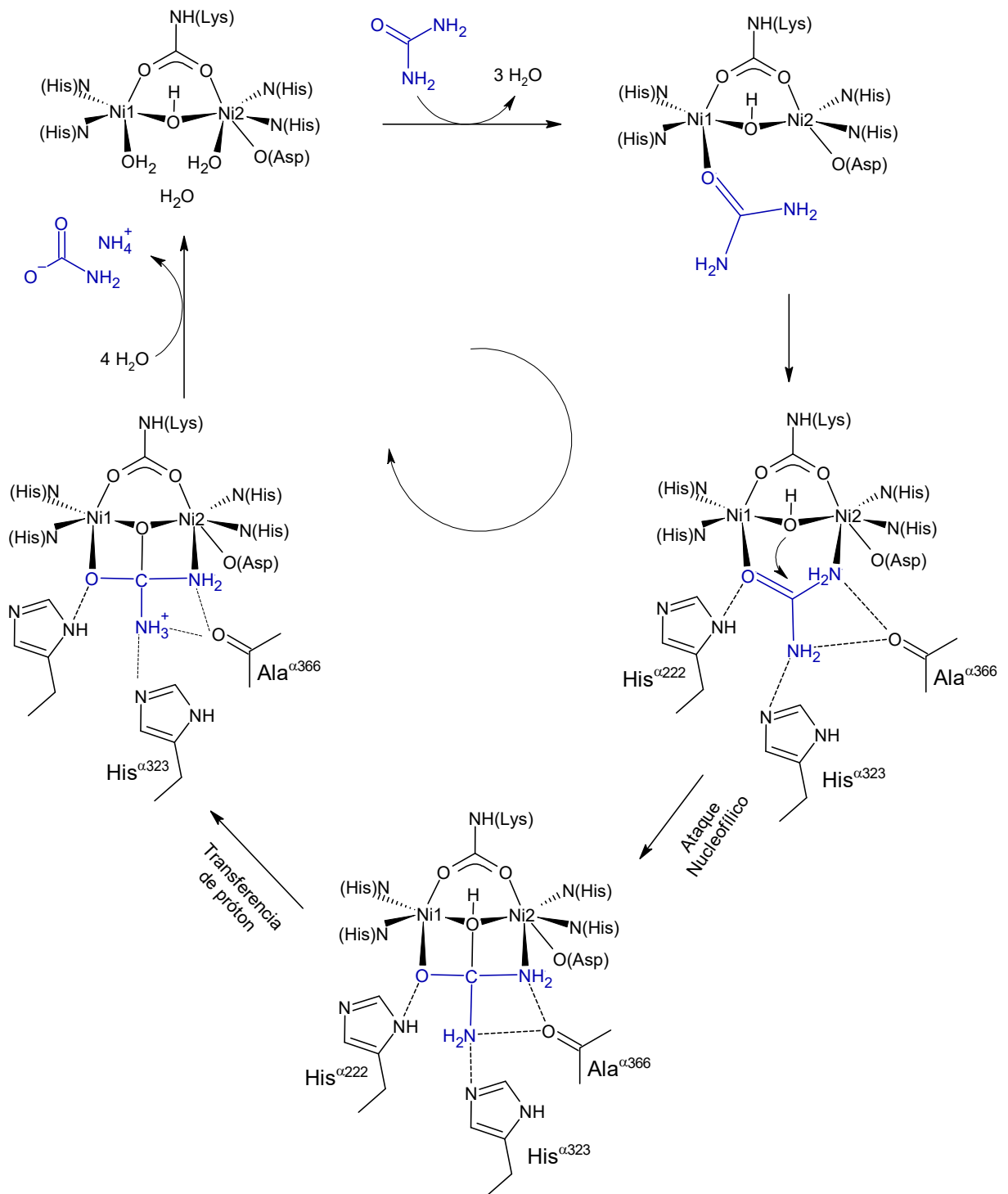
A urease vegetal de *Canavalia ensiformis* (UCE) foi a primeira enzima cristalizada, em 1926.⁰⁴ Já a primeira urease a ter sua estrutura cristalográfica determinada foi a da espécie bacteriana *Klebsiella aerogenes*, em 1995. Nos anos

posteriores, o mesmo foi alcançado para as ureases de *Bacillus pasteurii*, *Helicobacter pylori* e *Canavalia ensiformis*.⁰⁴

A urease fúngica de *Cryptococcus neoformans* (UCN) teve apenas sua estrutura primária determinada, a qual apresenta um total de 832 aminoácidos, e grande similaridade com ureases de outras fontes, como as de *H. pylori* e *Coccidioides immitis*.⁰⁷

Uma característica comum a praticamente todas as ureases é a presença de dois íons Ni(II) no sítio ativo. Essa particularidade, que a distingue de todas as demais metalohidrolases, é essencial para a atividade catalítica da urease, pois uma das propostas de mecanismos mais aceitas para o mecanismo de catálise tem início com a coordenação dos grupos C=O e NH₂ da ureia com cada um dos íons Ni(II)⁰⁶ (Esquema 02):

Esquema 02 – Mecanismo proposto para a catálise da hidrólise da ureia pela urease



Fonte: adaptado da referência 10.

A despeito da ancestralidade comum, e das similaridades estruturais citadas, ureases de fontes distintas podem apresentar propriedades altamente divergentes. A exemplo da atividade inseticida já mencionada, a qual estudos mostraram se tratar de

característica exclusiva de ureases vegetais.⁰⁸ De forma geral, essas discrepâncias funcionais são não-catalíticas, podendo ser atribuídas, portanto, a sítios diferentes do ativo, comumente denominados alostéricos.

1.2 UREASE: IMPACTO ECONÔMICO, AMBIENTAL E MEDICINAL

Se por um lado, a ação enzimática da urease desempenha papéis essenciais para a manutenção de seus organismos produtores, por outro, pode gerar diversos efeitos nocivos ao ambiente que os contêm. Em contextos agrícolas, por exemplo, pode ser citado o uso de fertilizantes a base de ureia como fonte alternativa de nitrogênio a plantações. Em contato com a urease presente no solo, consideráveis quantidades de amônia são liberadas, levando à contaminação do ambiente com este gás tóxico, bem como à redução na eficácia do fertilizante.⁰¹ Já no campo medicinal, a urease é reconhecidamente um potente fator de virulência de vários microrganismos patogênicos. Por diferentes mecanismos, a enzima influencia a resistência de microrganismos ureolíticos, sobretudo pela produção de amônia (Esquema 01). Essa molécula pode, por exemplo, induzir elevações de pH em órgãos e tecidos naturalmente ácidos, favorecendo a sobrevivência de bactérias.⁰¹ É este o caso da *Helicobacter pylori*, que se vale da urease como um mecanismo de defesa, ocupando o microambiente circunvizinho alcalinizado devido ao acúmulo de amônia, e abrigando-se assim das condições extremamente ácidas do estômago quando em ausência da enzima.⁰²

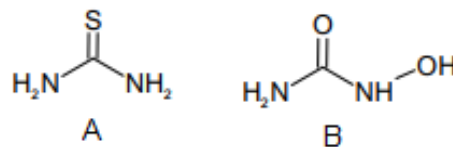
A criptococose é uma doença que bem exemplifica o dano da urease aos indivíduos infectados. Transmitida pela inalação de esporos do fungo *Cryptococcus neoformans*, a enfermidade atinge, em primeira instância, os pulmões. A urease produzida pelo fungo age sobre a ureia presente no organismo do paciente, e a amônia resultante exerce um forte efeito tóxico nos órgãos, causando, por exemplo, danos à barreira hematoencefálica. Dessa forma, libera-se a passagem do fungo para o sistema nervoso central, e a infecção inicialmente pulmonar evolui para um quadro de meningite criptocócica.⁰⁹

Por isso, o desenvolvimento de inibidores de urease é de grande importância nos diferentes contextos citados, compondo um amplo tema na literatura química.

1.3 INIBIDORES DE UREASE

Os inibidores de urease podem ser divididos em duas classificações principais, com relação às suas estruturas e modos de inibição. Inibidores do tipo substrato apresentam semelhança estrutural com o substrato natural da enzima (ureia), e interagem assim de forma similar a este. Portanto, constituem-se como ligantes que agem diretamente no sítio ativo, onde podem interagir com os dois íons Ni(II), inibindo a catálise sobre a ureia.¹⁰ São assim, em sua maioria, classificados como competitivos, no sentido de bloquearem o acesso do substrato ao sítio de interação (ativo) com a enzima, além de reversíveis. Exemplos de inibidores deste tipo são tioureia e hidroxitioureia (Figura 02).¹⁰

Figura 02 – Estruturas de tioureia (A) e hidroxitioureia (B)



Fonte: o próprio autor.

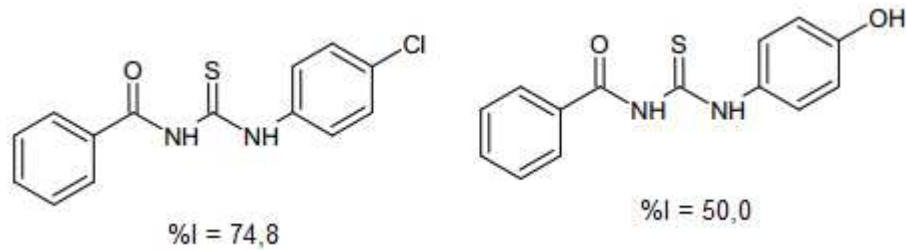
Já inibidores do tipo não-substrato não apresentam semelhança estrutural com a ureia, e realizam interações, majoritariamente, com regiões distintas ao sítio ativo da enzima, mas que desempenhem alguma função para a manutenção da sua atividade, os chamados sítios alostéricos. Essa classe de inibidores é, portanto, incompetitiva, e sua ação em sítios alostéricos interfere no mecanismo de catálise da enzima, levando à inativação da atividade frente à ureia. Diferente dos competitivos, esses inibidores formam complexos irreversíveis com a enzima.¹¹

Ainda outra classe de inibidores é a de tipo misto, cujos ligantes não apresentam seletividade quanto à interação pelo sítio ativo ou alostérico, podendo assim se ligar tanto à enzima livre, como ao complexo urease-ureia. Um exemplo é o fosfato de *N*-(*n*-butil)triamida, inibidor amplamente empregado na agricultura como aditivo em formulações de fertilizantes a base de ureia.¹²

A maioria dos estudos de triagem de inibidores empregam a urease de *Canavalia ensiformis* (UCE) nos ensaios, pois se trata da enzima mais disponível comercialmente.

Brito *et al.* (2015)¹³ estudaram compostos da classe de benzoiltiureias como inibidores da UCE. Na Figura 03, são mostrados os compostos mais ativos.

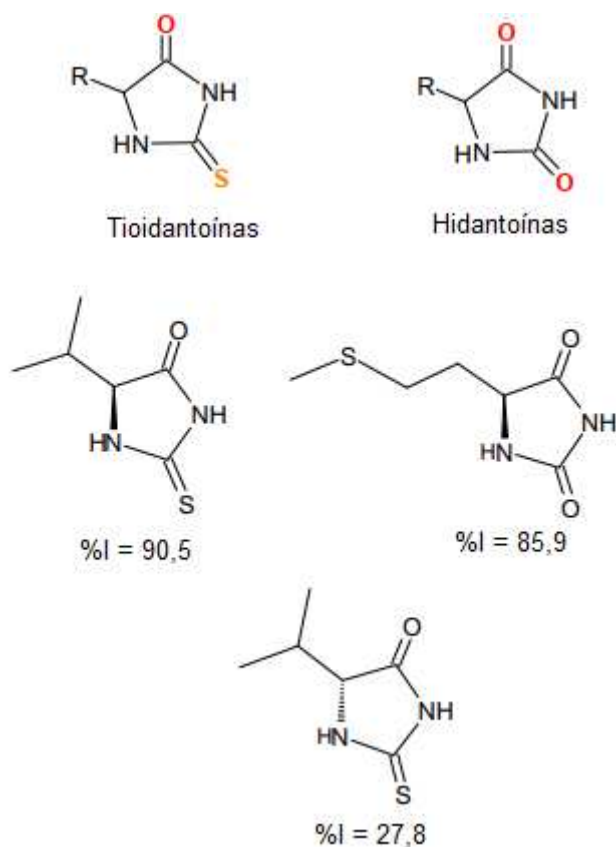
Figura 03 – Benzoiltiureias, com respectivas porcentagens de inibição de urease (%I)



Fonte: adaptado da referência 13.

As classes de Tioidantoínas e Hidantoínas (Figura 04) foram recentemente avaliadas por Camargo *et al*¹⁴ como inibidores da urease vegetal de *Canavalia ensiformis* (UCE), testando-se diferentes cadeias laterais. Na Figura 04, são mostradas a Hidantoína e a Tioidantoína (e seu enantiômero menos ativo) mais ativas da série estudada:

Figura 04 – Estrutura geral de Tioidantoínas e Hidantoínas, e porcentagens de inibição (%I) frente à UCE de três compostos do trabalho de *Camargo et al.*

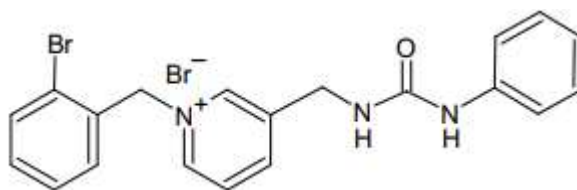


Fonte: adaptado da referência 14.

Como mostra a Figura 04, determinou-se que a interação com o sítio ativo da UCE é estereoespecífica para determinados ligantes, já que o enantiômero da Tioidantoína mais ativa apresentou atividade consideravelmente inferior.

Constam na literatura, contudo, exemplos de estudos que avaliaram a inibição contra ureases de fontes alternativas. Sadat-Ebrahimi *et al.*¹⁵ avaliaram a atividade ureolítica de um híbrido de fenilureia-piridina (Figura 05), o qual apresentou alta inibição contra ambas as ureases de *Canavalia ensiformis* ($IC_{50} = 4,50 \mu M$) e de *Cryptococcus neoformans* ($IC_{50} = 143,2 \mu g mL^{-1}$), de acordo com o método colorimétrico do Indofenol.

Figura 05 – Estrutura do híbrido de fenilureia-piridínio

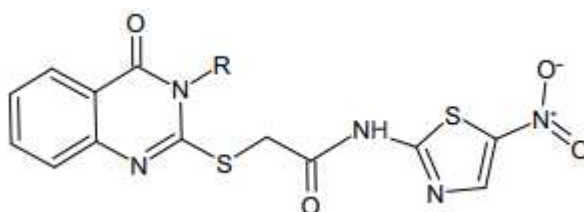


Fonte: adaptado da referência 15.

Como discutido no item 1.1, certas propriedades são restritas a ureases de determinadas fontes.⁰⁸ Essa disparidade entre a família de ureases se estende ao campo de sua inibição. São diversos os estudos a comprovarem que uma mesma molécula inibidora pode apresentar diferentes, ou mesmo opostos, perfis de inibição ao se comparar sua ação contra ureases nativas de fontes desiguais. Este comportamento tende a ser mais intenso em inibidores do tipo incompetitivo, que agem em sítios alostéricos que, inversamente ao sítio ativo, retêm pouca similaridade entre ureases.⁰²

Sohrabi *et al.*¹⁶, por exemplo, estudaram a atividade anti-ureolítica de uma série de derivados de nitrotiazolacetamidas conjugadas a diferentes tioquinazolinonas (Figura 06). Nos ensaios, foram utilizadas a urease de *C. neoformans* (UCN), e a urease bacteriana de *Proteus vulgaris* (UPV). Os resultados obtidos indicaram que alguns dos compostos apresentam inibição seletiva contra as enzimas advindas das diferentes fontes, alguns dos quais demonstrando seletiva inibição contra a UCN, enquanto baixa ou negligível contra a UPV.

Figura 06 – Derivados de nitrotiazolacetamidas conjugadas a tioquinazolinonas

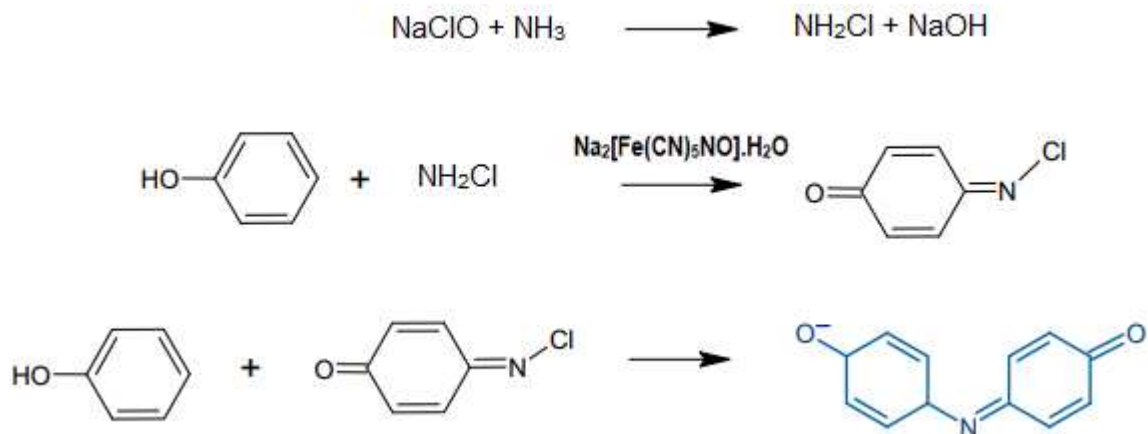


Fonte: adaptado da referência 16.

1.4 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE E PERFIL INIBITÓRIO: O MÉTODO DO INDOFENOL

Na maioria dos estudos de inibidores de urease, emprega-se o método colorimétrico do Indofenol para a determinação da extensão da inibição. Desenvolvido pela primeira vez em 1967¹⁷, para a determinação de amônia, esse método consiste em uma sequência reacional que se inicia com a reação entre amônia e hipoclorito de sódio, e termina com a formação de um composto de coloração azul (azul de indofenol), o qual, se observado, é considerado um resultado positivo para a presença de amônia. Indiretamente, o teste é positivo para a presença de urease no meio reacional, indicando a catálise desta sobre a hidrólise da ureia adicionada (Esquema 03).

Esquema 03 – Sequência reacional do método do Indofenol



Fonte: adaptado da referência 18.

No ensaio de inibição, avalia-se a inibição do ligante sobre a formação do composto azul e, conseqüentemente, sobre a ação da urease.

A análise quantitativa do método é feita com base na medida da absorbância (a 630 nm) de uma solução de urease contendo o inibidor e os reagentes necessários à sequência reacional (Esquema 03). A coloração do composto azul e, conseqüentemente, a absorbância, são diminuídas conforme a extensão da inibição. Determina-se uma porcentagem de inibição relacionando-se a absorbância de um controle (solução sem inibidor) com a solução de análise.

1.5. TÉCNICAS DE OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UREASES

Tendo sido a primeira urease purificada, a grande maioria das utilizações da enzima para fins comerciais e acadêmicos emprega a urease de *C. ensiformis*, de alta disponibilidade comercial. Porém, autores que trabalham com ureases microbianas podem acessar as enzimas por diferentes métodos. Estratégias usualmente relatadas envolvem a utilização direta dos microrganismos ureolíticos, por vezes sem qualquer extração ou purificação.^{15,16} Como os ensaios de inibição são geralmente realizados por meio do método do Indofenol, ou outros métodos colorimétricos seletivos para a detecção da atividade ureolítica sobre a ureia, a não-purificação da enzima geralmente não representa um empecilho para as análises.

Outro método comumente empregado é a produção de lisados ureolíticos.¹⁹ O procedimento usual tem início com o cultivo dos microrganismos. Os meios de cultivo empregados são variados, porém normalmente compostos por fontes de carbono e nitrogênio, minerais, e outros agentes indutores de crescimento.¹⁹ Para a cultura de fungos, por exemplo, tal como *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, um dos meios mais utilizados é o Sabouraud agar dextrose, composto classicamente de dextrose, peptona e agar.¹⁹ Além deste, o meio mínimo, composto de glicose e sais variados, também possibilitou ótimos rendimentos de cultivo fúngico.²⁰ Uma vez iniciado o cultivo, determinadas espécies de microrganismos produzem a urease espontaneamente. Outros, por sua vez, apenas o fazem na presença do substrato, requerendo assim a adição de certa proporção de ureia ao meio de cultivo. Ainda um terceiro tipo de demanda diz respeito aos microrganismos que somente produzem a enzima em condições de escassez de nitrogênio.²¹

Após a etapa de cultivo, diferentes métodos podem ser utilizados para o acesso à urease produzida pelo microrganismo. O chamado *pellet* celular, que consiste no conjunto de células íntegras produzidas durante o cultivo, é suspenso em soluções aquosas tamponadas adequadas para a extração, e para a liberação das proteínas do interior da célula, é submetido ao processo de lise.²² A lise se refere à destruição celular, como resultado do rompimento da parede celular.²² Esse evento pode ser induzido por diferentes metodologias e, uma vez atingido, ocasiona a liberação do conteúdo celular, incluindo ácidos nucleicos, proteínas e metabólitos. Uma das estratégias mais amplamente empregadas para o procedimento de lise consiste na mera agitação mecânica da solução contendo os *pellets* celulares, com o auxílio de

pérolas de vidro e aparelhos de vortexação.²² A perturbação mecânica gerada é geralmente suficiente para induzir o rompimento da membrana, e liberação do conteúdo proteico na solução, que recebe o nome de “lisado”.²² A eliminação de componentes indesejados da solução é obtida por meio de centrifugação, após a qual obtêm-se o lisado purificado como sobrenadante, e um precipitado contendo resquícios celulares, sendo este descartado.²³

Embora estas estratégias de acesso à urease sejam geralmente suficientes para ensaios de inibição, algumas técnicas mais complexas de análise da enzima requerem etapas extras de purificação, tais como diálise, ultrafiltração, ou ainda procedimentos cromatográficos.

A diálise emprega uma membrana semipermeável, de variadas faixas de corte baseadas nos pesos moleculares, que retém macromoléculas em seu interior, enquanto permite a passagem de moléculas pequenas.²⁴ Dessa forma, a aplicação da técnica a soluções de extratos proteicos brutos permite a separação entre a proteína de interesse e os componentes de menores pesos moleculares presentes no lisado, que possam representar interferências indesejadas em análises do lisado bruto.

A técnica de ultrafiltração também é baseada em uma membrana de exclusão de tamanho, sendo efetiva tanto para a eliminação de componentes interferentes dos tampões da amostra bruta, como de proteínas menores indesejadas.²⁵ A membrana que compõe o sistema de ultrafiltro retém as macromoléculas de peso molecular superior à faixa de corte, ao passo que mantém livre a passagem de solvente e solutos inferiores à mesma.²⁵ A separação é induzida pela aplicação de pressão, geralmente obtida pela centrifugação do filtro contendo a amostra. Considerando-se que os pesos moleculares determinados para diferentes ureases é, de forma geral, sempre superior a 90 KDa, ultrafiltros com faixas de corte de 10, 30 e 50 KDa são geralmente empregados.^{26, 27}

A diálise e ultrafiltração são normalmente empregadas, para fins de purificação de ureases, como uma etapa intermediária entre os tratamentos dos extratos com colunas cromatográficas, para a troca ou reestabelecimento de tampões.²⁶

1.6 ESTUDOS DE INTERAÇÃO LIGANTE-PROTEÍNA POR RMN

A ressonância magnética nuclear é uma ferramenta poderosa na descoberta de fármacos. O princípio básico das técnicas de RMN empregadas para tal fim é a detecção da interação entre uma molécula pequena (ligante) com, principalmente, uma macromolécula biológica de interesse (proteínas e ácidos nucleicos).²⁸

Os experimentos de RMN utilizados para o estudo de interações de ligante e proteína são geralmente divididos em duas principais classificações: estudos baseados no ligante, nos quais monitoram-se as perturbações nas ressonâncias do ligante como resultado da interação; e os estudos baseados na proteína, em que o objeto de análise são as ressonâncias da proteína antes e após a complexação com o ligante. A maior parte dos estudos utilizam as técnicas baseadas no ligante, devido a menor complexidade, e maior facilidade de análise dos sinais de RMN.²⁹

Ainda outro tipo de abordagem emprega uma terceira molécula, denominada de molécula sonda. A análise desta espécie, externa à interação proteína-ligante, é feita na presença da proteína, e na ausência e presença do inibidor, de modo a se detectar perturbações no sinal da molécula sonda, que indiquem seu deslocamento de determinado sítio de interação da proteína devido à competição com ligante que interaja com a mesma região.³⁰

1.6.1 Diferença de Transferência de Saturação

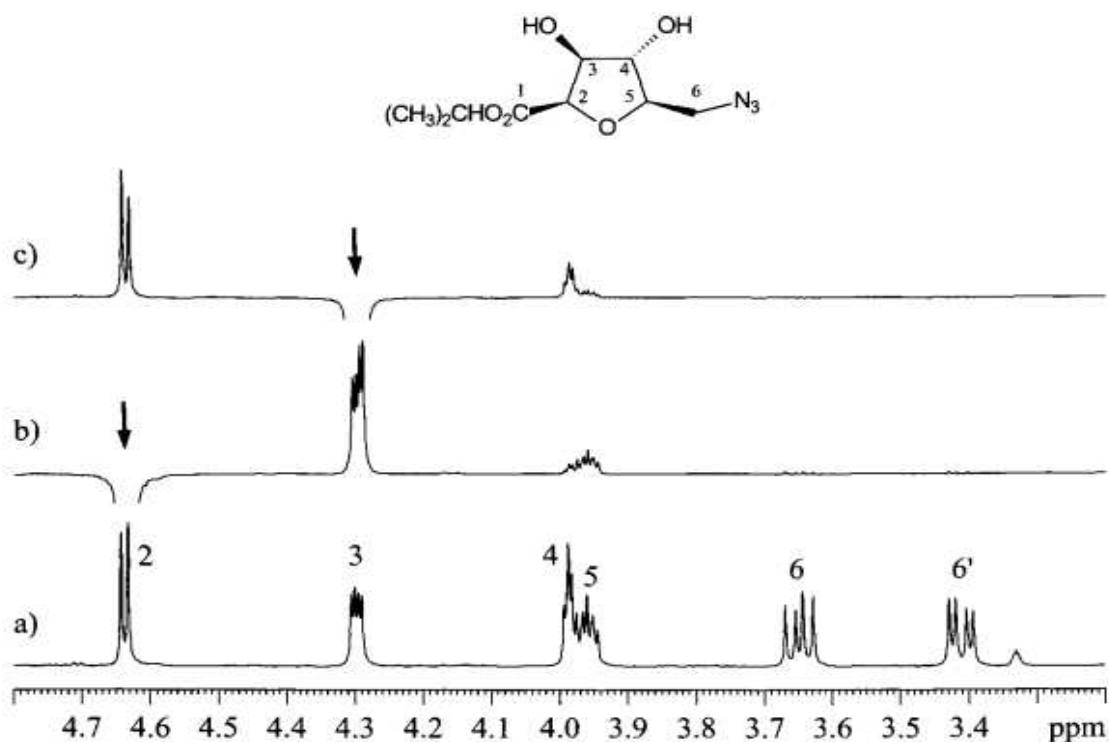
A técnica de RMN de Diferença de Transferência de Saturação, geralmente referida pela sigla STD (do inglês *Saturation Transfer Difference*), desenvolvida em 1999, é uma das técnicas de RMN mais amplamente empregadas no desenvolvimento de fármacos baseada no ligante.²⁸

A STD permite a detecção e a quantificação de moléculas com alvos biomoleculares, particularmente proteínas e ácidos nucleicos. O princípio da técnica tem como base o Efeito Nuclear Overhauser (NOE). O NOE pode ser entendido como a alteração na intensidade de ressonância de um núcleo atômico magneticamente ativo, como resultado da perturbação no estado de equilíbrio de outro núcleo espacialmente próximo a este. Essa perturbação pode ser atingida através da irradiação seletiva de uma ressonância de interesse, que leva à sua saturação

(equalização dos estados de spin mais e menos energéticos, β e α , respectivamente).²⁹

A Figura 07 ilustra o efeito NOE sobre os sinais de RMN de ^1H de uma molécula, em um experimento conhecido com NOE-Diff:

Figura 07 – Experimento de NOE-Diff para um composto heterocíclico em solução de metanol-deuterado. Espectro de RMN de referência (A); espectro de NOE-Diff com irradiação do próton 2 (B); espectro de NOE-Diff com irradiação do próton 3 (C)



Fonte: adaptado da referência 29.

Nota-se que apenas os prótons espacialmente próximos ao próton cuja ressonância foi irradiada apresentam variações de intensidade em suas ressonâncias (neste caso, intensidades aumentadas ou NOE positivo) de forma que somente tais prótons apresentam sinais no espectro de NOE-Diff. Os sinais ausentes indicam que não há proximidade dos prótons em questão com o próton cuja ressonância foi irradiada.

A distância internuclear entre dois spins, o suficiente para a detecção do efeito NOE, geralmente é inferior a 5 Å, e diz-se que os núcleos em questão compartilham acoplamento dipolar.³¹

O princípio do experimento de STD é bastante similar ao de NOE-Diff. O pulso de irradiação usado para a saturação é o principal ponto de diferença entre as duas técnicas, com relação tanto à natureza do pulso como ao alvo de irradiação. O pulso de STD é seletivamente moldado para saturar ressonâncias de ^1H específicas da proteína, em regiões espectrais nas quais não ocorram sinais do ligante.^{28, 32} A saturação de apenas alguns sítios específicos permite, em pouco tempo, que se obtenha a saturação de todo o arcabouço de prótons da proteína, devido a processos de difusão de spin, responsáveis por transferir a saturação de um ponto a outro da macromolécula irradiada, incluindo-se possíveis sítios de interação com o ligante. Moléculas com alto peso molecular, como é o caso das proteínas, realizam a difusão de spin de forma muito eficiente, de tal modo que ao se irradiar um único sítio de prótons, atinge-se a saturação total da macromolécula em um período de 50 a 200 ms.³²

Um ligante que interaja reversivelmente com a proteína, estabelecendo-se um equilíbrio entre complexo proteína-ligante e ligante livre, irá receber parte da saturação da macromolécula como resultado do efeito NOE. A reversibilidade da ligação com a proteína é um requisito para que um ligante possa ser analisado pela técnica de STD.^{28, 32} Durante a forma complexada, o ligante se comporta como o receptor biológico ao qual está ligado, o que leva a uma grande diminuição em seu tempo de relaxação transversal (T_2) e, conseqüentemente, na intensidade de suas ressonâncias. São detectadas apenas as ressonâncias intensas da molécula ligante na sua forma livre que, mesmo após sua dissociação, carrega para a solução a saturação recebida durante a interação, apresentando sinais com intensidade reduzida (efeito NOE negativo, característico de macromoléculas ou complexos supramoleculares de alto peso molecular).^{28, 32} O espectro que resulta da irradiação da proteína e conseqüente perturbação da ressonância do ligante é chamado de *on-resonance* (STD-*on*).

A cinética de ligação com a proteína pode ser descrita pela taxa de associação (k_{on}), e a de dissociação (k_{off}). k_{on} segue uma cinética de segunda ordem, e depende do número de colisões com a proteína, do qual apenas uma fração se dá de forma estericamente favorável para a formação do complexo ligante-proteína.³³

A constante de dissociação (k_{off}) reflete o período de permanência do ligante no receptor enzimático, indicando assim a duração do complexo. A associação e dissociação estabelecem um equilíbrio, de forma que se tem uma população

constante de complexo em solução. A posição do equilíbrio pode ser representada pela constante de dissociação termodinâmica (K_D) (Equação 01):

$$K_D = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (01)$$

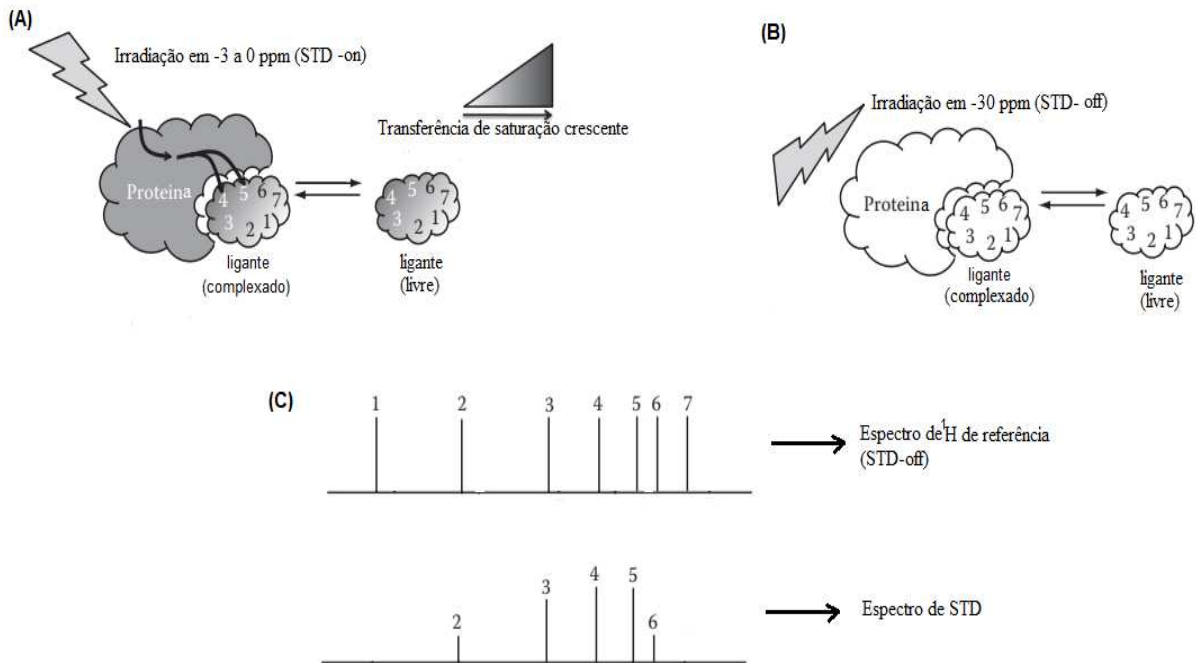
Em que: [P] = concentração da proteína; [L] = concentração do ligante; [PL] = concentração do complexo proteína-ligante; k_{off} = taxa de dissociação; k_{on} = taxa de associação.³³

A faixa de K_D para que um ligante possa ser detectado pela técnica é da ordem de nM a mM.³² No caso de complexos com fraca interação, de K_D superior à ordem de mM, a probabilidade de o ligante ocupar o sítio de interação se torna baixa, reduzindo-se a intensidade do sinal de STD abaixo do limite de detecção. Por outro lado, para ligantes que apresentem interação muito forte com a proteína, com K_D inferior à ordem de nM, a proporção de moléculas livres dissociadas no momento da detecção torna-se muito baixa, de forma que o efeito da saturação nas ressonâncias do ligante livre torna-se indetectável.^{32, 33}

No experimento de STD, um segundo espectro, denominado de *off-resonance* (STD-*off*) é adquirido com a excitação seletiva dirigida a uma região espectral que não contenha ressonâncias de ^1H da proteína e nem do ligante, geralmente na faixa de -25 a -30 ppm. Esse espectro controle é essencialmente um espectro de ^1H da solução em análise.²⁸

A subtração entre os espectros STD-*on* e STD-*off* resulta no espectro de STD, no qual serão observados somente os sinais referentes aos prótons do ligante que tiveram suas ressonâncias atenuadas pelo efeito de transferência de saturação, cancelando-se os sinais de prótons que não apresentam interação, como exemplificado na Figura 08:

Figura 08 – Representação esquemática do experimento de STD, com um ligante em forma de nuvem, e prótons rotulados de 1 a 7. (A) Representação da irradiação da proteína complexada com um ligante; (B) Representação da irradiação em off (-30 ppm); (C) Espectros de referência (*STD-off*) e espectro de STD



Fonte: adaptado da referência 28.

Como mostra a Figura 08, a transferência de saturação da proteína para o ligante é proporcional à distância de cada próton ao sítio de interação, de forma que as ressonâncias que apresentarem sinais de STD mais intensos indicarão que os prótons em questão estão mais próximos da proteína do que os demais. Com isso, a STD torna possível não apenas a determinação dos sítios do ligante com maior proximidade do alvo biológico, indicando assim os sítios de interação mais prováveis, como também a discriminação entre os sítios mais e menos interativos.³² Esse procedimento, que recebe o nome de mapeamento de epítomos, é melhor realizado através do parâmetro “Fator de Amplificação” (A_{STD}) (Equação 02):

$$A_{STD} = \frac{I_{STD}}{I_0} \times \left[\frac{L_E}{P} \right] \quad (02)$$

Em que I_{STD} é a intensidade STD de determinado próton, I_0 é sua intensidade de referência (STD-off), e $[L/P]$ é a razão da concentração em excesso do ligante pela da proteína.

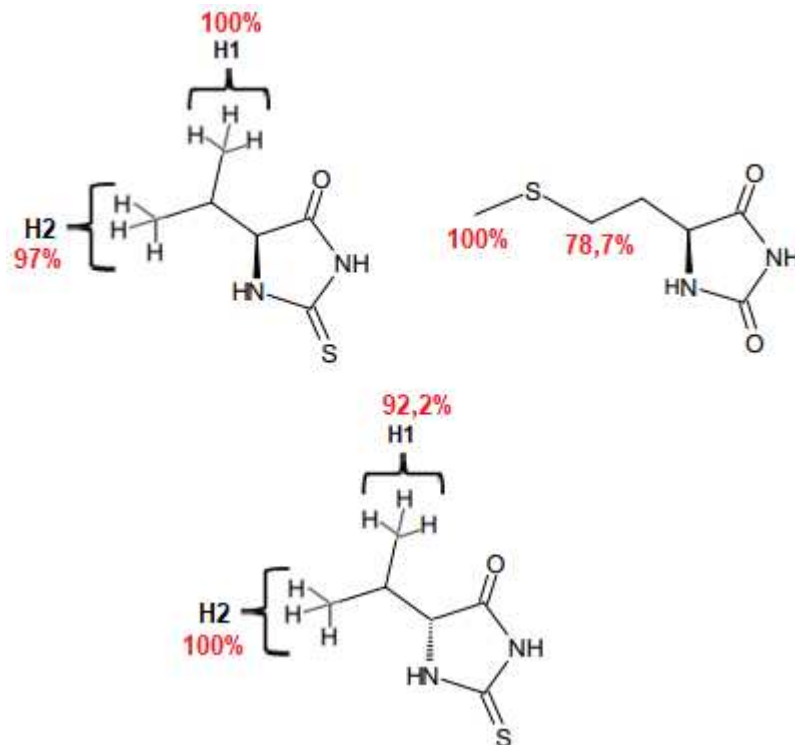
Para a apresentação dos resultados, geralmente define-se a intensidade do sinal com maior efeito de amplificação em 100%, e calcula-se com base neste a porcentagem dos sinais de amplificação menor.

O mapeamento de epítomos pode ser realizado somente para ligantes que apresentem taxas de dissociação (k_{off}) rápidas, correspondentes a K_D da ordem de 0,1 μ M ou mais. Ligações mais fortes do que isso levam a grandes diminuições em k_{off} , de forma que o ligante ocupa um período demasiado elevado no sítio de interação, durante o qual o fenômeno de difusão de spin iguala a saturação transferida em todo o conjunto de prótons da molécula ligante. Assim, impossibilita-se a discriminação do efeito NOE nas ressonâncias individuais de cada próton e, conseqüentemente, o mapeamento de epítomos, já que as intensidades dos sinais de STD deixam de indicar a proximidade relativa ao sítio de interação.³²

A intensidade dos sinais de STD está relacionada, entre outros fatores, com o tempo de saturação e a proporção de ligante. Maiores tempos de irradiação possibilitam a saturação de uma quantidade maior de moléculas do ligante, quando em excesso com relação à proteína. Assim, a quantidade de proteína necessária para a detecção da interação é bastante pequena. A 500 MHz, uma concentração de 0,1 nmol de proteína, com constante de ligação da ordem de μ M, é suficiente para a detecção de sinais de STD nítidos.³²

Em trabalho anterior deste grupo de pesquisa¹⁴, que avaliou várias Tioidantoínas e Hidantoínas como inibidores da UCE, o mapeamento de epítomos para as Tioidantoínas enantioméricas levou à atribuição do efeito STD máximo (100%) para as metilas da cadeia lateral, enquanto para a Hidantoína, a metila ligada ao enxofre foi o sinal mais intenso (Figura 09):

Figura 09 – Mapeamento de epítomos de Tiodantoínas e Hidantoínas em interação com UCE



Fonte: adaptado da referência 14.

1.6.2 Paramagnetic Relaxation Enhancement

As técnicas de RMN baseadas no aumento paramagnético de relaxação (do inglês *Paramagnetic Relaxation Enhancement*, PRE) têm se mostrado importantes ferramentas para a detecção de interações entre metaloenzimas e ligantes. O efeito PRE tem origem na interação entre um núcleo e um elétron desemparelhado.³⁰ A disparidade magnética entre os dois, advinda do fato de que o segundo apresenta um momento magnético cerca de 658 vezes maior, induz o núcleo a adotar uma série de comportamentos paramagnéticos, incluindo deslocamentos de pseudocontato, e aumentos paramagnéticos das taxas de relaxação. Desta forma, núcleos pertencentes a um ligante que interaja com determinado sítio proteico paramagnético, irão experimentar o efeito PRE, detectado na forma de aumentos em suas taxas de relaxação (tanto longitudinal como transversal).³⁰

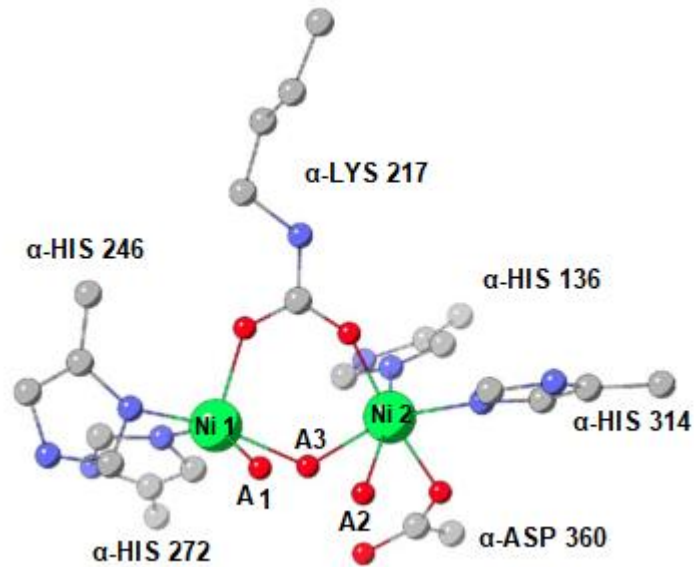
A determinação da interação com o centro paramagnético da enzima pode ser feita tanto diretamente, medindo-se as taxas de relaxação de núcleos do ligante, como indiretamente, pela monitoração de uma molécula sonda.³⁰ Esta é, em boa parte dos

casos, a água, o solvente mais comumente utilizado em estudos de RMN envolvendo biomoléculas. Uma enzima paramagnética dissolvida em solução aquosa pode se quelar com moléculas da água solvente, induzindo nestas o efeito PRE. Graças ao intercâmbio entre as moléculas de água queladas e não queladas, o efeito é transmitido pela totalidade da solução, gerando um realce global na relaxação do solvente. Assim, a presença de um ligante que exerça considerável interação com o centro paramagnético irá inibir o acesso de outras moléculas a esta região, suprimindo o aumento de relaxação medido para a água. Ao passo que a adição de ligantes fracos, ou não-ligantes, que não interfiram no contato entre água e metaloenzima, mantém inalteradas as condições de relaxação da solução aquosa enzimática anteriores à adição.³⁰

Estudos mostraram que o efeito PRE apresenta maior intensidade a campos baixos, com uma faixa ótima contida entre 0,01 e 100 MHz. Contudo, análises a campos altos (até 500 MHz) são também possíveis, embora demandem, normalmente, concentrações elevadas de metaloenzima para que a perturbação sobre a ressonância da molécula sonda possa ser detectada.³⁰

A urease ainda não consta dentre as metaloenzimas paramagnéticas já abordadas na literatura quanto a estudos de PRE. No centro bimetálico da enzima, em meio a ligantes histidina (HIS) e lisina (LIS), e três moléculas de água (A1-3) (sendo uma ligada em ponte aos dois centros metálicos), um dos íons (Ni 1) é pentacoordenado de geometria piramidal quadrada distorcida, ao passo que o outro (Ni 2), hexacoordenado com geometria pseudo-octaédrica, (Figura 10).³⁴ Com uma distribuição eletrônica [Ar] 3d⁸, e estado fundamental ³A_{2g}, o íon octaédrico confere caráter paramagnético ao sítio ativo enzimático, como já foi provado em experimentos de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) por diferentes autores.^{35, 36} Provavelmente comum às ureases de todas as fontes (considerando-se a grande similaridade retida pelo sítio ativo), esta característica da enzima a torna, em teoria, apta a ser empregada em ensaios de PRE. O desenvolvimento da técnica, para ligantes competitivos que tenham interação com o sítio paramagnético de Ni(II), poderia representar complemento significativo ao conjunto de experimentos de RMN já usados para o estudo mecanístico de inibidores ureolíticos.

Figura 10 – Sítio ativo paramagnético da urease



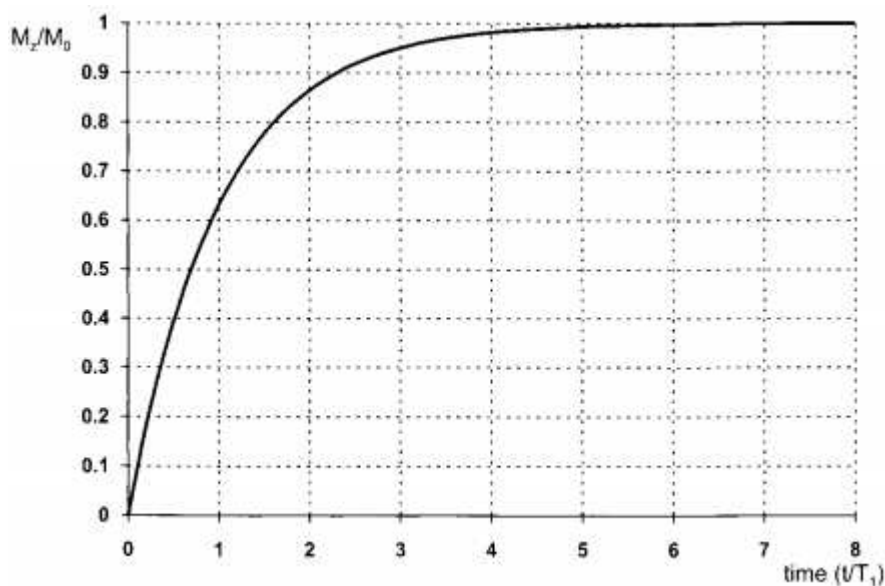
Fonte: adaptado da referência 34.

1.6.3 Relaxação Longitudinal, e Experimento de Inversão-Recuperação

A excitação de spins nucleares pela aplicação de um pulso de radiofrequência causa uma perturbação no vetor magnetização contido no eixo z, que é movido da posição de equilíbrio térmico +z, ocasionando uma mudança de populações de spins.²⁹ A recuperação da situação de equilíbrio em z (que recebe o nome de relaxação longitudinal) é definida como o reestabelecimento das populações iniciais, através da liberação de energia dos spins para as vizinhanças na forma de calor. Assim, a relaxação longitudinal recebe o nome alternativo de *relaxação spin-rede*.²⁹

A recuperação do vetor magnetização M_z corresponde, para a maioria dos núcleos de spin $\frac{1}{2}$ (tal como o ^1H), a um processo de comportamento exponencial. A Figura 11 ilustra o desenvolvimento da magnetização longitudinal de um núcleo, partindo do tempo 0 (imediatamente após a perturbação) em que é nula, e crescendo exponencialmente até a relaxação total.²⁹

Figura 11 – Aumento exponencial da magnetização longitudinal



Fonte: referência 29.

Embora seja referido, na comunidade química ressonante, como o tempo de relaxação longitudinal, T_1 não é uma medida do tempo necessário para o restabelecimento completo da magnetização em z, e sim uma constante temporal que corresponde, geralmente, a 1/5 deste valor.²⁹

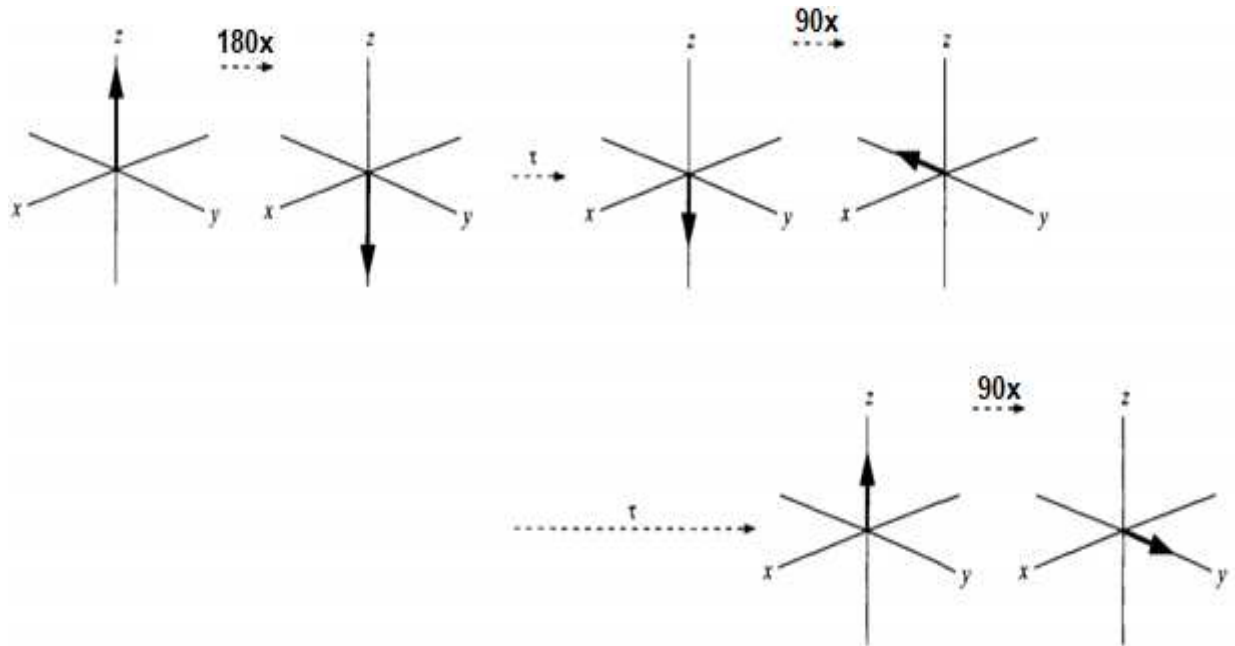
Para moléculas de tamanho médio, os valores de T_1 tendem a cobrir a faixa de 0,5-5,0 s. Para a água, por exemplo, o valor esperado é de 1-5 s.²⁹

Para a medição de T_1 de uma espécie, o experimento mais amplamente empregado é o denominado de inversão-recuperação. A técnica consiste na perturbação do equilíbrio térmico de um sistema de spins, e na monitoração da recuperação ao longo do tempo. A sequência de pulsos é relativamente simples, e se inicia com um pulso de 180° que inverte o vetor magnetização do eixo +z para -z. O vetor irá, aos poucos, retornar ao estado inicial, passando pelo plano x-y, até recuperar completamente a magnetização em +z, a uma taxa ditada pela constante T_1 .²⁹ Como o detector se encontra no plano x-y, a monitoração da magnetização é feita pela aplicação de segundo pulso, de 90° , o qual reverte a magnetização do eixo z para o plano x-y. A estratégia para determinação de T_1 consiste na aplicação de várias sequências de pulsos subsequentes, variando-se, de forma crescente, o intervalo de tempo (τ) entre os pulsos de 180° e 90° .²⁹

Com τ igual a 0, haverá a detecção de sinal com intensidade máxima em -y, indicando que a magnetização se encontra completamente em -z nos pontos iniciais

de relaxação. Aumentos subsequentes em τ farão com que se obtenha sinal com intensidade máxima em +y no ponto em que a magnetização em +z for completamente reestabelecida, ao tempo de aproximadamente $5T_1$ (Figura 12)²⁹:

Figura 12 – Sequência de pulsos do experimento de inversão-recuperação, com a aplicação de valores pequenos, e grandes de τ



Fonte: adaptado da referência 29.

A intensidade da magnetização detectada (M_t) segue a equação:

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

O tempo de relaxação T_1 é obtido pelo ajuste das intensidades de ressonância medidas a esta equação.²⁹

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Estudo da atividade inibitória, e do modo de interação molecular de Tioidantoínas e Hidantoínas com a urease nativa de *Cryptococcus neoformans*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção de lisado de *Cryptococcus neoformans*, que contenha a enzima urease em concentrações suficientes para ensaios de inibição e RMN;

- Monitorização da cinética da perda de atividade ureolítica do lisado através de método colorimétrico, e determinação das melhores condições de armazenamento;

- Realização de ensaio de inibição de Tioidantoínas e Hidantoínas contra a urease de *Cryptococcus neoformans* (UCN), e comparação dos resultados com os valores de inibição já relatados dos mesmos compostos contra a urease de *Canavalia ensiformis*;

- Obtenção de espectros de STD dos ligantes dissolvidos no lisado de *Cryptococcus neoformans*, e de sinais que indiquem a interação com a urease produzida por este fungo;

- Purificação parcial da urease presente no lisado por meio de ultra-filtração e diálise, e comparação das análises de STD e PRE das soluções ureolíticas resultantes com as análises do lisado bruto;

- Avaliação do PRE como uma técnica seletiva para estudos de interações de ligantes com a UCN (receptor paramagnético).

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 OBTENÇÃO DO LISADO DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

A obtenção do fungo e produção do lisado foram realizadas em parceria com o laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos (UEL), chefiado pela professora Dra. Sueli Ogatta. O desenvolvimento da metodologia teve contribuições da Dra. Sueli Ogatta e do prof. Dr. Eliandro Reis Tavares, e também do doutorando Paulo Henrique Guilherme Borges, responsável pela execução do procedimento.

Ao longo do projeto, foram obtidos três lotes de lisado.

3.1.1 Crescimento Do Fungo

A levedura de *C. neoformans* foi semeada em 10 mL de solução de meio mínimo (glicose 15 mM, sulfato de magnésio 10 mM, fosfato de monopotássio 29,4 mM, glicina 13 mM, tiamina-HCl 3 µM, ureia 2%), e incubada por 48h a 37°C. Após esse período, o conteúdo da placa foi transferido para um falcon contendo solução de meio mínimo. Incubou-se por mais 72 h a 37 °C.

3.1.2 Produção do Lisado

O falcon com os pellets foi centrifugado por 5 min a 6000 rpm. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi lavado 3 vezes com água destilada. O precipitado foi ressuspendido com a solução de extração (TLCK 100 µM, EDTA 1 Mm, glicerol 10% (v/v), e tampão PBS 8,0%), com pérolas de vidro. Vortexou-se por 30 s, com intervalos de 1 minuto em banho de gelo (7 ciclos).

Centrifugou-se por 15 minutos a 6000 rpm. Obtém-se o lisado como o sobrenadante resultante.

3.2 MEDIDA DA ATIVIDADE UREOLÍTICA DO LISADO

O procedimento seguido teve como base o protocolo para determinação de atividade ureolítica em solução, fornecido pela Sigma-Aldrich, com modificações pertinentes.³⁷

Em um eppendorf, adicionaram-se 65 μL de tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 8,0), 100 μL de solução 10 mM de ureia e 25 μL do lisado. Incubou-se essa mistura a 45°C por 10 minutos. Adicionaram-se 40 μL do reagente de fenol (solução de fenol 1% (m/v) e nitroprussiato de sódio 0,05% (m/v)) e 40 μL do reagente alcalino (NaOH 0,5% (m/v) e NaOCl 0,1% (v/v)). Incubou-se a mistura por mais 30 minutos a 45°C. Transferiu-se então a mistura para placa de 96 poços, e realizou-se a leitura de absorbância a 630 nm, com um leitor de microplacas UV-visível (marca Biotek, modelo Sinergy HT). Para o branco, o procedimento foi feito com 90 μL de tampão, sem adição de lisado. A absorbância da amostra (após subtração do branco) foi convertida a atividade ureolítica através da equação da reta de curva padrão de cloreto de amônio (item 3.3).

O primeiro lote de lisado foi monitorado durante dois meses.

3.3 CURVA PADRÃO DE CLORETO DE AMÔNIO

Em nove eppendorfs, adicionaram-se diferentes volumes (0 a 90 μL) de solução padrão de cloreto de amônio 504 μM (em tampão fosfato), para concentrações finais entre 0 e 238 μM . A cada eppendorf, adicionaram-se volumes variáveis (90 a 0 μL) de tampão fosfato, e 100 μL de água destilada.

Incubaram-se as soluções, e adicionaram-se os reagentes de fenol e alcalino, tal como relatado no item 3.2. Mediram-se as absorbâncias a 630 nm.

3.4. ENSAIO DE INIBIÇÃO

Os inibidores utilizados foram sintetizados por Góes *et al.* (2022)¹⁴.

Em um eppendorf, adicionaram-se 2,0 μL de solução 25 mM do inibidor; 63 μL de tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 8,0), 100 μL de solução 10 mM de ureia e 25 μL do lisado. Incubou-se essa mistura a 45°C por 10 minutos. Adicionaram-se 40 μL do reagente de fenol (solução de fenol 1% (m/v) e nitroprussiato de sódio 0,05% (m/v)) e 40 μL do reagente alcalino (NaOH 0,5% (m/v) e NaOCl 0,1% (v/v)). Incubou-se a mistura por mais 30 minutos a 45°C. Transferiu-se então a mistura para placa de 96 poços, e realizou-se a leitura de absorbância a 630 nm.

Para a medida do controle, o mesmo procedimento é feito, porém, no lugar do inibidor, adiciona-se 2,0 uL do solvente utilizado no preparo da solução estoque de inibidor (DMSO).

Para comparação, determinou-se também a inibição de um inibidor comercial padrão (tioureia), na mesma concentração dos ligantes testados.

A porcentagem de inibição é dada pela fórmula:

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

Em que:

Abs a = absorbância da amostra de inibidor;

Abs c = absorbância do controle.

Os experimentos foram feitos em triplicata.

3.5. PURIFICAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA

3.5.1. Ultra-Filtração

Utilizou-se um filtro do tipo ultra centrífuga, da marca Amicon®, com faixa de corte de 50 KDa.

2,5 mL do lisado (lote 01) foram adicionados ao filtro, e centrifugados por 5 minutos a 4000 rpm. Obteve-se 0,5 mL de retentado, e 2,0 mL de ultrafiltrado (o qual foi reservado). Ressuspendeu-se o retentado com 2,0 mL do mesmo tampão da solução original de lise (sem glicerol), e repetiu-se o procedimento por mais duas vezes.

Dessa forma, obteve-se, ao fim do procedimento, um retentado proteico e três ultrafiltrados, sendo estes rotulados: 1 – ultrafiltrado obtido da solução de lise original; 2 e 3 – ultrafiltrados obtidos do retentado ressuspenso.

Mediu-se a atividade ureolítica do retentado proteico e dos três ultrafiltrados pelo método do Indofenol (item 3.2.)

3.5.2 Diálise

Utilizou-se uma membrana de diálise de celulose semipermeável, com faixa de corte de 14 KDa. Adicionaram-se 2,0 mL do lisado (lote 01) ao interior da membrana, a qual foi apropriadamente selada com duas presilhas próprias para diálise. A membrana foi submersa em 300 mL do tampão de troca (tampão PBS 8,0%, glicose 7,4 mM, pH 7,4), e o sistema foi mantido sob refrigeração (4°C) e agitação magnética durante 41 h, realizando-se duas trocas do tampão.

Na segunda diálise, a fim de preencher toda a membrana, 3,5 mL do lisado (lote 2), foram diluídos para 7 mL com o tampão (PBS 8,0%, glicose 7,4 mM, azida de sódio 10 mM, pH 7,4). Adicionou-se a amostra à membrana, e submergiu-se no mesmo tampão para troca. O sistema foi mantido sob refrigeração (4°C) e agitação magnética durante 48 h, realizando-se três trocas de tampão.

3.5.3 Liofilização

Os retentados obtidos após diálise foram submetidos à liofilização, utilizando-se aparelho liofilizador Christ Alpha. Inicialmente, as amostras foram mantidas congeladas a -80°C, e posteriormente liofilizadas por aproximadamente 24h, até que se visualizasse a completa ausência de água.

Os sólidos obtidos após a liofilização foram ressuspensos em 600 µL (liofilizado 01), e 700 µL (liofilizado 02) de D₂O.

3.6. ENSAIOS DE STD

3.6.1 Preparo De Amostras

Para o mapeamento de epítomos do ligante **4** (Tioidantoína derivada da L-metionina) com a urease vegetal, preparou-se uma solução contendo: 4 µL de solução 0,25 M do ligante (em DMSO-d₆); 200 µL de solução 0,05 mM de UCE (Jack Bean, Tipo III, CAS 9002-13-5, adquirida da Sigma Aldrich) preparada em tampão fosfato de sódio deuterado (75 mM, acrescido de 150 mM de NaCl), pH 7,4; e 296 µL de tampão fosfato de sódio deuterado (75 mM, acrescido de 150 mM de NaCl), pH 7,4.

Para a obtenção dos espectros de STD dos ligantes **1,2 e 4** com o lisado bruto, preparou-se solução contendo: 4 μL de solução 0,25 M do ligante (em DMSO-d_6); 50 μL de D_2O ; e 446 μL do lisado (lote 01).

Para a obtenção dos espectros de STD do ligante **1** com o liofilizado 01, preparou-se solução contendo: 4 μL de solução 0,25 M do ligante (em DMSO-d_6); e 496 μL da solução do liofilizado 01 em D_2O .

Para a obtenção dos espectros de STD do ligante **1** com o liofilizado 02, preparou-se solução contendo: 4 μL de solução 0,25 M do ligante (em DMSO-d_6); 450 μL da solução do liofilizado 02 em D_2O , e 50 μL de H_2O destilada.

3.6.2 Configurações Gerais dos Experimentos de RMN

Os experimentos de STD foram realizados de acordo com metodologia adaptada de Viegas *et al.*³⁸ e Brito *et al.*¹³. Foi utilizado um espectrômetro Bruker Advance III operando a 400,13 MHz para ^1H a 25 °C, equipado com sonda multinuclear de 5 mm. Os espectros de STD foram obtidos utilizando-se parâmetros padrão da sequência de pulsos *stddiffesgp.3* fornecidos pela Bruker®. Os espectros de STD foram registrados com 64 *scans*, e 4 *dummy scans*. Calibrou-se o pulso de 90° separadamente, para cada experimento.

Para a saturação da urease, utilizou-se pulso do tipo Gauss, com largura de 10 ms. O pulso foi calibrado previamente à cada análise. A lista de irradiação foi configurada com quatro frequências alternadas: -400 (-1 ppm), 50000 (125 ppm), -400 (-1 ppm) e 50000 Hz (125 ppm).

O tempo de saturação utilizado foi de 1,5 s.

Gradientes de campo pulsado no eixo Z foram utilizados a fim de suprimir o sinal de água (residual de D_2O no caso da amostra de UCE, e solvente da solução de lise na amostra de UCN). Utilizou-se o formato de pulsos Sinc 1.1000 com 2 ms de largura, sendo este calibrado antes das análises.

O espectro de diferença (STD) foi obtido pela subtração do espectro on-resonance (irradiado a -400 Hz), e o espectro off-resonance (irradiado a 50000 Hz).

3.7. ENSAIOS DE PRE

3.7.1 Preparo De Amostras

Para a titulação do ligante **1** com o lisado bruto (lote 03), preparou-se solução com: 350 μL de lisado e 150 μL de D_2O . Após a análise desta solução, adicionaram-se volumes crescentes (2,0 a 6,0 μL) de solução padrão 0,25 M do ligante **1** (em DMSO-d_6). A solução diamagnética de controle (TLCK 100 μM , EDTA 1 mM, glicerol 10% (v/v) e tampão PBS 8,0%), que consiste na matriz do lisado bruto sem a presença de enzimas, também foi submetida à titulação com **1**, sob as mesmas condições.

Para a titulação do ligante **1** com a solução do liofilizado 02 em D_2O , preparou-se solução com: 450 μL do liofilizado e 50 μL de H_2O destilada, seguido de adições sucessivas entre 1,0 e 8,0 μL de solução estoque 0,25 M do ligante **1** (em DMSO-d_6).

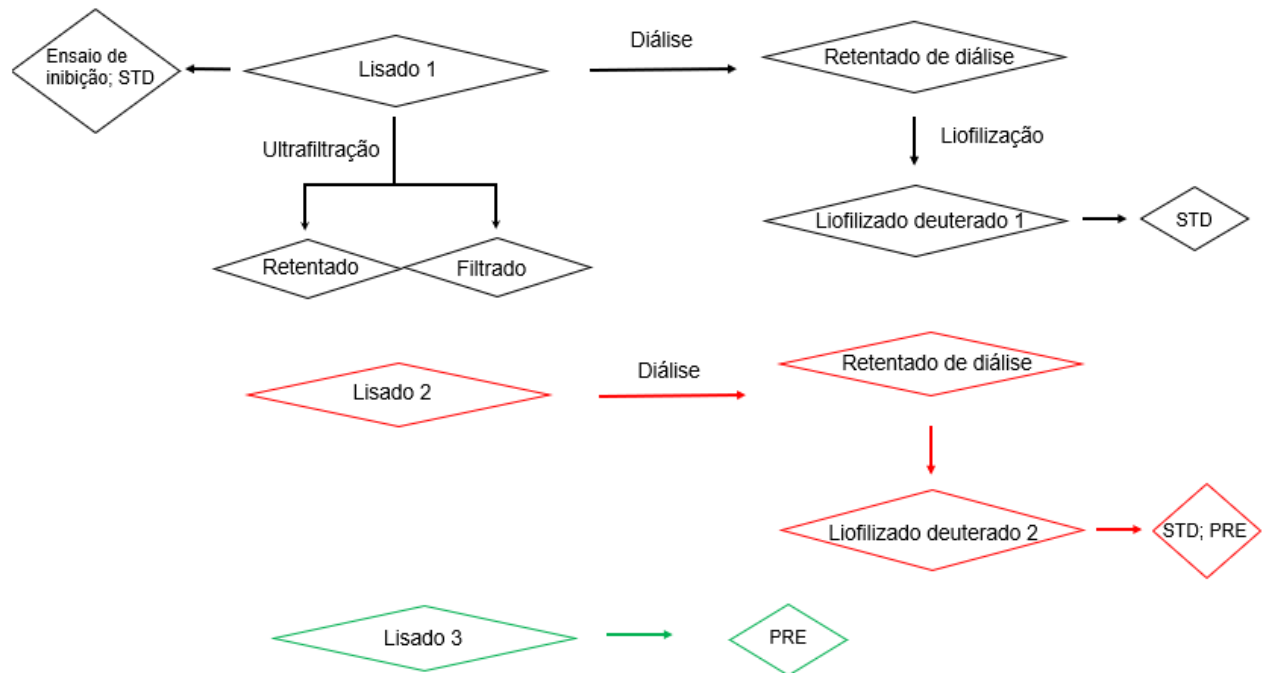
3.7.2 Experimento de inversão-recuperação

Na titulação do ligante **1** com o lisado bruto, e com a solução controle, foi utilizado um tempo de espera de relaxação (d_1) de 1,0 s e 12 intervalos de tempo entre os pulsos de 180° e 90° variando entre 0,010 e 13 s. Foram utilizados 2 scans, e 4 dummy scans.

Na titulação do ligante **1** com o liofilizado, o d_1 utilizado foi de 45,0 s, com 12 intervalos de tempo entre os pulsos de 180° e 90° , variando entre 0,010 e 50 s.

Os espectros obtidos foram então processados utilizando-se da ferramenta de análise de dinâmica do software TopSpin 3.7.0, obtendo-se o T_1 do solvente.

Fluxograma 1 - Esquema geral de lotes de amostras e experimentos



Fonte: O próprio autor.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. OBTENÇÃO DO LISADO FÚNGICO E MONITORAÇÃO DA ATIVIDADE UREOLÍTICA

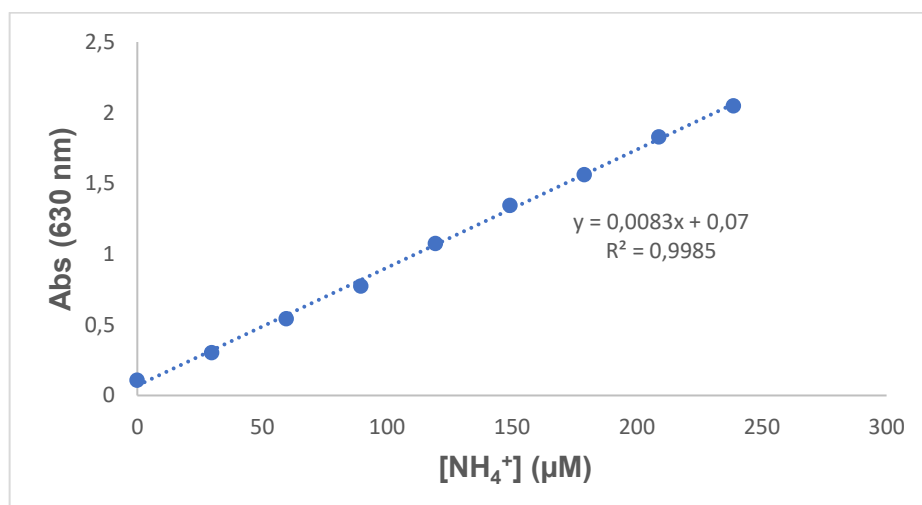
A obtenção do lisado foi feita adaptando-se procedimentos relatados na literatura.²⁰ A escolha da composição da solução de lise, que contém glicerol como um co-solvente do sistema aquoso, foi feita visando a estabilização da UCN. A presença de glicerol auxilia, principalmente, na inibição do fenômeno de agregação proteica.³⁹

De acordo com a literatura, cerca de 127 proteínas foram atribuídas ao fungo *Cryptococcus neoformans* sob determinadas condições²³, de forma que era esperado que o processo de lise resultasse na liberação celular de extenso conteúdo proteico além da enzima de interesse.

Contudo, o método do Indofenol (seção 1.4), empregado para a determinação da atividade ureolítica do lisado, é específico para a detecção da ação enzimática sobre o substrato natural da urease (ureia), sendo, portanto, ideal para a determinação desta enzima quando na presença de outras.

O teste de atividade ureolítica para o lisado foi positivo, como determinado pela forte coloração azul apresentada pela amostra de lisado. A medida de absorbância (630 nm) foi convertida em atividade através de curva padrão de cloreto de amônio (Figura 13):

Figura 13 – Curva padrão de cloreto de amônio



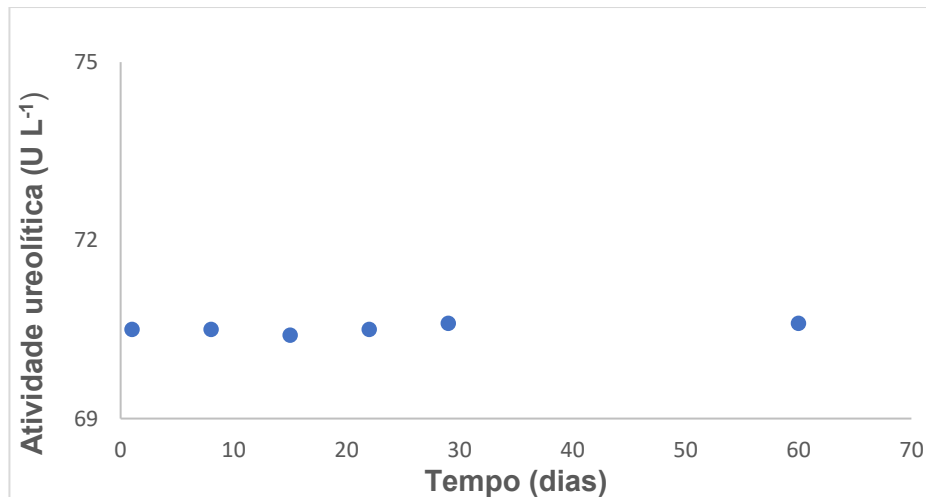
Fonte: o próprio autor.

Durante a realização do projeto, foram obtidos três lotes de lisado bruto, para os quais se determinaram atividades ureolíticas de $70,5 \text{ U L}^{-1}$ (lisado 01), $105,4 \text{ U L}^{-1}$ (lisado 02), e 123 U L^{-1} (lisado 03), sendo U definido como a quantidade de enzima que catalisa a formação de $1,0 \mu\text{mol}$ de amônia por minuto.

A atividade ureolítica foi monitorada durante dois meses, a fim de se avaliar a cinética do possível decaimento ao longo deste período.

Como mostra a Figura 14, não foram detectadas perdas consideráveis de atividade durante o período considerado:

Figura 14 – Atividade ureolítica do lisado 01 em função do tempo



Fonte: o próprio autor.

O valor médio foi de $70,5 \pm 0,07 \text{ U L}^{-1}$.

Portanto, os estabilizantes do lisado (majoritariamente glicerol), somados a armazenamento a 4°C com azida de sódio a 10 mM , se mostraram suficientes para a conservação da atividade ureolítica da solução.

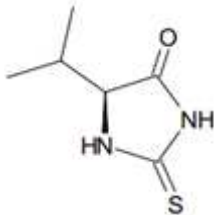
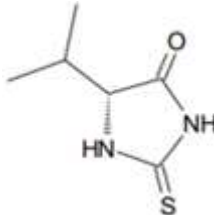
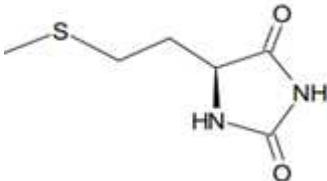
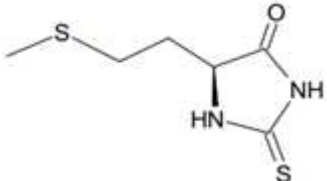
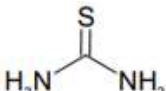
Demonstra-se a praticidade dos métodos de obtenção e conservação para estudos desta urease fúngica, visto que um mesmo lote de lisado pode ser empregado em análises separadas por até dois meses, sem que haja perda de reprodutibilidade decorrente da degradação ureolítica.

4.2 ATIVIDADE INIBITÓRIA DOS LIGANTES CONTRA UREASE DE *CRYPTOCOCCUS*

Para o ensaio de inibição contra a UCN, foram selecionados os ligantes **1** e **3**, que foram os mais ativos contra a UCE em trabalho anterior do grupo¹⁴, e também o enantiômero do ligante **1** (ligante **2**), que foi inativo contra esta urease, a fim de avaliar a enantioespecificidade da UCN.

Além disso, selecionou-se o análogo tioidantoínico do ligante **3** (ligante **4**), para comparar a influência dos grupos tiocarbonila e carbonila dos anéis de cinco membros sobre a interação com a enzima. Na Tabela 01, são apresentados os resultados do ensaio de inibição.

Tabela 01 – Resultados do ensaio de inibição da UCN contida no lisado 01 (70,5 U L⁻¹), com ligantes a 0,26 mM, e ureia a 5,26 mM

Ligante	Estrutura química	Inibição UCN (%)
1		86,3 ± 0,7
2		85,9 ± 0,7
3		14,9 ± 1,5
4		84,0 ± 0,2
Tioureia (inibidor padrão)		63,3 ± 6,6

Fonte: o próprio autor.

Como se observa, os enantiômeros derivados da valina (**1** e **2**) apresentaram a mesma porcentagem de inibição aproximada, diferente do obtido no ensaio da urease vegetal (UCE), em que apenas o enantiômero L (**1**) apresentou inibição elevada (90,5%), enquanto seu par enantiomérico D (**2**) inibiu em apenas 27,8%. Com isso, observa-se que a UCN não apresenta interação estereoespecífica com estes ligantes, divergindo assim do comportamento da UCE.¹⁴

Outra importante conclusão diz respeito ao inibidor Hidantoína derivado da L-metionina (**3**). Como havia sido relatado por trabalho anterior do grupo¹⁴, este é um inibidor incompetitivo da UCE, e se liga majoritariamente ao sítio alostérico, e não ao ativo, da enzima. Os sítios alostéricos diferem consideravelmente entre ureases de diferentes organismos, enquanto os sítios ativos tendem a apresentar um maior grau de conservação. Assim, é esperado que inibidores incompetitivos tenham valores mais discrepantes de inibição ao se comparar a atividade contra ureases de fontes distintas. O resultado obtido reforça o perfil incompetitivo deste ligante: apresentou baixa inibição (14,9%) contra a UCN, mas elevada inibição contra a UCE (85,9%).¹⁴

Já a Tioidantoína derivada da L-metionina (**4**) apresentou elevada inibição contra a UCN (84,0%), sendo esta superior à atividade relatada contra a UCE (62%).¹⁴ É evidente, da comparação de **3** e **4**, que o grupo tiocarbonila é imprescindível para a interação do anel de cinco membros com a enzima fúngica.

De acordo com o mecanismo proposto para a interação da ureia com o sítio ativo da urease, o grupo amida se coordena aos dois íons de Ni(II), primeiro via oxigênio carbonílico, depois via nitrogênio amídico (Esquema 02). Considerando-se interações similares para os ligantes avaliados, são feitas as seguintes considerações: o enxofre tiocarbonílico dispõe de menor eletronegatividade e maior polarizabilidade do que o oxigênio carbonílico,⁴⁰ sendo o primeiro classificado como uma base mole e o segundo, dura. Por essa razão, a tiocarbonila tem uma maior compatibilidade com o íon Ni(II) que, embora classificado como ácido de fronteira, apresenta maior caráter mole.⁴¹ Assim, espera-se que a coordenação da tiocarbonila ao sítio ativo de Ni(II) forme uma ligação química mais forte, impedindo assim, de forma mais eficaz, a coordenação com o substrato. Dessa forma, prevê-se uma melhor interação do sítio ativo da urease com a Tioidantoína derivada da L-metionina (**4**) do que com o seu análogo hidantoínico (**3**), o que pode ser uma razão para o notável realce na atividade inibitória obtido pela troca de um único átomo de oxigênio por enxofre.

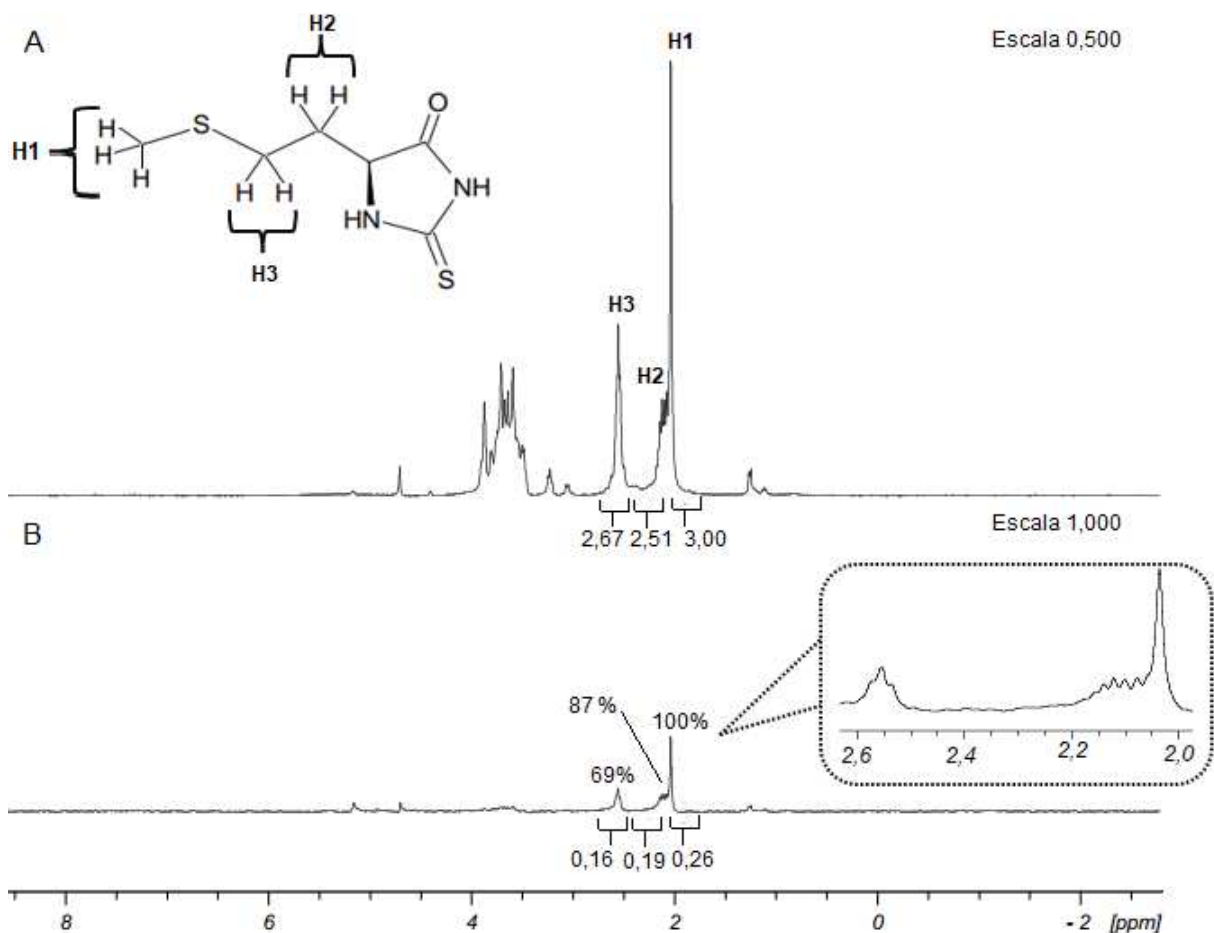
Analisando-se os perfis dos quatro inibidores, verifica-se que todas as Tioidantoínas apresentaram valores de atividade contidos na mesma ordem de grandeza, caracterizando o núcleo tioidantoínico como uma unidade farmacofórica.⁴²

4.3 MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS DO LIGANTE 4 COM A UCE

Como não consta na literatura o mapeamento de epítomos por STD do ligante **4** com a urease vegetal, este foi selecionado para o experimento.

Na Figura 15, são mostrados os espectros de STD, e de referência, do experimento de STD do ligante **4** com a urease vegetal UCE, com indicação do mapeamento de epítomos calculado pelos fatores de amplificação.

Figura 15 – Espectros do experimento de STD do ligante **4** com a UCE. Espectro de referência (*off-resonance*) (**A**) e espectro de STD (**B**). Parâmetros: [UCE] = 0,02 mM; [4] = 2,00 mM; tampão fosfato (em D₂O), pH 7,4; STD: T_{sat} = 1,5 s; Gauss1.1000 = 10 ms; Sinc 1.1000 = 2 ms; n° scans: 64



Fonte: o próprio autor.

Como se observa, foram obtidos sinais de STD referentes ao singlete (H1) da metila (2,03 ppm) e ao tripleto (H3) do metileno (2,55 ppm), ambos ligados ao grupo sulfeto. O multiplete (H2) referente ao grupo metileno ligado ao anel de cinco membros (2,12 ppm) também produziu sinal de STD. A proximidade dos sinais em 2,03 e 2,12 ppm dificultou a determinação do mapeamento de epítomos, obtendo-se apenas uma estimativa das respectivas porcentagens de STD.

Os ensaios de STD relatados na literatura¹⁴ para o análogo hidantoínico (**3**) indicaram que a interação com a urease se dá, majoritariamente, pelo átomo de enxofre da cadeia lateral, com pouca ou nenhuma participação do núcleo hidantoínico, já que foram observados sinais de STD apenas para o singlete em 2,03 ppm referente ao grupo metila (100%), e ao multiplete em aproximadamente 2,55 ppm referente ao grupo metileno, ambos ligados ao átomo de enxofre.

Similarmente, para o ligante **4**, os grupos ligados ao enxofre da cadeia lateral também aparentam compor o sítio majoritário de interação, tendo-se obtido um fator de amplificação de 100% para a metila. No entanto, como foi observado também um sinal de STD para H2 (87%), referente ao metileno ligado ao anel de cinco membros, evidencia-se uma maior participação do núcleo tioidantoínico na interação com a enzima, com relação ao análogo hidantoínico.

4.4. ESTUDOS DE INTERAÇÃO POR STD PARA O LISADO MICROBIANO

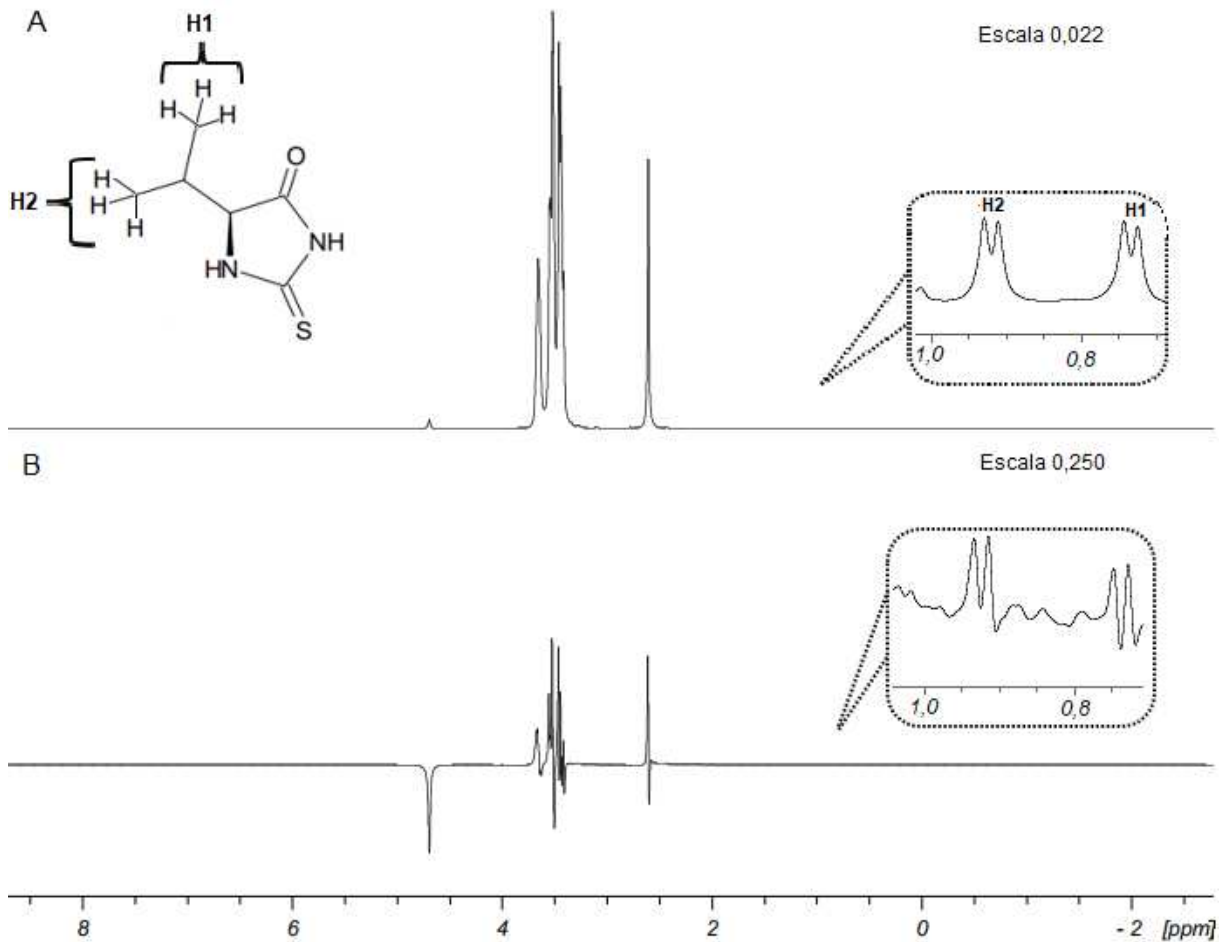
Considerando-se que o lisado de *C. neoformans* apresenta um número elevado de potenciais biomoléculas além da UCN, o experimento de STD com inibidores ureolíticos não permite atribuição absoluta dos sinais à interação e consequente transferência de saturação relativas à enzima de interesse. Porém, esperava-se que os sinais oriundos da formação do complexo UCN-inibidor compusessem parte significativa do espectro STD obtido, tendo em vista o elevado grau de inibição determinado no ensaio colorimétrico. Prevê-se a possibilidade de distinguir tais sinais por meio de comparação com dados da literatura dos mesmos compostos frente à urease de *C. ensiformis* purificada.

Além disso, a realização do experimento de STD com o extrato bruto visa avaliar as prováveis interferências que o co-solvente (glicerol) pode acarretar, de forma a se planejar as etapas de purificação subsequentes.

Para este experimento, selecionaram-se os ligantes **1**, **2** e **4**, que apresentaram atividade inibitória considerável (superior à do inibidor padrão), no ensaio colorimétrico.

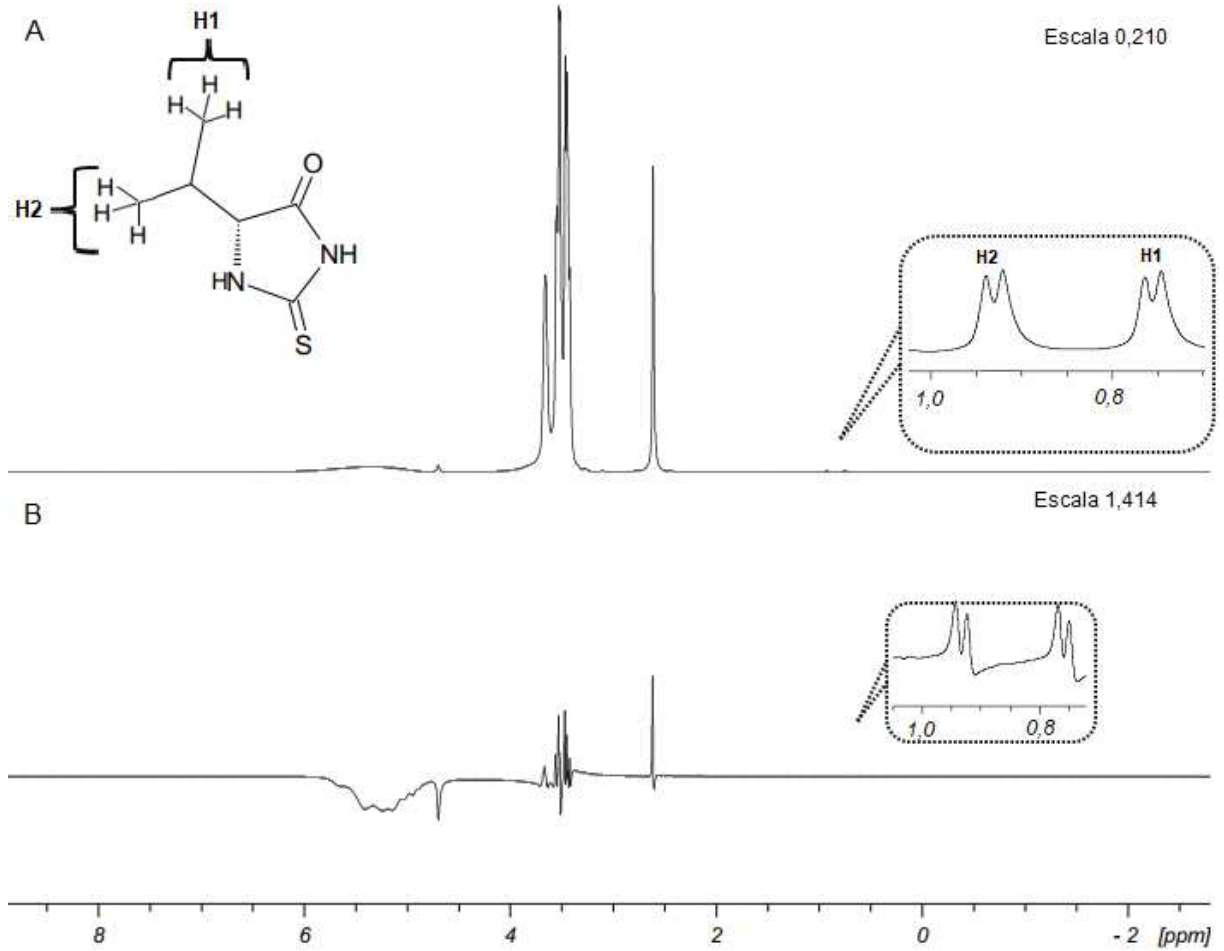
Nas Figuras 16 a 18, são apresentados os espectros de off-resonance e STD dos ligantes **1**, **2** e **4** com a UCN.

Figura 16 – Espectros do experimento de STD do ligante **1** com o lisado ureolítico de *C. neoformans*, (lote 01 - 70,5 U L⁻¹). Espectro de referência (*off-resonance*) (**A**) e espectro de STD (**B**). Parâmetros: [**1**] = 2,00 mM; Tsat = 1,5 s; Gauss1.1000 = 10 ms; Sinc1.1000 = 2 ms; n° scans: 64



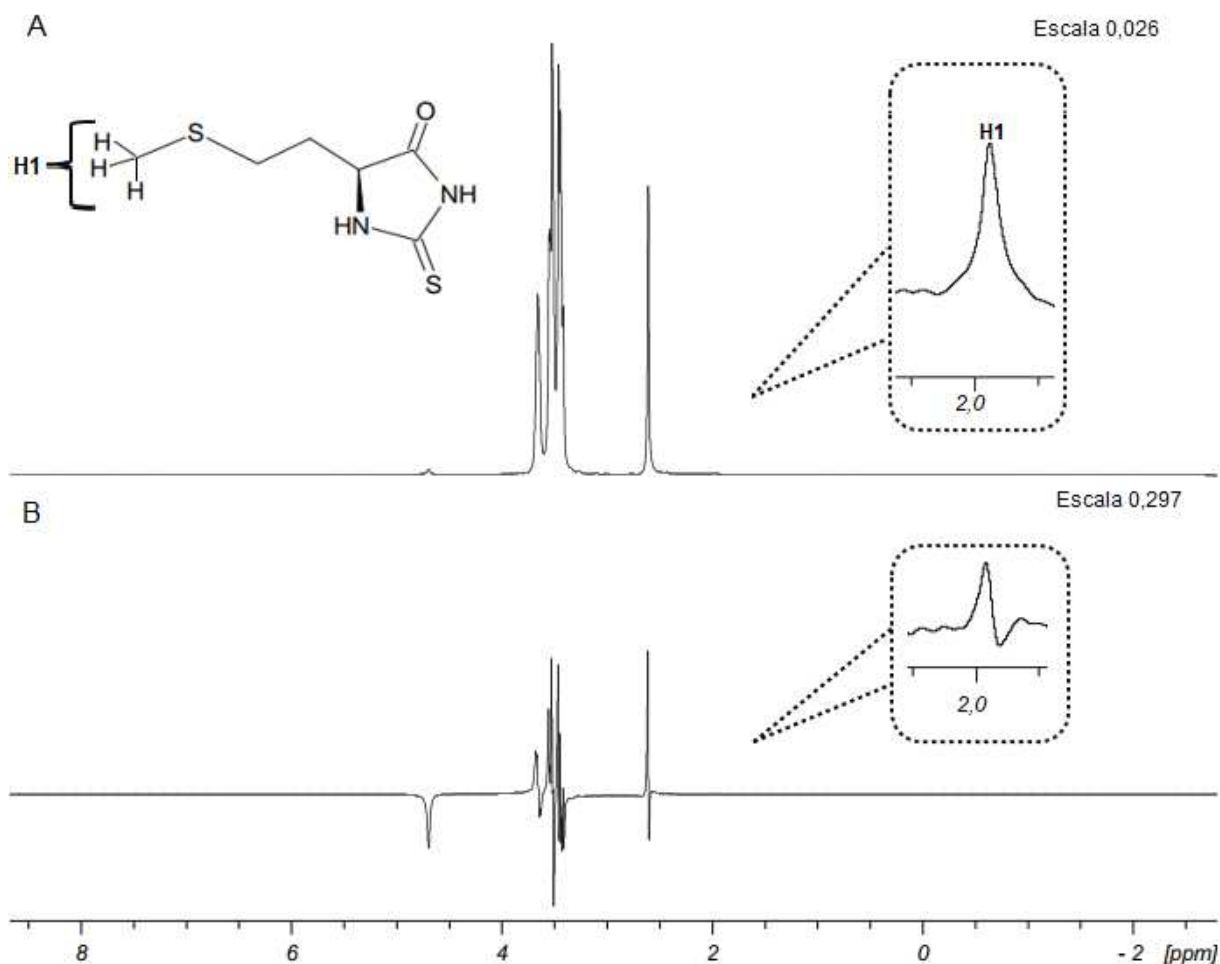
Fonte: o próprio autor.

Figura 17 – Espectros do experimento de STD do ligante **2** com o lisado ureolítico de *C. neoformans* (lote 01 – 70,5 U L⁻¹). Espectro de referência (*off-resonance*) (**A**) e espectro de STD (**B**). Parâmetros: [**2**] = 2,00 mM; Tsat = 1,5 s; Gauss1.1000 = 10 ms; Sinc1.1000 = 2 ms; n° scans: 64



Fonte: o próprio autor.

Figura 18 – Espectros do experimento de STD do ligante **4** com o lisado ureolítico de *C. neoformans* (lote 01 – 70,5 U L⁻¹). Espectro de referência (*off-resonance*) (**A**) e espectro de STD (**B**). Parâmetros: [**4**] = 2,00 mM; Tsat = 1,5 s; Gauss1.1000 = 10 ms; Sinc1.1000 = 2 ms; n° scans: 64



Fonte: o próprio autor.

Os resultados destes estudos iniciais obtidos permitem algumas interpretações válidas sobre os modos de interação dos ligantes. A Figura 16 demonstra que o ligante **1** apresentou dois sinais de STD na região de 0,8-0,96 ppm, sendo os dois dupletos referentes às metilas diastereotópicas H1 e H2, indicando a participação da cadeia lateral isopropílica na interação com a enzima. Similarmente, a Figura 17 mostra que o ligante **2** apresentou sinais de STD referentes às metilas H1 e H2. Assim, obtém-se um indicativo de que os dois ligantes enantioméricos apresentam modos de interação similares, corroborando-se os resultados do ensaio de inibição colorimétrico, em que se determinaram porcentagens de inibição muito próximas para as duas espécies.

O ligante **4** apresentou um sinal de STD em 2,03 ppm, referente ao singlete da metila terminal H1 ligada ao grupo sulfeto, inferindo-se que este é um potencial grupo de interação com a UCN (Figura 18).

É importante frisar que, embora se tenha determinado grande relevância do núcleo tioidantóinico na inibição da urease (seção 4.2), o mesmo não é mapeável por STD nas presentes condições, já que os prótons tioamídicos (**HN**) são de difícil atribuição na solução aquosa analisada, pois as intensidades dos sinais correspondentes são prejudicadas em razão de fatores como ligações de hidrogênio e trocas com os prótons do solvente (H₂O).⁴³

O fato de os ligantes terem apresentado atividade anti-ureolítica no ensaio colorimétrico, e dos sinais de STD observados serem equivalentes aos epítomos mais interativos com a UCE purificada, são indicativos de que os sinais de STD aqui obtidos podem ser resultantes da interação de interesse com a urease microbiana na solução de lise.

Entretanto, os experimentos de 16 a 18 mostram uma baixa razão sinal/ruído, comprometendo a quantificação precisa do efeito STD para as ressonâncias dos ligantes. Além disso, nas condições destas análises, o limite de detecção foi insuficiente para registrar os sinais de epítomos menos intensos.

Além dos aspectos já discutidos, a complexa composição da solução de lise se mostra desafiadora para fins de detecção dos sinais de STD esperados, também devido aos sinais intensos de glicerol (3,4-3,6 ppm), e de DMSO (2,6 ppm), identificado como uma impureza na composição do tampão de lise. A excessiva concentração de glicerol (aprox. 1,0 mol L⁻¹) compromete a detecção dos sinais dos ligantes (2,0 mmol L⁻¹) devido a limitações no alcance dinâmico do conversor digital analógico do espectrômetro.

A presença do sinal de glicerol no espectro de STD pode indicar sua interação com a urease (ou com quaisquer outras macromoléculas da solução), sendo este outro potencial inconveniente destas condições para o monitoramento da interação de interesse (urease-inibidor), já que a enzima não se encontraria totalmente livre para a formação do complexo com o inibidor, o que interferiria diretamente na eficácia da transferência de saturação. Alternativamente, a ocorrência da detecção de glicerol no espectro de STD pode resultar do cancelamento incompleto na subtração entre os espectros *off* e *on-resonance*, devido à alta concentração deste componente na solução.

Portanto, as condições de análise requerem procedimentos de purificação parcial da solução ureolítica para que se possam estudar adequadamente as interações entre ligante e proteína.

4.5. PURIFICAÇÃO PARCIAL DA UREASE DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

Os resultados de RMN de STD obtidos pela análise do lisado bruto evidenciaram a necessidade da eliminação de glicerol e DMSO, a fim de se obter os sinais de ligante em razão sinal/ruído adequada. Além disso, a purificação de urease faz-se necessária também no sentido da eliminação parcial de biomacromoléculas indesejadas da solução bruta que possam representar alvos alternativos dos ligantes investigados, interferindo dessa forma na atribuição dos sinais detectados. Para esta finalidade, procedimentos simples, de purificação parcial, foram considerados inicialmente como alternativas práticas com relação a processos cromatográficos de purificação, como a cromatografia de exclusão por tamanho. Sendo assim, a ultrafiltração e a diálise, utilizando membranas com faixas de corte de pesos moleculares convenientes, foram adotadas como estratégias prioritárias nesta fase do estudo, para a remoção não apenas de moléculas pequenas (glicerol, DMSO, além de metabólitos de *C. neoformans*) mas também de parte do teor de biomacromoléculas indesejadas, como uma vantagem adicional.

4.5.1 Ultra-Filtração

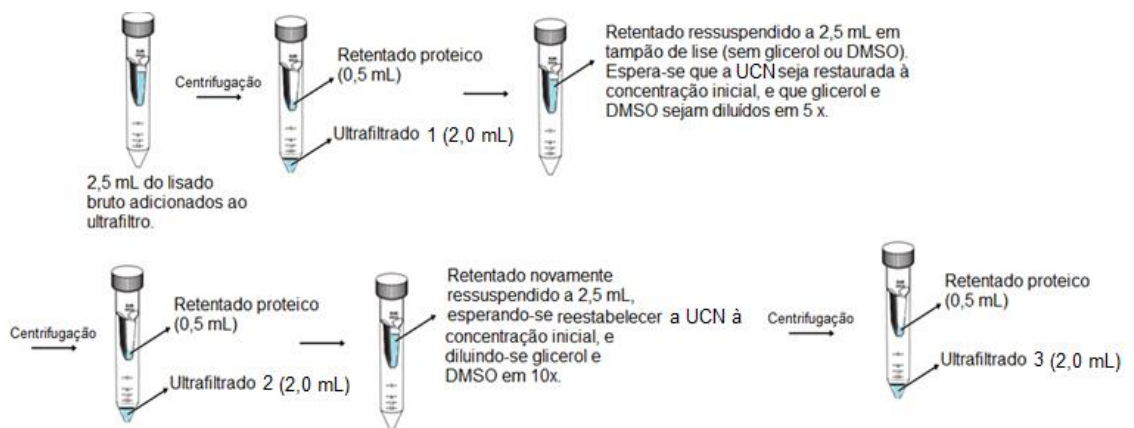
De acordo com o princípio da técnica, o filtro reteria a urease em sua parte superior, no material denominado retentado proteico, e os contaminantes (glicerol, EDTA, metabólitos, etc) de peso molecular inferior a 50 KDa, passariam para o ultrafiltrado.

A sequência primária da UCN apresenta um total de 832 aminoácidos, podendo-se estimar um peso molecular mínimo de 90 KDa.^{08, 27} Portanto, a faixa de corte de 50 KDa é adequada para eliminação de moléculas pequenas tais como metabólitos e interferentes exógenos (principalmente glicerol e dimetilsulfóxido) a comporem a solução de lise, além de diversas biomacromoléculas. As proteínas mais prováveis de comporem o lisado abrangem a faixa de 35-222 KDa²³, de forma que se esperava que o procedimento de filtração, com corte de 50 KDa, isolasse a enzima de

interesse da porção de biomoléculas de peso inferior a essa faixa de corte. Contudo, a principal vantagem da técnica, a fins de RMN de ^1H , seria a eliminação de glicerol e DMSO, os dois interferentes mais significativos da solução de lise nas análises de RMN.

Na Figura 19, é representado o esquema da técnica de filtração, com os resultados de separação e concentração esperados:

Figura 19 – Esquema do procedimento de ultrafiltração



Fonte: o próprio autor.

Entretanto, o retentado proteico de alto peso molecular, após as duas ressuspensões no tampão de troca, não apresentou atividade ureolítica, sugerindo que não houve a concentração de urease após a primeira filtração. Além disso, o ultrafiltrado 1 apresentou atividade comparável à do lisado de partida, novamente indicando o insucesso da separação.

4.5.2 Diálise/liofilização

Diante dos resultados negativos da purificação da urease através da ultrafiltração, empregou-se a técnica de diálise. O princípio da técnica é baseado em uma membrana semipermeável (com faixa de corte molecular determinada pelo tamanho de seus poros). A membrana contendo a amostra é submersa no tampão de troca, e permite a livre circulação de moléculas de peso molecular abaixo da faixa de corte.

Assim, o resultado esperado era a transferência do glicerol (e demais componentes de baixo peso molecular do lisado) para a solução de troca, e a retenção da macromolécula (urease) no interior da membrana, passando a estar dissolvida no tampão livre de glicerol. A membrana utilizada apresenta faixa de corte de 14 KDa.

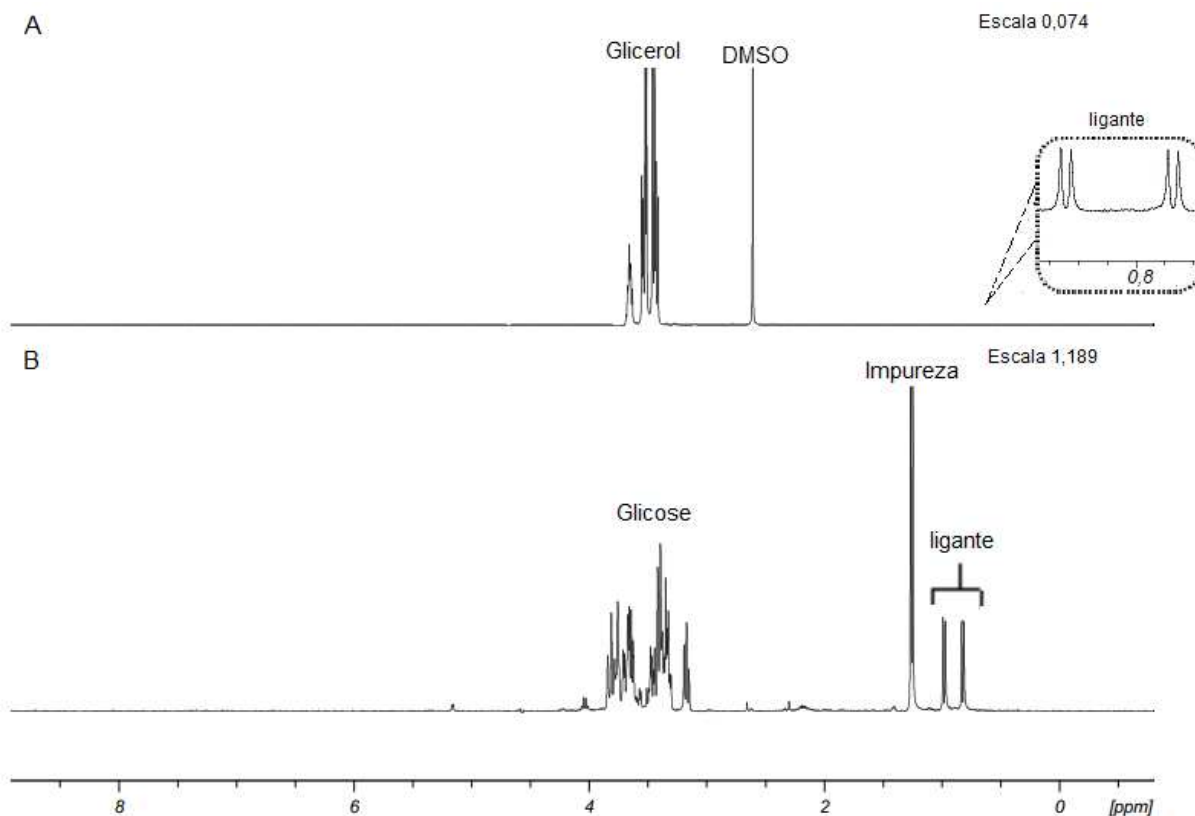
Contudo, apesar de determinado como um inconveniente interferente nas análises de RMN, o glicerol trata-se de um potente estabilizante de biomoléculas em solução, sobretudo devido à inibição de indesejado fenômeno de agregação proteica, tendo por esta razão sido selecionado como um co-solvente da solução aquosa de lise. Portanto, havia a necessidade em substituí-lo por outra espécie que atuasse como estabilizante de eficácia comparável, porém em concentração que não interferisse nas análises necessárias.

Selecionou-se, para tal fim, a glicose. Amplamente utilizado em formulações de urease de *C. ensiformis* comercial, este açúcar redutor é relatado como um excelente estabilizante da enzima. A concentração de 7,4 mM foi selecionada para compor o tampão de troca do processo de diálise. Desta forma, ao final do processo, espera-se obter uma solução dialisada de urease fúngica (dentre outras biomoléculas de alto peso molecular) na presença de um estabilizante em concentrações compatíveis com os experimentos de RMN planejados.

4.5.2.1 – Diálise/Liofilização 01

Na Figura 20, é mostrado o espectro de RMN do retentado obtido na primeira diálise, partindo-se do lote de lisado com atividade ureolítica de $70,5 \text{ U L}^{-1}$, com adição do ligante a 2,0 mM, em comparação com o espectro de RMN correspondente do lisado bruto.

Figura 20 – Espectro de RMN de ^1H do lisado bruto (em TLCK 100 μM , EDTA 1 mM, glicerol 10% (v/v) e tampão PBS 8,0% (A), e do retentado em tampão PBS 8% + glicose 7,4 mM (B), com supressão do sinal de água, e adição do ligante **1** a 2,0 mM



Fonte: o próprio autor.

Observa-se que houve completa eliminação dos interferentes DMSO e glicerol, sendo a região espectral deste último substituída pelo multiplete da glicose, comprovando-se por RMN de ^1H a eficácia da troca de soluções. É evidente também a melhoria na razão sinal/ruído obtida para o ligante, alcançando intensidade da mesma ordem de grandeza do estabilizante na solução final.

Observa-se que o procedimento de diálise levou à introdução de uma impureza não identificada à solução, detectada no pico em 1,2 ppm.

A despeito do bom resultado obtido quanto à troca de soluções, houve perda de atividade ureolítica no retentado com relação ao lisado bruto em cerca de 2,5 vezes ($28,1 \text{ U L}^{-1}$), o que pode ser devido ao desprendimento parcial de íons Ni(II) do sítio ativo durante o procedimento de diálise ou ainda à diminuição da estabilidade da enzima nestas condições quando comparada às soluções contendo altas concentrações de glicerol.

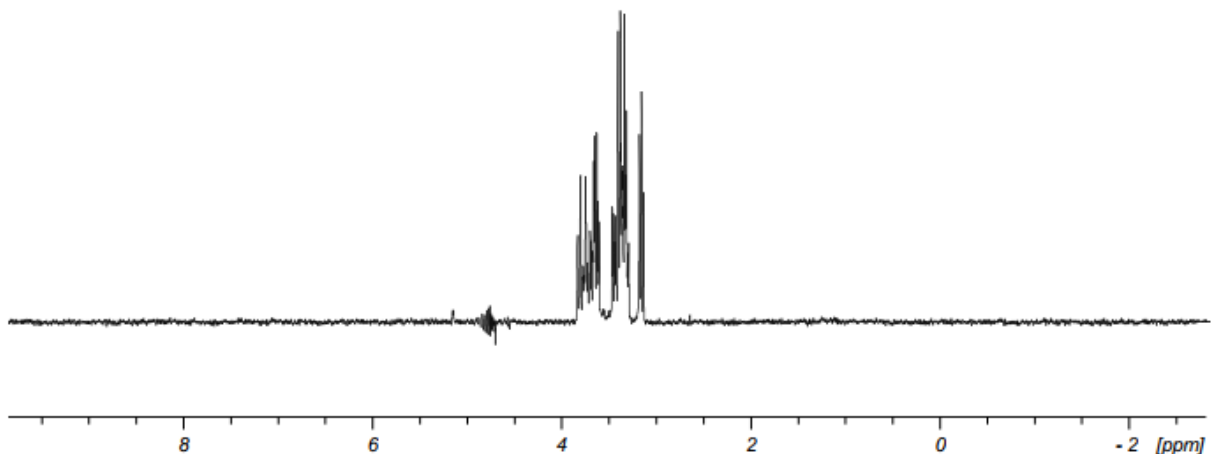
Porém, níveis de atividade ureolítica suficientes para os experimentos de STD foram restaurados após concentração da enzima através da liofilização do retentado de diálise, seguida de ressuspensão em volume inferior de D₂O, obtendo-se solução final deuterada com atividade 96,5 U L⁻¹.

4.5.2.2 – Diálise/Liofilização 02

O retentado obtido na segunda liofilização, realizada partindo-se do lote de lisado 02 (105,4 U L⁻¹) não apresentou atividade ureolítica. Verificou-se, assim, que o procedimento de diálise apresenta desafios de reprodutibilidade quanto à conservação de atividade ureolítica, devido a mecanismos não esclarecidos.

Na Figura 21, é mostrado o espectro de RMN de ¹H referente ao retentado, com supressão de água:

Figura 21 – Espectro de RMN de ¹H do retentado 02, em tampão PBS 8% + glicose 7,4 mM, com supressão do sinal de água



Fonte: o próprio autor.

Verifica-se que a troca de tampões foi novamente efetiva, observando-se unicamente o multipletto atribuído à glicose. Conclui-se também que esta segunda diálise não levou à formação da impureza produzida no primeiro caso (1,2 ppm).

A liofilização seguida de ressuspensão em volume inferior de D₂O recuperou 7% da atividade ureolítica original do lisado de partida, resultando em solução final ativa em 7,32 U L⁻¹.

4.6 MONITORAÇÃO DA ATIVIDADE UREOLÍTICA DO LIOFILIZADO DEUTERADO

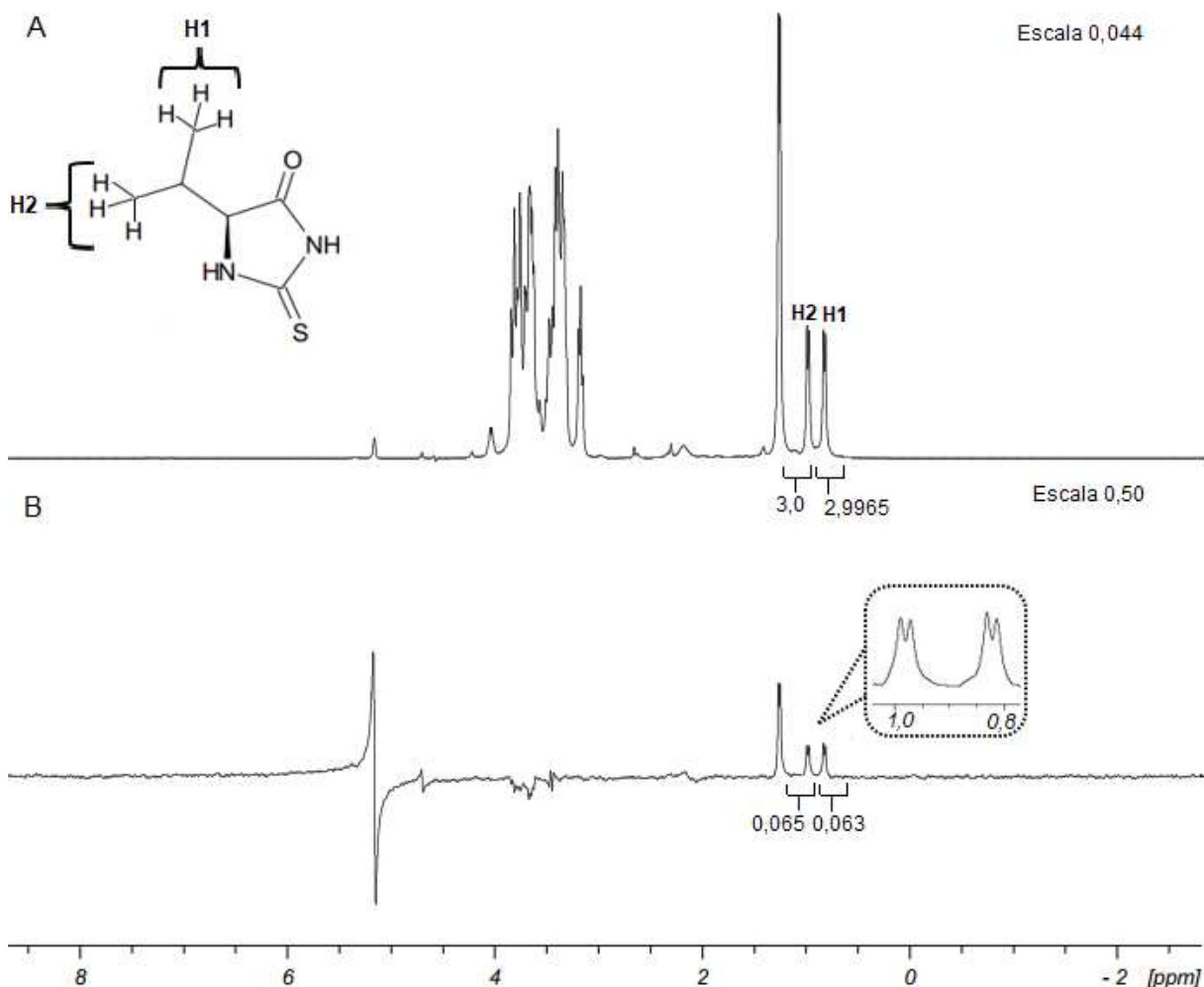
O liofilizado ressuspendido em D₂O mais ativo (lote 01) teve sua atividade medida no primeiro dia da obtenção, determinando-se o valor de 96,5 U L⁻¹. Após dois meses (sessenta dias), nova medida forneceu o valor de 96,6 U L⁻¹, indicando que não houve perda detectável de atividade neste período.

Assim, mesmo a uma concentração cerca de 135 vezes inferior à do co-solvente glicerol no lisado bruto, a glicose é um estabilizante de comparável eficácia para a manutenção da integridade ureolítica da UCN em solução.

4.7. ESPECTROS DE STD PARA AS SOLUÇÕES LIOFILIZADAS DEUTERADAS

Na Figura 22, são mostrados os espectros de STD e off-resonance para o ligante **1** em solução aquosa deuterada do liofilizado 01:

Figura 22 – Espectros do experimento de STD do ligante **1** com o liofilizado 01 (96,5 U L⁻¹). Espectro de referência (*off-resonance*) (A) e espectro de STD (B). Parâmetros: [1] = 2,00 mM; Tsat = 1,5 s; Gauss1.1000 = 10 ms; Sinc1.1000 = 2 ms; n° scans: 64



Fonte: o próprio autor.

Como observado nos espectros, não foram obtidos sinais de STD na região da glicose (3,1-3,9 ppm), com exceção do pico descaracterizado atribuído ao anômero α da glicose (5,2 ppm), indicando que a molécula, além de não apresentar interação a níveis detectáveis com a UCN, não o faz com o restante do conteúdo proteico da solução, concluindo-se que as escolhas de estabilizante e concentração são apropriadas para a formulação.

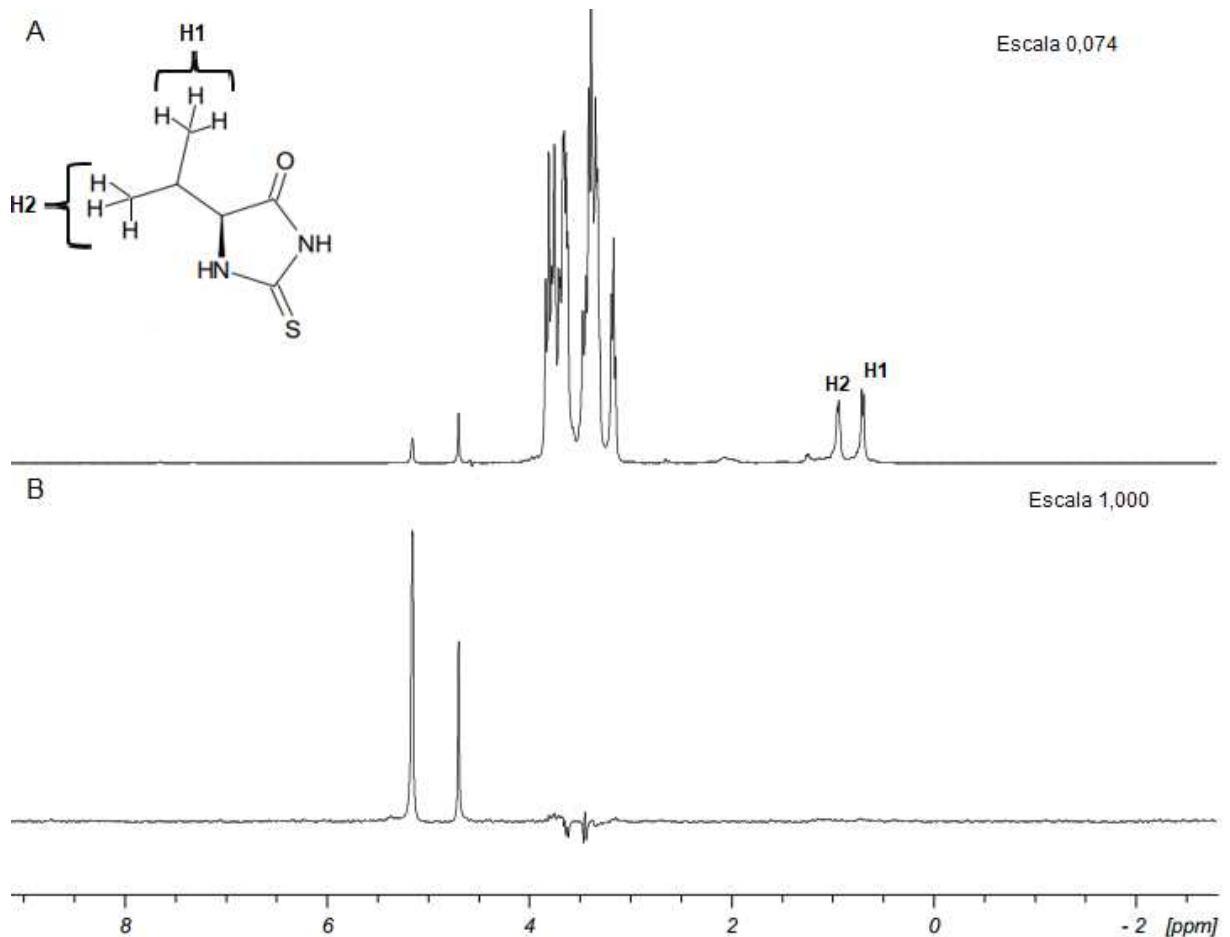
Os sinais de STD referentes às metilas diastereotópicas H1 e H2 do ligante foram novamente detectados. Porém, a razão sinal/ruído melhorou em cerca de 33 vezes com relação aos sinais destes epítomos no espectro do lisado bruto, concluindo-

se que as técnicas combinadas de diálise/liofilização são efetivas para a otimização das análises de RMN com a UCN.

A impureza indeterminada, originada no processo de diálise, gerou sinal de STD (1,2 ppm) de intensidade próxima ao do ligante Tioidantoína, inferindo-se que tal impureza demonstra interação significativa com ao menos algum componente do conteúdo proteico da solução.

Na Figura 23, são mostrados os espectros de STD e off-resonance para o ligante **1** em solução aquosa deuterada do liofilizado 02:

Figura 23 – Espectros do experimento de STD do ligante **1** com o liofilizado 02 (7,32 U L⁻¹). Espectro de referência (*off-resonance*) (A) e espectro de STD (B). Parâmetros: [1] = 2,00 mM; Tsat = 1,5 s; Gauss1.1000 = 10 ms; Sinc1.1000 = 2 ms; n° scans: 64

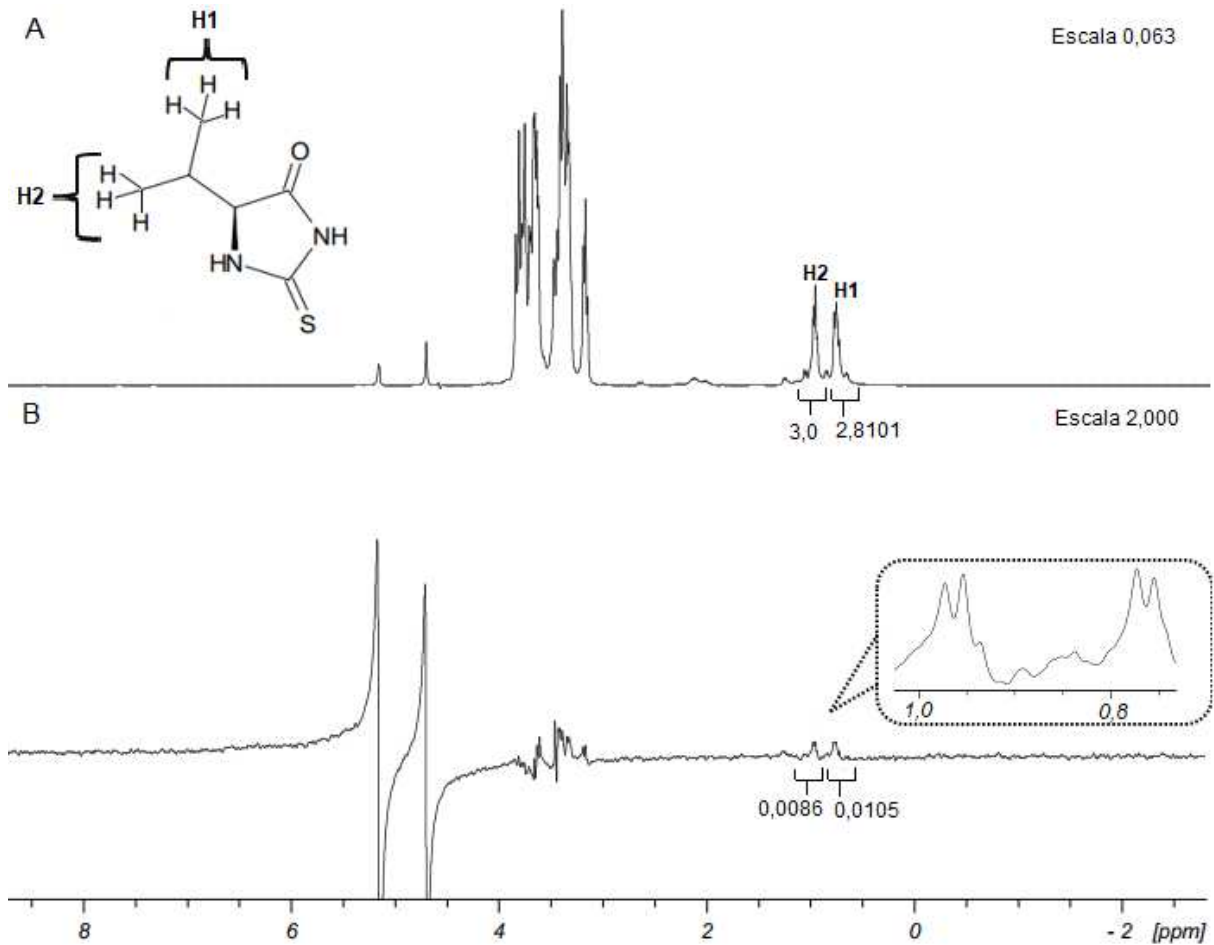


Fonte: o próprio autor.

Como se observa nos espectros, não foi detectado nenhum sinal de STD do ligante sob a baixa atividade ureolítica de 7,32 U L⁻¹. A fim de avaliar se quantidades

maiores de ligante gerariam o sinal esperado, aumentou-se a concentração para 4,0 mM (Figura 24):

Figura 24 – Espectros do experimento de STD do ligante **1** com o liofilizado 02 (7,32 U L⁻¹). Espectro de referência (*off-resonance*) (A) e espectro de STD (B). Parâmetros: [1] = 4,00 mM; Tsat = 1,5 s; Gauss1.1000 = 10 ms; Sinc1.1000 = 2 ms; n° scans: 64



Fonte: o próprio autor.

Como se observa, ao dobrar-se a concentração, foi possível a detecção dos sinais de STD de H1 e H2 do ligante.

De acordo com a equação 02 (item 1.6.1), o fator de amplificação referente à transferência de saturação (A_{std}) é:

$$A_{STD} = \frac{I_{STD}}{I_0} \times \left[\frac{L_E}{P} \right] \quad (02)$$

No entanto, como não se dispõe da concentração de enzima, foi calculado apenas o efeito STD (E_{std}), correspondente ao primeiro termo da equação:

$$E_{std} = \frac{I_{STD}}{I_0} \quad (03)$$

Na Tabela 02, são apresentados os valores calculados de E_{std} .

Tabela 02 – Efeitos STD para H1 e H2 (ligante 1), sob as duas soluções ureolíticas de liofilizado

Solução ureolítica	E_{std} H1	E_{std} H2
Liofilizado 01 (96,5 U L ⁻¹)	0,021	0,022
Liofilizado 02 (7,32 U L ⁻¹)	0,0037	0,0029

Fonte: o próprio autor.

Realizando-se a razão dos valores de E_{std} (H1) a 96,5 e 7,32 U L⁻¹ (considerando-se $\frac{1}{2}$ do valor a 7,32 U L⁻¹, já que a concentração de ligante era duas vezes maior) obtém-se o valor de 11,3.

$$\frac{E_{std} H1 (liof. 01)}{E_{std} H1 (liof. 02)/2} = \frac{0,021}{(0,0037/2)} = 11,3$$

O mesmo cálculo para H2 fornece o valor de 15,2, obtendo-se uma média entre as razões de E_{std} de H1 e H2 igual a 13,2.

Assim, estima-se que o efeito STD obtido para o ligante 1 é cerca de 13,2 vezes mais intenso em solução com atividade ureolítica de 96,5 U L⁻¹ do que com 7,32 U L⁻¹. Interessantemente, a razão entre estes valores de atividade ureolítica é:

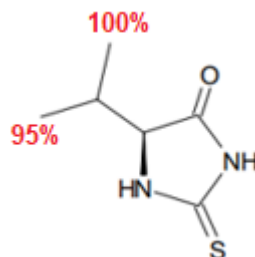
$$\frac{96,5 \text{ UL}^{-1}}{7,32 \text{ UL}^{-1}} = 13,2$$

Determina-se, portanto, uma relação direta entre a atividade ureolítica da solução analisada e o sinal de STD detectado para o inibidor. Desta forma, embora se estime para o liofilizado um elevado número de biomoléculas de potencial afinidade com Tioidantoínas, a relação entre os efeitos STD e as respectivas atividades ureolíticas é um indicativo da atuação predominante da interação de interesse na detecção dos sinais de STD (entre o ligante **1** e a urease de *Cryptococcus neoformans*).

Analisando-se a Tabela 02, verifica-se que a saturação transferida para o ligante foi maior em H2 do que em H1 na primeira solução ureolítica, enquanto a segunda solução forneceu o resultado inverso. Desta forma, corrobora-se o ensaio colorimétrico de inibição, o qual indicou que o sítio de interação da enzima com este ligante (bem como seu entantiômero) não demonstra estereoespecificidade para a formação do complexo urease-inibidor, de modo que as metilas diastereotópicas H1 e H2 têm iguais probabilidades de receber a saturação, compondo um único epítipo.

Considerando-se a maior atividade ureolítica, melhor razão sinal/ruído, e quantia em excesso de ligante mais apropriada, selecionaram-se os espectros referentes à primeira liofilização (Figura 22) para a realização dos cálculos de mapeamento de epítipos. Para este cálculo, não há necessidade de se dispor do valor de concentração da enzima, visto que o efeito STD relativo entre os dois prótons é calculado pela razão entre os dois fatores de amplificação, levando ao cancelamento do segundo termo da equação (L_E/P). Os valores próximos de E_{std} (0,021 e 0,022) indicam que não há diferenciação significativa na transferência de saturação para os dois epítipos diastereotópicos, portanto as porcentagens indicadas não permitem a distinção entre H1 e H2, novamente caracterizando a ausência de estereoespecificidade da interação com a enzima.

Figura 25 – Mapeamento de epítomos do ligante **1** com o liofilizado 01 (96,5 U L⁻¹)



Fonte: o próprio autor.

Determina-se que a cadeia lateral isopropílica apresenta considerável proximidade com o alvo biomacromolecular, compondo, provavelmente, um importante sítio de interação do ligante. Contudo, é válido frisar que, tal como na análise do lisado bruto aquoso, o núcleo tioidantoinico não é mapeável pela técnica, no presente caso devido a troca isotópica entre deutério e os hidrogênios ionizáveis dos grupos NH.

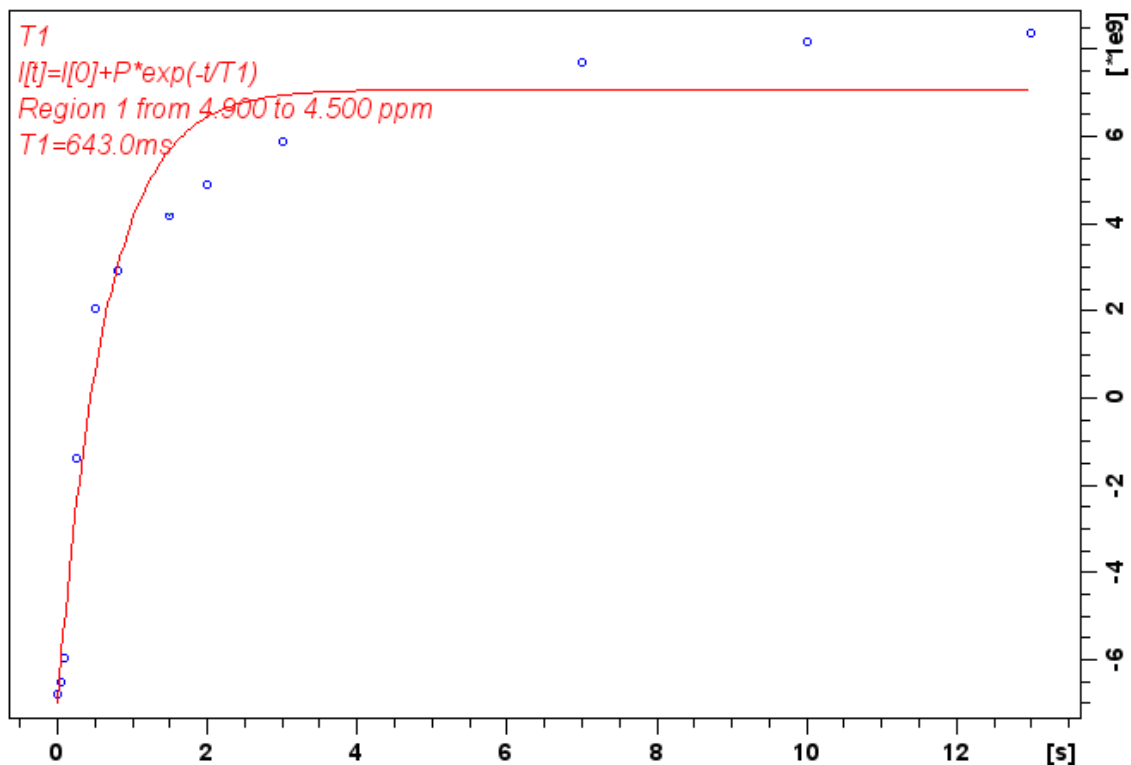
4.8 ENSAIO DE PRE COM O LISADO BRUTO

Os ensaios de PRE foram realizados com o terceiro lote de lisado (123,1 U L⁻¹), o mais ativo dentre os três produzidos, para se suprir o solvente com a maior quantidade possível da enzima ativa dissolvida, visando compensar o baixo efeito esperado de PRE ao campo alto trabalhado de 400 MHz. Considerou-se que a extensão do efeito PRE é intimamente relacionada à atividade ureolítica da solução, visto que ambas são dependentes da presença do agente paramagnético Ni(II) nos domínios catalíticos.

Dentre os ligantes disponíveis, foi selecionado aquele para o qual era prevista inibição do tipo mista ou competitiva, com afinidade considerável pelo sítio ativo paramagnético da UCN. O ligante **1** teve seu mecanismo previamente relatado como misto frente à urease vegetal de *C. ensiformis*¹⁴, perfil este que indica a afinidade tanto pelo sítio ativo, quanto por alostéricos diamagnéticos. Considerando-se os valores de inibição de ordens comparáveis apresentados pelo composto **1**, à mesma concentração e condições similares, no ensaio da UCN aqui relatado (86%), e da UCE na literatura (90,5%)¹⁴, preveem-se iguais mecanismos de inibição nos dois casos. Assim, selecionou-se o ligante **1** como o candidato mais provável de interação com o centro paramagnético da UCN.

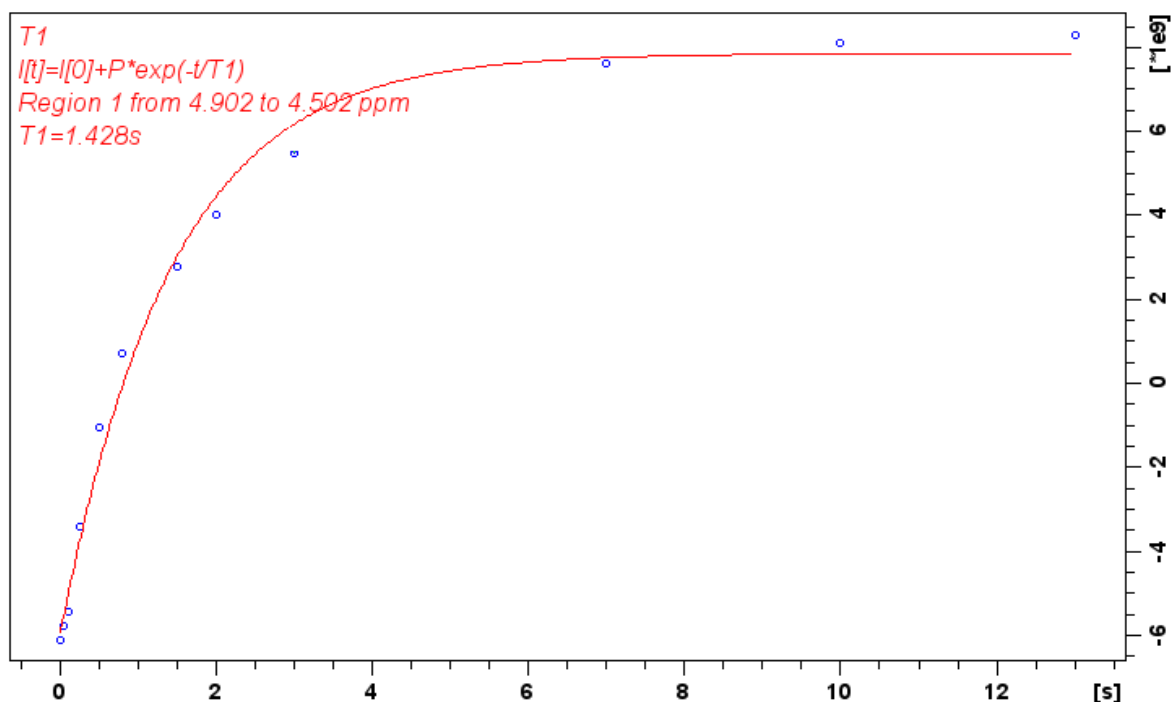
Verificou-se, durante as medidas de tempo de relaxação (T_1) da água para o controle negativo (solução sem a adição de ligante), que os valores medidos apresentaram considerável desvio-padrão, resultando em escasso ajuste dos pontos de tempo na curva de magnetização que fornece T_1 . Notou-se que este efeito se tornava cada vez mais pronunciado conforme o aumento do tempo de espera (*delay*) de relaxação (d1). Considerando-se um T_1 estimado entre 1 e 5 s para a água, o valor de d1 deveria, idealmente, ser de pelo menos cinco vezes maior (entre 5 e 25 s). Contudo, um d1 de apenas 3 s tornava a medida bastante imprecisa, com um T_1 de 0,64 s e desvio-padrão de 0,13 s (Figura 26). O ajuste para d1 de 1 s permitiu uma curva visivelmente melhor ajustada aos pontos, reduzindo o desvio padrão para 0,057 s (Figura 27), e fornecendo um T_1 da água mais próximo ao esperado, de 1,43 s.

Figura 26 – Curva de magnetização longitudinal em função do tempo, para determinação de T_1 da água em lisado bruto (123,1 U L⁻¹). d1 = 3,0 s



Fonte: o próprio autor.

Figura 27 – Curva de magnetização longitudinal em função do tempo, para determinação de T_1 da água em lisado bruto ($123,1 \text{ U L}^{-1}$). $d1 = 1,0 \text{ s}$



Fonte: o próprio autor.

Assim, optou-se por manter o $d1$ de 1s durante as análises. A somatória de $d1$ com o tempo de aquisição de 1,8 s fornece um período total de espera de relaxação de 2,8 s. Como será visto, a faixa de T_1 medida na titulação não ultrapassou 2,2 s. Assim, embora não se tenha usado um valor ideal para o experimento de inversão-recuperação ($5T_1$), o tempo de 2,8 s é coberto pela faixa recomendada pela fabricante do espectrômetro, de $1-5T_1$ para a obtenção de uma medida confiável.

Essa imprecisão observada no experimento de inversão-recuperação pode ser explicada em ensaios de PRE que empregam a água como molécula sonda considerando o efeito conhecido como *radiation damping*. Este fenômeno é um problema comumente relatado na literatura, em análises deste tipo, e pode ser explicado pela intensa ressonância dos prótons da água em soluções aquosas. A elevada concentração dos prótons hidroxila, de aprox. 110 M, ocasiona considerável alargamento no singlete correspondente, prejudicando a precisão das medidas de tempo de relaxação, as quais são feitas por meio da integração dos picos da molécula analisada.³⁰ Assim, é recomendado para o preparo de amostras a utilização de solventes de proporção majoritária em água deuterada (D_2O), já que a ressonância

medida (atribuída, principalmente, a HDO), é consideravelmente menos intensa como reflexo da concentração apenas residual de prótons.⁴⁴

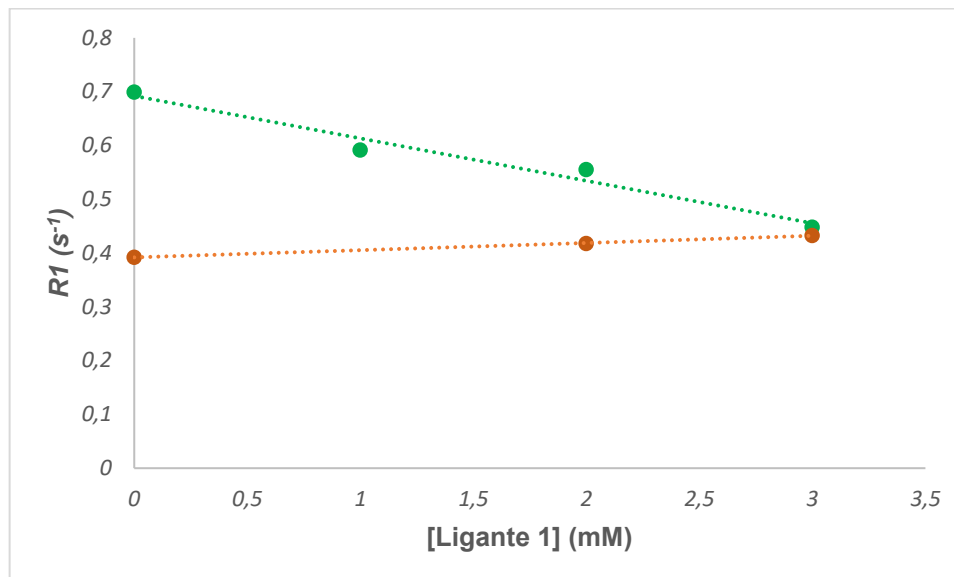
Esta questão já era prevista antes da realização de nossos experimentos. No entanto, como a amostra de lisado ureolítico consiste em solução de H₂O, a adição de D₂O em elevada proporção acarretaria a diluição da urease, e consequente diminuição da atividade da solução, comprometendo a detecção do efeito PRE. Por isso, de forma a inibir, ainda que parcialmente, o fenômeno de *radiation damping*, sem diminuir de forma impactante a concentração de UCN, optou-se pela utilização de D₂O na proporção minoritária de 30%, mantendo a solução aquosa de lisado como os 70% restantes.

O aumento da imprecisão das medidas em função do aumento de d1 foi atribuído a um realce do fenômeno de *damping* a delays maiores, que permitem a relaxação total dos prótons de H₂O, exacerbando a ressonância detectada. Explica-se assim o baixo T_1 , e alto desvio-padrão obtido a d1 de 3s (Figura 26).

De forma a avaliar se o tempo de espera total de 2,8 s era confiável para as medidas de T_1 da água, monitorou-se, como controle, os outros dois maiores componentes do lisado, glicerol e DMSO, cujos tempos de relaxação não são afetados por *radiation damping* devido às baixas concentrações. Verificou-se que os T_1 's de 1,9 s, e 3,5 s, respectivamente, não apresentaram variações significativas quando do uso de d1 de 1s, ou de tempos de espera maiores de até 13 s. Em teoria, esperava-se que o d1 de 1s fosse ainda mais inadequado para estes T_1 's maiores do que os da água, introduzindo alta imprecisão às suas medidas. Contudo, verifica-se, pela comparação de d1 de 1 e 13 s, que isto não ocorre, e glicerol e DMSO não são afetados, estimando-se o mesmo comportamento para água. Valida-se, portanto, a titulação da água com *delay* de 1,0 s.

A Figura 28 apresenta o resultado da titulação do ligante **1** na solução de lisado bruto e na solução diamagnética controle, com os valores de tempos de relaxação longitudinais da água convertidos para as respectivas taxas de relaxação R_1 ($1/T_1$):

Figura 28 – Taxa de relaxação da água no lisado bruto ($123,1 \text{ U L}^{-1}$) (.....), e em solução de controle diamagnético (.....) em função da concentração do ligante **1**. H_2O 70%/ D_2O 30%



Fonte: o próprio autor.

Pela análise do ponto inicial (sem adição de ligante), observa-se que a solução enzimática de lisado apresenta taxa de relaxação de solvente consideravelmente superior à da solução controle, o que é característico do efeito PRE advindo de interações com enzimas portadoras de sítios paramagnéticos (seção 1.6.2). Considerando-se que a única macromolécula com esta característica, dentre as estimadas para o lisado, é a metaloenzima urease, restringe-se confiavelmente o efeito detectado à sua interação com a água.

Analisando-se os pontos de adição do inibidor **1** sobre a solução enzimática de lisado (gráfico verde), comprova-se que o composto demonstra interação com o sítio ativo paramagnético da urease fúngica, levando ao deslocamento de moléculas de solvente desta região, o que é refletido no decréscimo sucessivo da taxa de relaxação da água. A 3,0 mM de ligante, R_1 é restaurado à ordem da solução diamagnética de controle.

Como esperado, a titulação realizada sobre a solução controle (gráfico laranja) não gerou alterações significativas sobre o parâmetro medido, validando a atribuição do efeito obtido na solução enzimática à interação de interesse, uma vez que o ligante somente apresenta o perfil característico de PRE na presença da metaloenzima em solução.

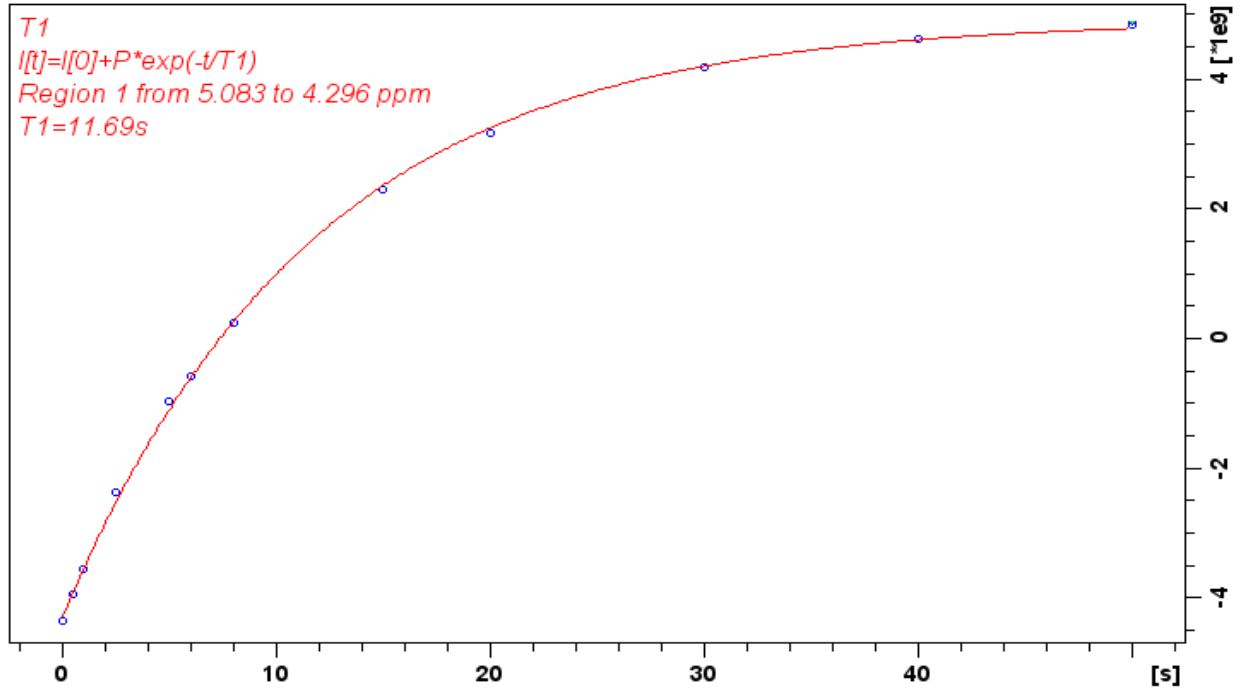
Foi verificado, durante a realização da titulação, que era necessário um excesso de ligante (1,0 mM) com relação à concentração estimada de proteína (ordem de nM a μ M), para que fosse detectado o primeiro ponto de perturbação em R_1 . O excesso de ligante demandado para se atingir o efeito PRE pode ser entendido como uma propriedade intrínseca de sua interação com a enzima (perfil similar já foi relatado para outros inibidores)⁴⁴, mas pode também resultar da presença de outras biomoléculas que atuem como alvos alternativos do ligante, de forma que este só se encontraria livre para interagir com urease, a níveis suficientes para detecção de PRE, a altas concentrações.

4.9 ENSAIO DE PRE COM A SOLUÇÃO LIOFILIZADA DEUTERADA

É esperado, para soluções de água majoritariamente deuterada, tempos de relaxação maiores do que os da água em soluções de H_2O , visto que a espécie predominante responsável pelo sinal residual de próton é HDO. É relatado que essa molécula apresenta tempos de relaxação longitudinais (T_1) e transversais (T_2) consideravelmente superiores aos de H_2O , o que pode ser atribuído a ligações de hidrogênio mais intensas.⁴⁵ Por isso, a curva selecionada para a determinação de T_1 comprimiu a faixa de τ de 0,01 a 50 s.

A utilização de solução deuterada inibiu por completo o fenômeno de *radiation damping*, como era esperado. Mesmo a d1 de 45 s, foi possível se obter pontos bem ajustados à curva de magnetização, fornecendo T_1 's na faixa prevista, e com baixos desvios-padrão (da ordem de 10^{-2} s). Na Figura 29, é mostrada a curva de obtenção de T_1 para o branco (sem adição de ligante) da solução deuterada, mostrando o bom ajuste dos pontos à curva, a d1 de 45 s:

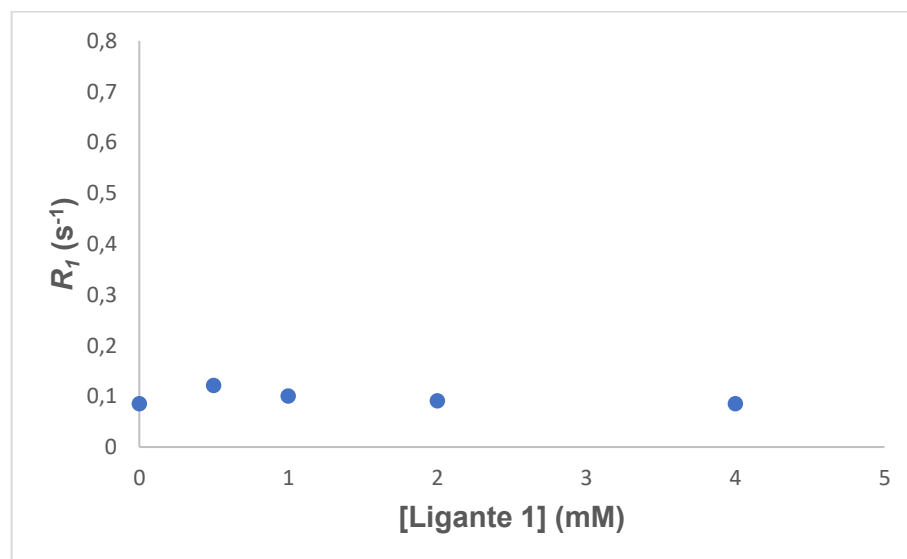
Figura 29 – Curva de magnetização longitudinal em função do tempo, para determinação de T_1 da água no liofilizado deuterado 2. D₂O 90%/ H₂O 10%; 7,32 U L⁻¹. d1 = 45,0 s



Fonte: o próprio autor.

A Figura 30 mostra o perfil do ligante 1 sobre R_1 da água, na solução liofilizada:

Figura 30 – Taxa de relaxação da água em solução liofilizada deuterada 2 (7,32 U L⁻¹) em função da concentração do ligante 1. D₂O 90%/ H₂O 10%



Fonte: o próprio autor.

Não se obteve um perfil definido de titulação, visto que a adição do ligante ora ocasionava reduções, ora aumentos em R_1 , o que foi atribuído somente ao erro introduzido entre as medidas. Para a maior concentração, de 4,0 mM, o valor medido se igualou ao do ponto sem adição de ligante ($T_1 = 11,69$ s; $R_1 = 0,085$ s⁻¹) Verificasse, assim, que não foi observado efeito PRE sobre a solução do liofilizado 02. Este resultado pode ser explicado considerando-se a baixa atividade ureolítica da solução, aproximadamente 17 vezes menor do que a do lisado bruto 03 (123,1 U L⁻¹). A reduzida intensidade do efeito PRE a campos altos, somada à baixa concentração do agente paramagnético, impossibilita a detecção da perturbação sobre a ressonância da água.

5 CONCLUSÃO

As estratégias inéditas para contornar os desafios apresentados para o levantamento de parâmetros relacionados à urease microbiana em lisados brutos de *Cryptococcus neoformans* foram altamente eficazes.

A enzima presente nos lisados proteicos apresentou atividade ureolítica suficiente aos objetivos do trabalho. Além disso, a atividade dos lisados na presença de azida de sódio 0,1% foi constante durante o período de dois meses de armazenamento a 4°C.

Os ensaios colorimétricos de inibição de atividade ureolítica dos lisados brutos por Tioidantoínas e Hidantoínas foram reveladores quando comparados com o comportamento dos mesmos ligantes frente ao modelo vegetal (urease de *C. ensiformis*), ressaltando as limitações das triagens de inibidores usando apenas a urease vegetal comercialmente disponível. Ambos os enantiômeros derivados da Tioidantoína derivada da Valina (**1** e **2**) apresentaram altos percentuais de inibição, enquanto que achados prévios demonstraram que o derivado da D-Valina apresenta baixa atividade inibitória. Contrariamente, a escassa capacidade de inibição apresentada pela Hidantoína (**3**) em ensaios contendo o lisado fúngico diverge dos seus altos percentuais inibitórios que observamos previamente contra a urease vegetal.

As medidas de velocidade de relaxação longitudinal (R_1) em experimentos de titulação (*PRE*) com o inibidor **1** demonstraram-se uma ferramenta valiosa e seletiva para investigações de interações de ligantes com urease presente nos lisados brutos. A interferência devido a *radiation damping* relatada em literatura, para medidas de R_1 em soluções com altas razões H_2O/D_2O foi mitigada pelo uso de valores de tempo de espera (d_1) incomumente curtos ($d_1=1 \times T_1$ da água) resultando em dados confiáveis com baixos desvios padrão. Com isto, foi possível se observar o decréscimo da velocidade de relaxação longitudinal da água em resposta à adição do ligante **1**, comprovando sua interação com o sítio ativo paramagnético da UCN presente nos lisados microbianos. Determina-se, portanto, que o sítio binuclear de Ni(II) da urease é um alvo paramagnético adequado para experimentos de *PRE*, tornando este trabalho o primeiro relato da utilização da técnica em estudos desta enzima, e representando importante contribuição aos estudos mecanísticos de inibidores ureolíticos por RMN.

As análises pelo experimento de STD demandaram a inclusão de etapas simples e de purificação parcial do lisado. Os interferentes predominantes, dimetilsulfóxido e glicerol (estabilizante de urease), dentre outros componentes de baixo peso molecular, foram eliminados por diálise. Neste processo, o glicerol foi substituído por outro estabilizante, a glicose, acrescentada no tampão de troca em concentrações cerca de 135 vezes menores. A liofilização dos lisados dialisados e ressuspensão com água deuterada forneceu a versão definitiva das soluções ureolíticas de *C. neoformans* com perfis espectrais compatíveis para o detalhamento do modo de interação dos inibidores por STD.

O perfil do mapeamento de epítomos do ligante **1** nas soluções ureolíticas reconstituídas em água deuterada foi similar ao obtido previamente para o composto em ensaio de STD da *C. ensiformis* purificada (modelo vegetal), o que, somado às porcentagens de inibição muito próximas, sugere a atribuição do efeito medido de STD à interação de **1** com a urease microbiana presente no meio. Além disso, as intensidades observadas para os sinais de STD sobre dois lotes distintos de lisados reconstituídos apresentaram uma correlação aritmética com as respectivas atividades ureolíticas, sugestiva de associação entre as duas variáveis. Portanto, tem-se ainda outra evidência da predominância da interação UCN-inibidor sobre o efeito STD observado.

O conjunto de resultados de STD e PRE permite concluir que os métodos de RMN explorados neste trabalho constituem uma abordagem confiável e seletiva para o estudo de ureases microbianas nativas em solução. A seletividade das respostas detectadas pela enzima de interesse indica que as técnicas utilizadas são capazes de romper a complexidade química do lisado proteico, atingindo a urease como único ou principal receptor-enzimático, sem que haja a necessidade de procedimentos complexos de purificação. Dessa forma, atesta-se o desenvolvimento de uma nova metodologia, ampliando o espectro do monitoramento de fenômenos de reconhecimento molecular por RMN para além do modelo vegetal com urease de *C. ensiformis* purificada.

REFERÊNCIAS

- 01 - MAZZEI, Luca *et al.* The Structure of the Elusive Urease–Urea Complex Unveils the Mechanism of a Paradigmatic Nickel-Dependent Enzyme. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 58, n. 22, p. 7415 –7419, 2019.
- 02 - REGO, Yuri *et al.* A review on the development of urease inhibitors as antimicrobial agents against pathogenic bacteria. **Journal of Advanced Research**, v. 13, p. 69-100, 2018.
- 03 – POLACCO, Joseph C.; HOLLAND, Mark A. Roles of Urease in Plant Cells. **International Review of Cytology**, v. 145, p. 65-103, 1993.
- 04 - 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**, v. 400, n. 03 p. 274–283, 2010.
- 05 - MOBLEY, Harry L.T.; MENDZ, George L.; HAZELL, Stuart L. **Helicobacter pylori: Physiology and Genetics**. 1^a ed. Washington (DC): ASM Press, 2001.
- 06 - KAPPAUN, Karine *et al.* Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – A review. **Journal of Advanced Research**, v. 13, p. 3–17, 2018.
- 07 - COX, G. M. *et al.* Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infect Immun.**, v. 68, n. 02, p. 443-448, 2000.
- 08 – CARLINI, Celia R.; LIGABUE-BRAUN, Rodrigo. Ureases as multifunctional toxic proteins: A review. **Toxicon**, v. 110, p. 90-109, 2016.
- 09 - SHI, Meiking *et al.* Real-time imaging of trapping and urease dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. **Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 05, p. 1683-1693, 2010.

10 - AMTUL, Z. *et al.* Chemistry and mechanism of urease inhibition. **Current medicinal chemistry**, v. 09, n. 14, p. 1323-1348, 2002.

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

12 - YAMADA, Tsuioshi; ABDALLA, Silvia Regina Stipp. Informações recentes para otimização da produção agrícola. **Informações Agronômicas**, v. 03, n. 117, p. 28, 2007.

13 - BRITO, Tiago O. *et al.* Design, syntheses and evaluation of benzoylthioureas as urease inhibitors of agricultural interest. **RSC Advances**, v. 05, n. 55, p. 44507–44515, 2015.

14 - CAMARGO, Priscila Goes *et al.* Thiohydantoin and hydantoin derived from amino acids as potent urease inhibitors: Inhibitory activity and ligand-target interactions. **Chemico-biological interactions**, v. 365, 110045, 2022.

15 - SADAT-EBRAHIMI, Seyed Esmail *et al.* Novel phenylurea-pyridinium derivatives as potent urease inhibitors: Synthesis, *in vitro*, and *in silico* studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1263, 133078, 2022.

16 - SOHRABI, Marzieh *et al.* Design and synthesis of novel nitrothiazolacetamide conjugated to different thioquinazolinone derivatives as anti-urease agents. **Scientific reports**, v. 12, n. 2003, 2022.

17 - WEATHERBURN, M.W. Phenol-Hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Anal. Chem.**, v. 39, p. 971–974, 1967.

18 – AFKHAMI, Abbas; NOROOZ-ASL, Rasoul. Micelle-Mediated Extraction and Spectrophotometric Determination of Ammonia in Water Samples utilizing Indophenol Dye Formation. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 19, n. 8, p. 1546-1552, 2008.

- 19 – SOOD, S. *et al.* **Comprehensive Biotechnology**. 1^a ed, v. 02, p. 151-164, 2011.
- 20 – MOLLER, Leandra *et al.* The role of *Cryptococcus laurentii* and mycorrhizal fungi in the nutritional physiology of *Lupinus angustifolius* L. hosting N₂-fixing nodules. **Plant and soil**, v. 409, p. 345-360, 2016.
- 21 – COLLINS, C.M.; D’ORAZIO, SE. Bacterial ureases: structure, regulation of expression and role in pathogenesis. **Molecular microbiology**, v. 09, n. 05, p. 907-913, 1993.
- 22 – ISLAM, Mohammed Shedadul; ARYASOMAYAJULA, Aditya; SELVAGANAPATHY, Ponnambalam Ravi. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. **Micromachines**, v. 8, n. 83, p. 1-27, 2017.
- 23 – JUNG, Eric H. *et al.* *Cryptococcus neoformans* releases proteins during intracellular residence that affect the outcome of the fungal-macrophage interaction. **European academy of microbiology**, v. 03, p. 1-12, 2022.
- 24 – ANDREW, Sarah M.; TITUS, Julie A.; ZUMSTEIN, Louis. Dialysis and concentration of protein solutions. **Curr Protoc Toxicol**, 2002.
- 25 – LEE, Eric K.; KOROS, W.J. **Encyclopedia of Physical Science and Technology**. 3^a ed, Academic Press, 2003.
- 26 – MIRBOD, F. *et al.* Purification and characterization of urease isolated from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. **Medical micology**, v. 40, p. 35-44, 2002.
- 27 – MARTINELLI, Anne H.S. *et al.* Soybean ubiquitous urease with purification facilitator: An addition to the moonlighting studies toolbox. **Process biochemistry**, v. 53, p. 245-258, 2017.
- 28 - ROWE, Michelle L; WAGSTAFF, Jane L.; HOWARD, Mark J. NMR in ligand binding studies. Em: **Modern NMR techniques for synthetic chemistry**. 1^a ed. Boca Raton: Taylor Francis *group*, 2015.

29 - CLARIDGE, Timothy D. W. **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry**. 3^a ed. Ed. Elsevier, 2016.

30 – BERTINI, Ivano *et al.* Water-Based Ligand Screening for Paramagnetic Metalloproteins. **Angew chem. Int. Ed.**, v. 47, p. 4537-4553, 2008.

31 - 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**, v. 137, n. 39, p. 12438–12441, 2015.

32 - Meyer, B. *et al.* Saturation transfer difference NMR spectroscopy for identifying ligand epitopes and binding specificities. Presente em: **Leucocyte trafficking: The role of fucosyltransferases and selectins**. Springer, S. p. 149-167, 2004.

33 - 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**, v. 97, p. 82–125, 2016.

34 – MAZZEI, Luca; MUSIANI, Francesco; CIURLI, Stefano. The structure-based reaction mechanism of urease, a nickel dependent enzyme: tale of a long debate. **J Biol Inorg Chem**, v. 25, n. 06, p. 829-845, 2020.

35 – OLECH, Zofia I. Electron paramagnetic resonance spectrum of crystalline jack bean urease. **Colloids and Surfaces A. Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 72, p. 365 367, 1993.

36 – CLARK, Patrick A.; WILCOX, Dean E. Magnetic Properties of the Nickel enzymes urease, Nickel-Substituted Carboxypeptidase A, and Nickel-Substituted Carbonic Anhydrase. **Inorganic Chemistry**, v. 28, n. 07, p. 1326-1333, 1989.

37 – Sigma-Aldrich Co. LCC. **Urease activity assay kit**, technical bulletin, 2013.

38 - 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. 07, p. 990–994, 2011.

39 – VAGANENTE, Vincent *et al.* Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. **Biochemistry**, v. 48, n. 46, p. 11084–11096, 2009.

40 – SHAYNIAN, B.A. *et al.* Intramolecular hydrogen bonds in the sulfonamide derivatives of oxamide, dithiooxamide, and biuret. FT-IR and DFT study, AIM and NBO analysis. **Tetrahedron**, v. 66, p. 8551-8556, 2010.

41 – HRUBARU, Madalina M. *et al.* Ni(II), Pd(II) and Pt(II) complexes of *N,N*-bis(3,3-dimethyl-allyl)-dithiocarbamate: Synthesis, spectroscopic characterization, antimicrobial and molecular docking studies. **Journal of molecular science**, v. 1250, n. 21, 131649, 2022.

42 - BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda, 2015.

43 – PAVIA, Donald L. *et al.* **Introduction to spectroscopy**. 4ª ed. Belmont: Brooks/Cole, Cengage Learning, 2008.

44 – LEUNG, Ivanhoe K.H. *et al.* Using NMR Solvent Water Relaxation to Investigate Metalloenzyme-Ligand Binding Interactions. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 867-875, 2010.

45 – KOILU, Mehmet Zafar. Temperature dependences of T1 and T2 of Residual Water in D2O determined at 400 MHz 1H-NMR. **International Journal of Science and Research**, v. 7, n. 10, p.40-42, 2018.