



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MARCIÉLI FABRIS

**TRIAGEM VIRTUAL DA QUIMIOTECA DO LASMMED E  
AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE POTENCIAIS INIBIDORES DE  
UREASES**

---

Londrina  
2023

MARCIÉLI FABRIS

**TRIAGEM VIRTUAL DA QUIMIOTECA DO LASMMED E  
AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE POTENCIAIS INIBIDORES DE  
UREASES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química – Área de concentração Química Orgânica, da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Marcelle de Lima Ferreira Bispo

Coorientador: Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Júnior

Londrina  
2023

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

Fabris, Marciéli .

Triagem virtual da quimioteca do LaSMMed e avaliação *in vitro* de potenciais inibidores de ureases / Marciéli Fabris. - Londrina, 2023.  
385 f. : il.

Orientador: Marcelle de Lima Ferreira Bispo.

Coorientador: Nailton Monteiro do Nascimento Júnior.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2023.

Inclui bibliografia.

1. Docagem molecular - Tese. 2. *Helicobacter pylori* - Tese. 3. *Cryptococcus neoformans* - Tese. 4. Atividade anti-ureolítica - Tese. I. Bispo, Marcelle de Lima Ferreira. II. Nascimento Júnior, Nailton Monteiro do . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU 54

MARCIÉLI FABRIS

**TRIAGEM VIRTUAL DA QUIMIOTECA DO LASMMED E  
AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE POTENCIAIS INIBIDORES DE  
UREASES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química – Área de concentração Química Orgânica, da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Química.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

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

---

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

---

Prof. Dra. Nelilma Correia Romeiro  
Universidade Federal do Rio de Janeiro –  
UFRJ

---

Prof. Dr. João Paulo dos Santos Fernandes  
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

Londrina, 24 de março de 2023.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida que me concede e por todas as oportunidades que me proporciona.

A Profa. Dra. Marcelle de Lima Ferreira Bispo, minha estimada orientadora e amiga que me acompanhou ao longo destes anos, compartilhando seus conhecimentos, com muita paciência e carinho, sendo inúmeras vezes minha inspiração e espelho de vida, muito obrigada. Você tem meu amor e gratidão eterna.

A minha família, em especial meus pais e irmãos, por todo o amor, carinho, suporte e confiança que depositam em mim, muito obrigada. As minhas irmãs que escolhi pra vida, Jéssica B. Carra e Gabrielle C. Calegari, vocês sempre foram meu suporte de todas as horas e minha gratidão será eterna a vocês por cada momento que compartilhamos. Quero que saibam que a cada taça, sorriso e lágrima compartilhada fizeram meus dias mais leves. Obrigada.

A todos da família LaSMMed, obrigada pelos conhecimentos trocados, pela parceria, paciência e músicas em nosso dia a dia. Por tudo que vocês representaram na minha formação como pessoa para um dia ser doutora, muito obrigada. Agradeço em especial aos meus amigos de longa data, Kaio Maciel, Priscila Carvalho e Gabriel Félix, vocês foram indispensáveis em minha vida, obrigada. Às pessoas que o LaSMMed me proporcionou conhecer e que em algum momento trabalharam comigo, espero ter impactado a vida de vocês de alguma forma como vocês impactaram a minha. Cada pessoa trás algo consigo para passar adiante, e todos vocês trouxeram algo pra mim. Obrigada.

A todos meus amigos, de perto e de longe, por todo o carinho e apoio, obrigada.

A todos os professores que de alguma forma contribuíram para a minha formação, muito obrigada. Em especial, Prof. Dr. Nailton M. Nascimento Júnior, pela coorientação ao longo destes anos, aos professores do LaSMMed, Profa. Dra. Carla C. Perez e Prof. Dr. Alexandre Orsato e a Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta pela parceria com o LaSMMed, muito obrigada.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa. A Universidade Estadual de Londrina, por todo o

investimento e espaço físico, em especial ao Programa de Pós Graduação em Química, por me aceitar a fazer parte de sua história, e a todos os professores vinculados ao departamento que compartilham seu conhecimento e tempo com todos os alunos, muito obrigada.

A todos os laboratórios da UEL que me auxiliaram ao longo desses anos. Em especial, agradeço o Laboratório de Propriedade e Síntese de Substâncias Orgânicas (LAPSSO) por compartilhar conosco equipamentos e reagentes; ao Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, pelo empréstimo de equipamentos e ensaios biológicos prestados; ao ESPEC – Laboratório de Espectroscopia, por todas as análises realizadas, obrigada.

Aos membros da banca, Prof. Dra. Anna Paola Butera; Prof. Dr. Henrique da Silva Lima; Prof. Dra. Nelilma Correia Romeiro e Prof. Dr. João Paulo dos Santos Fernandes, pelo aceite em fazer parte da banca e desta conquista pessoal que é o título de doutora em química, muito obrigada.

Por fim, agradeço imensamente a todos, sem exceção, que de uma forma ou outra contribuíram com a tese e o tornaram possível, meu eterno agradecimento.

"Vivendo, perigosamente, um dia de cada vez"  
(Bispo, M. L. F.)

"As palavras dizem alguma coisa"(Butera, A. P.)

"Rascunho de passaporte para o Inferno"  
(Rezende, J. L.)

"Não foi o melhor, mas também não foi o pior"  
(Fabris, M.)

"Utilizem com parcimônia" (Orsato, A.)

"Quem faz mal feito de primeira, tem trabalho dobrado" (Souza, M. V. N.)

"Temos que experimentar, avaliar e ajustar (e repetir esse ciclo)" (Orsato, A.)

"Diarreia mental" (Bispo, M. L. F.)

"Comer uma melancia numa sentada" (Félix, G.)

*Frases memoráveis desta jornada*

## RESUMO

FABRIS, Marciéli. **Triagem virtual da quimioteca do LaSMMed e avaliação *in vitro* de potenciais inibidores de ureases**. 2023. 385 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

*Helicobacter pylori* e *Cryptococcus* ssp são microrganismos patogênicos ureolíticos que causam diversos distúrbios no organismo hospedeiro e, em casos graves, o levam à morte. Ambas as infecções têm a enzima urease como fator chave de virulência, pois utilizam sua capacidade de produzir amônia para amenizar o pH inóspito ao qual estão submetidas. Nesse contexto, este trabalho tem como objetivo identificar e avaliar substâncias bioativas com potencial inibitório frente as ureases de *Cryptococcus neoformans* e *Helicobacter pylori*, por meio de uma triagem virtual baseada em docagem molecular. As estruturas tridimensionais das ureases utilizadas em neste estudo foram obtidas no banco de proteínas, sob os códigos de 4H9M, que corresponde a urease vegetal de *Canavalia ensiformis* (CEU), e 6ZJA que corresponde a enzima bacteriana de *H. pylori* (HPU). Como a estrutura tridimensional da urease de *C. neoformans* (CNU) ainda não foi determinada experimentalmente, a CEU foi utilizada em nosso estudo, devido à similaridade estrutural com a urease vegetal. As substâncias triadas virtualmente fazem parte de um espaço químico próprio do nosso grupo de pesquisa (quimioteca do LaSMMed) que contempla mais de 130 substâncias, com características estruturais distintas, e que apresentam potenciais grupos farmacofóricos para atividades antibacteriana e antifúngica. Assim, iniciou-se esse estudo com a análise estrutural do alvo molecular, para obter informações sobre sítios de ligação e características estruturais das duas ureases, seguido de validação do protocolo de docagem molecular, análise das interações ligante-proteína e determinação dos critérios de seleção das substâncias da quimioteca e, por fim, foram realizadas as avaliações *in vitro* das atividades anti-ureolíticas dessas substâncias. Assim, o critério de seleção utilizado para a CEU foi interação com seis resíduos de aminoácidos, especificamente I411, P434, H494, L595, E601 e D602, selecionados após análise das interações de 500 substâncias descritas na literatura como inibidoras da CEU, enquanto que para HPU utilizou-se como critério a interação das substâncias com os mesmos resíduos que interagem com o inibidor co-cristalizado com a enzima HPU. Dessa forma, dentro de uma quimioteca de 130 substâncias, foram selecionadas 18 substâncias, derivadas de cumariltioureas, cumarilamidas, indóis, tiazolidinonas, análogos de apocinina, cromonamidas e cinamoiltioureas, para serem avaliadas *in vitro* frente a CEU. Os resultados preliminares da porcentagem de inibição da atividade ureolítica das substâncias, indicaram o potencial da cinamoiltiourea monossubstituída como promissor inibidor da urease, com porcentagem de inibição acima de 80%. Considerando as análises e padrões observados, como tamanho do sítio ativo e padrão de inibição *in vitro*, foi sintetizada e avaliada uma pequena série de ariltioureas monossubstituídas como inibidoras da urease. Com porcentagem de inibição acima de 84% para CEU e acima de 90% para o extrato bruto de CNU, os derivados são potentes inibidores da urease. Assim determinamos que as tioureas monossubstituídas, cinamoiltiourea e ariltioureas, são as moléculas mais promissoras do nosso estudo. A complementariedade das análises ocorreu por meio

da determinação da metade da concentração inibitória máxima (IC<sub>50</sub>) nas ureases de *C. ensiformis* e extrato bruto de *C. neoformans*, determinação da cinética enzimática e análise *in silico* dos parâmetros físico-químicos e de semelhança a fármacos das substâncias líderes. As melhores substâncias apresentaram IC<sub>50</sub> de 0,41 mM para CEU e aproximadamente 0,34 mM para CNU. A cinamoiltioureia monossubstituída foi a substância que apresentou o maior potencial anti-ureolítico, com  $K_i$  de 0,06 mM, e mecanismo de inibição misto.

**Palavras-chave:** docagem molecular; *Cryptococcus neoformans*; *Helicobacter pylori*; *Canvalia ensiformis*, atividade anti-ureolítica; análise *in silico*.

## ABSTRACT

FABRIS, Marciéli. **Virtual screening of LaSMMed chemical library and *in vitro* evaluation of potential urease inhibitors**. 2023. 385 p. Doctoral Thesis (Doctorate in Chemistry) – Exact Sciences Center, Department of Chemistry, State University of Londrina, Londrina, 2023.

*Helicobacter pylori* and *Cryptococcus* spp are pathogenic ureolytic microorganisms that cause various disorders in the host organism and, in severe cases, lead to death. Both infections have the urease enzyme as a key virulence factor, as they use their ability to produce ammonia to reduce the inhospitable pH to which they are subjected. This work aims to identify and evaluate bioactive substances with inhibitory potential against ureases from *Cryptococcus neoformans* and *Helicobacter pylori*, through a virtual screening based on molecular docking. The ureases used in our study were obtained from the protein bank under the codes 4H9M, which corresponds to plant urease from *Canavalia ensiformis* (CEU), and 6ZJA corresponding to the bacterial enzyme of *H. pylori* (HPU). The three-dimensional structure of *C. neoformans* urease (CNU) has yet to be determined experimentally. Thus, due to the structural similarity with plant urease, CEU was used in this study. The substances virtually screened are part of a chemical space belonging to our research group (LaSMMed Chemical Library) that includes more than 130 substances, with distinct structural characteristics, as potential pharmacophoric groups for antibacterial and antifungal activities. Thus, this study began with the structural analysis of the molecular target to obtain information on binding sites and structural characteristics of the two ureases, followed by validation of the molecular docking protocol, analysis of ligand-protein interactions, and determination of selection criteria for the substances, and *in vitro* evaluation of the anti-ureolytic activity of these substances. Thus, the selection criterion used for CEU was interaction with six amino acid residues, specifically I411, P434, H494, L595, E601, and D602, selected after analyzing the interactions of 500 substances described in the literature as CEU inhibitors, while for HPU was used as a criterion the interaction of substances with the identical residues that interact with the co-crystallized inhibitor with the HPU enzyme. Thus, within a chemotherapy library of 130 substances, 18 substances were selected, derived from coumarylthioureas, coumarylamides, indoles, thiazolidinones, apocynin analogues, chromonamides and cinnamoylthioureas, to be evaluated *in vitro* against *C. ensiformis* urease. Preliminary results of the inhibition percentage of the ureolytic activity of the substances indicate the potential of monosubstituted cinnamoylthiourea as a promising urease inhibitor, with an inhibition percentage above 80%. Considering these analyzes and patterns, such as active site size and *in vitro* inhibition pattern, a small series of monosubstituted arylthioureas were synthesized and evaluated as urease inhibitors. With inhibition percentage above 84% for CEU and above 90% for crude cell-free CNU, the derivatives are potent urease inhibitors. Thus, we determined that the monosubstituted thioureas, cinnamoylthiourea and arylthioureas, are the most promising molecules in our study. The complementarity analysis occurred through the determination of the half-maximum inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) in the *C. ensiformis* urease and crude cell-free extract of *C. neoformans*, determination of the enzymatic kinetics and *in silico* analysis of the physicochemical and *drug-likeness* parameters of the lead compounds. The best substances showed an IC<sub>50</sub> of 0.41 mM for CEU and approximately 0.34 mM for CNU.

Monosubstituted cinnamoylthiourea was the substance that showed the highest antiureolytic potential, with a  $K_i$  of 0.06 mM and a mixed inhibition mechanism type.

**Key-words:** molecular docking; *Cryptococcus neoformans*; *Helicobacter pylori*; *Canvalia ensiformis*; anti-ureolytic potential; *in silico* analysis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Substâncias usadas como opção de tratamento de primeira linha para infecção por <i>H. pylori</i> .....	26
<b>Figura 2</b> – Infecção criptocócica típica e disseminação para o sistema nervoso central.....	28
<b>Figura 3</b> – Substâncias e tratamento recomendado em casos de meningite criptocócica (OMS).....	30
<b>Figura 4</b> – Estrutura cristalográfica de ureases de (A) <i>K. aerogenes</i> e (B) <i>H. pylori</i> .....	32
<b>Figura 5</b> – (A) Estrutura cristalográfica do CEU e (B) Representação tridimensional do seu sítio ativo .....	33
<b>Figura 6</b> – Melhores substâncias das séries planejadas por Liu et al. (2018), derivadas do ácido 3-(3-clorofenil)-3-hidroxiopropionilhidroxâmico (10), com seus respectivos valores de IC <sub>50</sub> contra HPU .....	36
<b>Figura 7</b> – Modificações realizadas por Yang et al. (2018) em uma série de derivados de oxoindolina (14) com seus respectivos valores de IC <sub>50</sub> contra HPU .....	37
<b>Figura 8</b> – Algumas das modificações realizadas na Diosmina por Kataria e Khatkar (2019) com seus respectivos valores de IC <sub>50</sub> contra CEU.....	38
<b>Figura 9</b> – Atividade inibitória de urease das melhores tioureias <i>N</i> -monosubstituídas (18) sintetizadas por Li et al. (2020).....	39
<b>Figura 10</b> – Melhores derivados de PMT (20, 21 e 22) e seus respectivos valores de CIM contra cepas de <i>H. pylori</i> (suscetível e resistente ao metronidazol - ATCC43504, CCPMAP160007, CCPMAP160008, CCPMAP160010, CCPMAP160011, CCPMAP160017).....	40
<b>Figura 11</b> – Compostos selecionados por Imran et al. (2020) com seus respectivos valores de IC <sub>50</sub> em relação à CEU .....	42
<b>Figura 12</b> – Planejamento utilizado por Rezaei et al., (2021) na síntese de derivados de metronidazol-1,2,3-triazol e a melhor substância da série (34) com seus respectivos valores de IC <sub>50</sub> como inibidores de HPU.....	43

<b>Figura 13</b> – Identificação e atividade inibitória dos melhores híbridos de dihidropirimidina e ácido hidroxâmico (37 e 38) contra urease de <i>H. pylori</i> .....	44
<b>Figura 14</b> – Compostos projetados por Sohrabi et al. 2022 e seu potencial como inibidores de urease (IC <sub>50</sub> ).....	46
<b>Figura 15</b> – Resumo gráfico das melhores substâncias antiureolíticas apresentadas no tópico.....	47
<b>Figura 16</b> – Diversidade estrutural da quimioteca do LaSMMed.....	53
<b>Figura 17</b> – Derivados do carvacrol presentes na quimioteca do LaSMMed.....	53
<b>Figura 18</b> – Cumarilamidas presentes na quimioteca do LaSMMed.....	54
<b>Figura 19</b> – Derivados indólicos presentes na quimioteca do LaSMMed.....	55
<b>Figura 20</b> – Oxazoladinonas presentes na quimioteca do LaSMMed.....	55
<b>Figura 21</b> – Tiazoladinonas presentes na quimioteca do LaSMMed.....	56
<b>Figura 22</b> – Cromonas presentes na quimioteca do LaSMMed.....	56
<b>Figura 23</b> – Derivados de apocinina presentes na quimioteca do LaSMMed.....	57
<b>Figura 24</b> – Derivados do ácido cinâmico presentes na quimioteca do LaSMMed.....	58
<b>Figura 25</b> – Derivados de hidantoínas e tiohidantoínas presentes na quimioteca do LaSMMed.....	58
<b>Figura 26</b> – Exemplo de espectro de RMN de <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz) obtido para a substância LaSMMed 34.....	62
<b>Figura 27</b> – Exemplo de espectro de RMN de <sup>13</sup> C (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz) obtido para a substância LaSMMed 34.....	63
<b>Figura 28</b> – Exemplo de espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) obtido para a substância LAPSSO 210.....	65
<b>Figura 29</b> – Exemplo de espectro de RMN de <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) obtido para a substância LAPSSO 210.....	66
<b>Figura 30</b> – Parte do alinhamento da sequência de aminoácidos entre as cadeias de CEU, CNU e HPU.....	67
<b>Figura 31</b> – Mapeamento global (FTMap) da CEU.....	69
<b>Figura 32</b> – Mapeamento global (FTMap) da HPU.....	70
<b>Figura 33</b> – Três sítios de ligação identificados pelo FTSite da CEU (PDB: 4H9M) e os resíduos de aminoácidos que circundam esses sítios a 5 Å de distância.....	71

<b>Figura 34</b> – Sítios de ligação identificados pelo FTSite da cadeia B da HPU (PDB: 6ZJA) e os resíduos de aminoácidos que circundam esses sítios a 5 Å de distância .....	72
<b>Figura 35</b> – Os sítios ativos identificados pelo FTSite: CEU (malha azul) e HPU (malha salmão e verde) juntamente com as estruturas 2D dos ligantes (HAE e DJM) co-cristalizados com as respectivas ureases .....	73
<b>Figura 36</b> – Interações do HAE com o sítio ativo da CEU.....	74
<b>Figura 37</b> – Aproximação do HAE com os Ni <sup>2+</sup> do sítio ativo da CEU.....	78
<b>Figura 38</b> – Representação gráfica das interações da cumariltioureia (LaSMMed 13) com os resíduos do sítio ativo da CEU.....	86
<b>Figura 39</b> – Interações das cumarilamidas LaSMMed 16 e 22 com os resíduos do sítio ativo da CEU. LaSMMed 16 e 22 correspondem a sobreposição das estruturas .....	87
<b>Figura 40</b> – Interações dos derivados indólicos (LaSMMed 30, 33, 34, 35 e 37) com a CEU. A última imagem corresponde a sobreposição das cinco estruturas .....	89
<b>Figura 41</b> – Representação gráfica da interação do derivado tiazolidinona (LaSMMed 49) com os resíduos do sítio ativo da CEU.....	91
<b>Figura 42</b> – Interação do análogo da apocinina LaSMMed 69 com a CEU.....	92
<b>Figura 43</b> – Representação gráfica das possíveis interações das cromonas LaSMMed 72 e 73 com os resíduos do sítio ativo da CEU. LaSMMed 72 e 73 correspondem a sobreposição das estruturas entre si e com os derivados cumarínicos LaSMMed 16 e 22 .....	93
<b>Figura 44</b> – Simplificação estrutural da urease de <i>H. pylori</i> para os cálculos de docagem molecular e interação do DJM com o sítio ativo da HPU.....	95
<b>Figura 45</b> – Comparação entre as interações do DJM co-cristalizado (em preto) com a pose obtida pela redocagem (em verde) com o sítio ativo da HPU .....	96
<b>Figura 46</b> – Substâncias da quimioteca do LaSMMed selecionadas no processo de triagem virtual como possíveis inibidores da urease de <i>H. pylori</i> .....	98

<b>Figura 47</b> – Representação gráfica das interações da cumariltioureia (LaSMMed 13) com a urease HPU (6ZJA).....	100
<b>Figura 48</b> – Interações das substâncias LAPSSO 203, 206 e 208 com a HPU e sobreposição das três das substâncias no sítio ativo.....	102
<b>Figura 49</b> – Interações das substâncias LAPSSO 210 – 212 com a HPU e sobreposição das três das substâncias no sítio ativo .....	103
<b>Figura 50</b> – Série de ariltioureias sintetizadas.....	107
<b>Figura 51</b> – Exemplo de espectro de RMN de $^1\text{H}$ (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) obtido para a substância LaSMMed 77.....	108
<b>Figura 52</b> – Exemplo de espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (DMSO- $d_6$ , 100 MHz) obtido para a substância LaSMMed 77 .....	109
<b>Figura 53</b> – Interações das substâncias LaSMMed 77 – 81 com a CEU e sobreposição das cinco substâncias no sítio ativo.....	112
<b>Figura 54</b> – Interações das substâncias LaSMMed 77 – 81 com a HPU e sobreposição das cinco substâncias no sítio ativo.....	115
<b>Figura 55</b> – Resumo gráfico dos tipos de interações enzimáticas com o substrato (S) e substâncias inibidoras (I) e definições de diferentes modalidades de inibição .....	118
<b>Figura 56</b> – Gráfico hiperbólico do LAPSSO 208 como exemplificação do comportamento de Michaelis-Menten na catálise enzimática da urease .....	120
<b>Figura 57</b> – Gráficos de Lineweaver-Burk para as substâncias líderes na presença a (●) 0,50 mM e (■) 0,25 mM de inibidor e na ausência (*) deles.....	121

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	– Melhor função de pontuação em termos de menor valor de RMSD e maior número de interações, para as 16 possibilidades de tautômeros das histidinas.....	76
<b>Tabela 2</b>	– Redocagem do HAE, considerando a combinação 16 de possíveis tautômeros para as histidinas.....	76
<b>Tabela 3</b>	– Faixa de inibição (IC <sub>50</sub> ) das estruturas pesquisadas na literatura .....	79
<b>Tabela 4</b>	– Porcentagem de interação (%) das moléculas relatadas na literatura, com os resíduos de aminoácido presentes na região do sítio ativo da CEU (4H9M).....	80
<b>Tabela 5</b>	– Porcentagem de interação das substâncias da quimioteca do LaSMMed com os resíduos de aminoácido da CEU .....	82
<b>Tabela 6</b>	– Atividade inibitória das substâncias selecionadas na triagem virtual e tioureia (2,0 mM) frente a CEU (0,0035 mM).....	105
<b>Tabela 7</b>	– Atividade inibitória das ariltioureias (2,0 mM) frente a CEU (0,0035 mM).....	109
<b>Tabela 8</b>	– Determinação do IC <sub>50</sub> das substâncias líderes LAPSSO 208 e LaSMMed 77-81 frente a CEU (0,0035 mM).....	116
<b>Tabela 9</b>	– Parâmetros cinéticos das substâncias líderes na CEU .....	122
<b>Tabela 10</b>	– Atividade inibitória das substâncias selecionadas na triagem virtual e tioureia (2,0 mM) frente ao extrato bruto de urease de <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	124
<b>Tabela 11</b>	– Determinação do IC <sub>50</sub> das substâncias líderes LAPSSO 208 e LaSMMed 77-81 frente ao extrato bruto de CNU .....	125
<b>Tabela 12</b>	– Propriedades físico-químicas das substâncias selecionadas no processo de triagem virtual .....	127
<b>Tabela 13</b>	– Parâmetros preditos de farmacocinética para as substâncias líderes .....	128

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Estruturas das substâncias da quimioteca do LaSMMed selecionadas por meio da triagem virtual devido a interação com os resíduos de aminoácido chave .....83
- Quadro 2** – Interação em cores das substâncias selecionadas (LaSMMed 13, 16, 22, 30, 33 - 35) com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da CEU .....84
- Quadro 3** – Interação em cores das substâncias selecionadas (LaSMMed 37, 49, 69, 72, 73) com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da CEU .....85
- Quadro 4** – Interações observadas entre as substâncias selecionadas com a HPU .....98
- Quadro 5** – Interações em forma de cores entre as ariltioureias com a CEU .....111
- Quadro 6** – Interações em forma de cores entre as ariltioureias com a HPU .....114

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

4H9M	Código PDB da estrutura da urease de <i>Canavalia ensiformis</i> obtida por difratometria de raios-X
6ZJA	Código PDB da estrutura da urease de <i>Helicobacter pylori</i> obtida por difratometria de raios-X
ASP	Potencial Estatístico Astex ( <i>Astex Statistical Potential</i> )
BHE	Barreira hematoencefálica
CADD	Métodos computacionais no desenho de fármacos ( <i>Computer-Aided Drug Design</i> )
CEU	Urease de <i>Canavalia ensiformis</i>
ChemPLP	Potencial linear por partes ( <i>Piecewise Linear Potential</i> )
CIM	Concentração inibitória mínima ( <i>Minimum Inhibitory Concentration - MIC</i> )
CME	Cisteína modificada (S,S-(2-hidroxietil)tiocisteína)
CNU	Urease de <i>Cryptococcus neoformans</i>
DJM	Código designado pelo PDB para a estrutura 2-[[1-(3,5-dimetilfenil)-1H-imidazol-2-il]sulfanil]-N-hidroxiacetamida
ERG	Grupo doador de elétrons ( <i>Electron Donating Group</i> )
EWG	Grupo retirador de elétrons ( <i>Electron Withdrawing Group</i> )
GA	Algoritmo genético ( <i>Genetic Algorithm</i> )
HAE	Ácido acetohidroxâmico
IC <sub>50</sub>	Metade da concentração inibitória máxima ( <i>Half-maximal Inhibitory Concentration – IC<sub>50</sub></i> )
JBU	<i>Jack bean urease</i>
KCX	Lisina carboxilada
K <sub>i</sub>	Constante de dissociação do complexo enzima-inibidor
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis
LaSMMed	Laboratório de Síntese de Moléculas Mediciniais
LAPSSO	Laboratório de Propriedades e Síntese de Moléculas Mediciniais
LBDD	Desenho de fármacos baseados no ligante ( <i>Ligand Based Drug Design</i> )
PDB	Banco de dados de proteínas ( <i>Protein Data Bank</i> )

PM7	Método Paramétrico 7 ( <i>Parametric Method 7</i> )
pH	Potencial hidrogeniônico
ROCS	Sobreposição Rápida da Estrutura Química ( <i>Rapid Overlay of Chemical Structure</i> )
RMSD	Desvio quadrático médio ( <i>Root Mean Square Deviation</i> )
SBDD	Desenho de fármacos baseados na estrutura ( <i>Structure Based Drug Design</i> )
V <sub>max</sub>	Velocidade máxima de reação

## LISTA DE SÍMBOLOS DOS AMINOÁCIDOS

- A - Alanina
- C - Cisteína
- D - Aspartato (ácido aspártico)
- E - Glutamato (ácido glutâmico)
- F - Fenilalanina
- G - Glicina
- H - Histidina
- I - Isoleucina
- K - Lisina
- L - Leucina
- M - Metionina
- N - Asparagina
- P - Prolina
- Q - Glutamina
- R - Arginina
- S - Serina
- T - Treonina
- V - Valina
- W - Triptofano
- Y - Tirosina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	24
1.1	MICROORGANISMOS UREOLÍTICOS PATOGÊNICOS.....	24
1.1.1	Infecção por <i>Helicobacter pylori</i> .....	24
1.1.2	Infecção por <i>Cryptococcus spp</i> .....	26
1.2	UREASES: BREVE HISTÓRIA, CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIIS E CATALÍTICAS.....	31
1.3	SUBSTÂNCIAS INIBIDORAS DE UREASE COM ENSAIOS FENOTÍPICOS .....	35
1.4	MÉTODOS COMPUTACIONAIS NO DESENHO DE FÁRMACOS .....	47
1.4.1	Docagem Molecular.....	48
1.5	APRESENTAÇÃO DO ESPAÇO QUÍMICO – QUIMIOTECA DO LASMMED .....	52
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	59
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	59
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	60
3.1	EXPANSÃO DA QUIMIOTECA DO LASMMED .....	60
3.1.1	Síntese e Caracterização dos Derivados Indólicos .....	60
3.1.2	Síntese e Caracterização dos Derivados de Tiourea do Ácido Cinâmico.....	63
3.2	UREASE COMO ALVO MOLECULAR .....	66
3.2.1	Similaridade das Ureases.....	66
3.2.2	Mapeamento dos Sítios de Ligação das Ureases de <i>H. pylori</i> e <i>C. ensiformis</i> .....	67
3.3	UREASE DE <i>CANAVALIA ENSIFORMIS</i> .....	73
3.3.1	Validação da Docagem Molecular .....	75
3.3.2	Triagem Virtual .....	77
3.4	UREASE DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i> .....	94
3.4.1	Validação da Docagem Molecular .....	95
3.4.2	Triagem Virtual .....	97
3.5	ENSAIO <i>IN VITRO</i> PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIUREOLÍTICA DAS SUBSTÂNCIAS NA UREASE DE <i>CANAVALIA ENSIFORMIS</i> .....	103

3.6	PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE ARILTIOUREIAS COMO INIBIDORAS DE UREASE.....	106
3.6.1	Síntese e Caracterização das Ariltioureias.....	106
3.6.2	Ensaio <i>in vitro</i> na Urease de <i>Canavalia ensiformis</i> .....	109
3.6.3	Docagem Molecular das Ariltioureias.....	110
3.6.3.1	Urease de <i>Canavalia ensiformis</i> .....	110
3.6.3.2	Urease de <i>Helicobacter pylori</i> .....	113
3.7	AVALIAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS LÍDERES EM PARÂMETROS DE POTÊNCIA COMO IC <sub>50</sub> E K <sub>i</sub> .....	116
3.7.1	Determinação da Metade da Concentração Inibitória Máxima (IC <sub>50</sub> ) em CEU.....	116
3.7.2	Cinética Enzimática e Determinação da Constante de Inibição (K <sub>i</sub> ).....	117
3.8	INIBIÇÃO ENZIMÁTICA E IC <sub>50</sub> EM EXTRATO BRUTO DE UREASE DE <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i> .....	123
3.9	ANÁLISE IN SÍLICO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FARMACOCINÉTICAS DAS SUBSTÂNCIAS PROMISSORAS.....	126
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>130</b>
4.1	PROCEDIMENTOS GERAIS.....	130
4.2	MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO.....	130
4.3	SÍNTESE DOS INDÓIS, ARILTIOUREIAS E DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO PRESENTES NA QUIMIOTECA DO LASMMED.....	130
4.3.1	Procedimento Geral para a Síntese dos Derivados Indólicos ( <b>LaSMMed 34-36, 74</b> ).....	130
4.3.1.1	Procedimento para a síntese do éster indólico <b>LaSMMed 34</b> .....	132
4.3.2	Procedimento Geral para a Síntese das Ariltioureias ( <b>LaSMMed 77-81</b> ).....	133
4.3.3	Procedimento Geral para a Síntese dos Derivados do Ácido Cinâmico ( <b>LAPSSO 203-212</b> ).....	135
4.4	SERVIDOR FTMAP E FTSITE.....	139
4.5	TRIAGEM VIRTUAL.....	139
4.5.1	<i>Hardware</i> Utilizado.....	139
4.5.2	Obtenção e Preparação das Estruturas Tridimensionais.....	139
4.5.3	Preparação dos Ligantes.....	140

4.5.3.1	Ligantes descritos na literatura.....	140
4.5.4	Docagem Molecular.....	141
4.5.4.1	<i>Canavalia ensiformis</i> .....	141
4.5.4.2	<i>Helicobacter pylori</i> .....	142
4.6	PREPARO E OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE UREASE DE <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i> .....	142
4.6.1	Microrganismo e Condições de Cultura.....	142
4.6.2	Obtenção do Extrato Bruto de Urease.....	143
4.7	ENSAIOS ENZIMÁTICOS .....	144
4.7.1	Inibição Enzimática e Determinação do IC <sub>50</sub> com Urease de <i>Canavalia ensiformis</i> .....	144
4.7.2	Inibição Enzimática e Determinação do IC <sub>50</sub> com Extrato Bruto de Urease de <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	145
4.7.3	Cinética Enzimática .....	145
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	146
4.9	PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i> DE PROPRIEDADES DE FÁRMACO-SIMILARIDADE E PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS .....	146
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>147</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 MICRORGANISMOS UREOLÍTICOS PATOGÊNICOS

### 1.1.1 Infecção por *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* é uma bactéria flagelada e Gram-negativa, caracterizada por uma forma espiralada que pode colonizar o estômago humano e induzir a inflamação da mucosa gástrica. A infecção causada por essas bactérias pode levar a vários distúrbios gastrointestinais, como gastrite crônica, úlcera gástrica, úlcera duodenal, adenocarcinoma gástrico, linfoma do tecido linfoide associado à mucosa (MALT – do inglês: *mucosa-associated lymphoid tissue*) e câncer gástrico (CHO *et al.*, 2021; KUSTERS *et al.*, 2006).

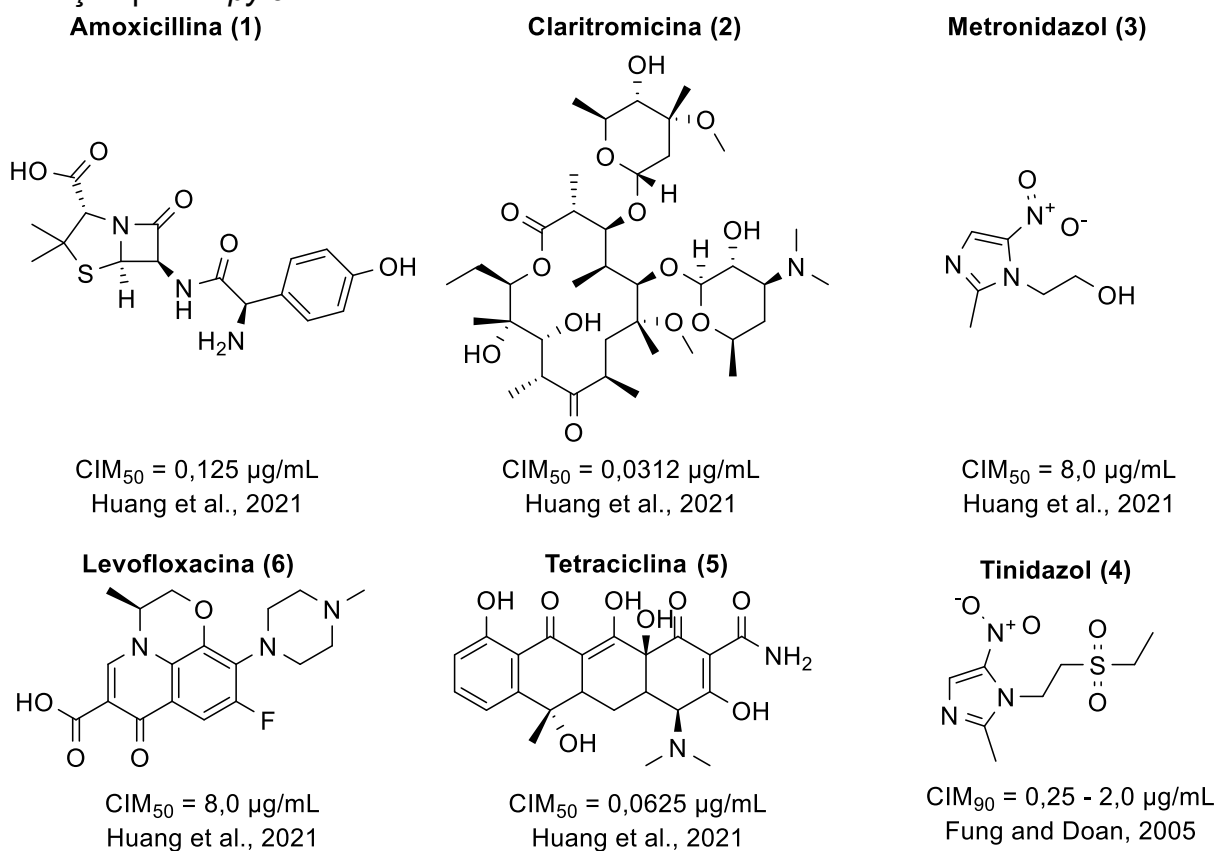
A colonização e patogênese crítica do *H. pylori* começa com a necessidade de se adaptar às condições inóspitas do estômago para colonizar essa área. O principal fator responsável por essa adaptação é a capacidade de expressar grandes quantidades de uma enzima, chamada urease, que hidrolisa a ureia em amônia e fornece um pH citoplasmático e periplasmático neutro, o que permite que essa bactéria sobreviva e persista no estômago (ALEXANDER *et al.*, 2021). Após o ajuste, inicia-se a motilidade mediada por flagelos em direção às células do epitélio da mucosa gástrica, ligando-se aos receptores do hospedeiro por adesinas e, em seguida, causando danos tecidual pela liberação de toxinas (KAO *et al.*, 2016).

Em 2015, estimou-se que aproximadamente 4,4 bilhões de indivíduos tiveram a infecção por *H. pylori*. No entanto, estima-se que mais da metade da população mundial esteja infectada, mas apenas uma pequena fração de indivíduos, entre 10 a 20%, desenvolve doenças gástricas graves, enquanto a maioria permanece assintomática (HOOI *et al.*, 2017). Além disso, a maior prevalência de casos é em países e regiões de baixa renda, como África (79,1%), América Latina e Caribe (63,4%) e Ásia (54,7%), enquanto nos países desenvolvidos, a infecção por *H. pylori* é mais comum em idosos (HOOI *et al.*, 2017). Em crianças, estima-se que 32,4% da população mundial esteja infectada e que a porcentagem de infecção tende a aumentar com a idade (YUAN *et al.*, 2022).

A infecção por *H. pylori* é considerada como um fator de alto risco para câncer gástrico e foi reconhecida e classificada como carcinógeno humano (Grupo 1) pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC – do inglês: *International Agency for Research on Cancer*) da Organização Mundial da Saúde (OMS) (IARC MONOGRAPHS, 2012). Em 2020, as estatísticas demonstraram que o câncer de estômago está entre os cinco tipos de câncer mais comuns em todo o mundo, com estimativas de 1.089.103 novos casos e 768.793 mortes (SUNG *et al.*, 2021). É considerado que 8 em 10 casos de câncer gástrico estejam relacionados a infecção por *H. pylori* (DE MARTEL *et al.*, 2020). Ainda, alguns estudos mostraram que o *H. pylori* pode interferir em muitos processos biológicos, como manifestações extra-gastroduodenais, como anemia, deficiência de vitamina B12, diabetes mellitus e doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas, doenças das artérias coronárias, doenças cerebrovasculares, e outros (TSAY; HSU, 2018).

Erradicar esta infecção é possível, mas difícil devido à resistência aos antibióticos. Em geral, terapias triplas ou quádruplas com diferentes combinações de antibióticos são aplicadas como tratamento (Figura 1). O tratamento de primeira linha começa com dois antibióticos, amoxicilina (**1**) e claritromicina (**2**), geralmente administrados em conjunto com um inibidor da bomba de prótons (IBP), como lansoprazol, omeprazol ou pantoprazol, por 14 dias (CHEY *et al.*, 2017; DIACONU *et al.*, 2017). Em casos de resistência do *Helicobacter pylori* à **2** ou exposição prévia a este medicamento ou a outros antibióticos quimicamente semelhantes, substitui-se por metronidazol (**3**) ou tinidazol (**4**) (CHEY *et al.*, 2017; DIACONU *et al.*, 2017). Nos casos de resistência, aplica-se a terapia quádrupla com subsalicilato de Bismuto e tetraciclina (**5**), além de IBP e um nitroimidazol por 10 a 14 dias (CHEY *et al.*, 2017; DIACONU *et al.*, 2017). Uma terapia sequencial pode ser usada com IBP e **1** por 5-7 dias, seguido por IBP, **2** e um nitroimidazol por 5-7 dias também é um tratamento de primeira linha (CHEY *et al.*, 2017). Finalmente, outro tratamento de primeira linha é a terapia tripla com levofloxacina (**6**) em vez de **2** ou nitroimidazol, IBP + levofloxacina + amoxicilina (**1**) por 10-14 dias (CHEY *et al.*, 2017).

**Figura 1** – Substâncias usadas como opção de tratamento de primeira linha para infecção por *H. pylori*



**Fonte:** o próprio autor (FUNG; DOAN, 2005; HUANG *et al.*, 2021)

Apesar da disponibilidade de algumas opções de tratamento, a alta resistência aos antibióticos e os graves efeitos adversos relatados durante o tratamento da infecção, principalmente cefaleia, náuseas, mal-estar, gosto metálico, desconforto epigástrico e diarreia (HAFEEZ *et al.*, 2021; SALCEDO; AL-KAWAS, 1998), a busca de novas formas de tratamento, com o desenvolvimento de substâncias mais seguras e eficazes, é urgente e necessário.

### 1.1.2 Infecção por *Cryptococcus* spp

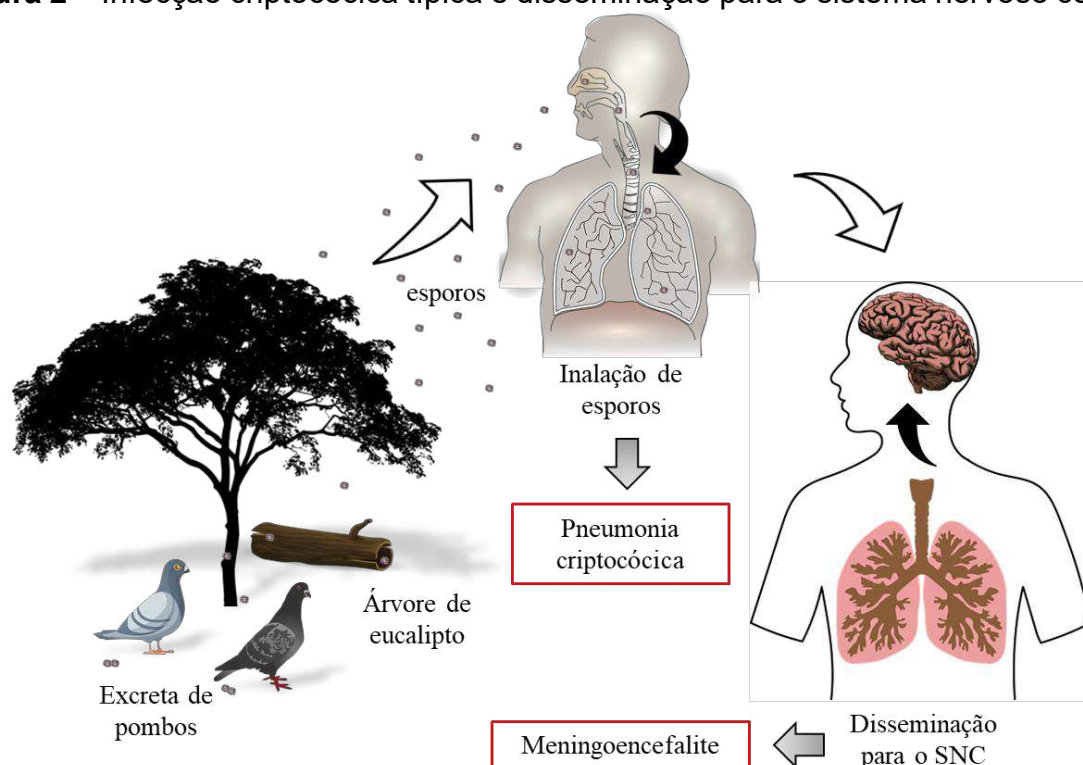
A criptococose é uma infecção oportunista causada principalmente por duas espécies de leveduras, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Com uma identidade genômica de aproximadamente 85% entre as espécies, esses patógenos compartilham muitas semelhanças, como na morfologia das células, mas apresentam diferenças na distribuição geográfica e nas manifestações clínicas (CHANG *et al.*, 2015; GUSHIKEN *et al.*, 2021). O primeiro é onipresente no meio

ambiente e normalmente encontrado no solo, árvores, e excrementos de pombos e outras aves em todo o mundo. Ao mesmo tempo, *C. gatti* é mais provável de ser encontrado em vegetações, como árvores de eucalipto, e não é tão disseminado globalmente como *C. neoformans*, sendo encontrado principalmente em áreas endêmicas da América (Norte e Sul) e Austrália (SETIANINGRUM *et al.*, 2019).

A infecção criptocócica geralmente começa pela inalação de esporos ou pequenas células da levedura, que atingem as vias aéreas inferiores e se depositam nos alvéolos pulmonares (GUSHIKEN *et al.*, 2021). Depois disso, as defesas respiratórias e imunológicas, como macrófagos e células dendríticas, iniciam o processo de fagocitose (GUSHIKEN *et al.*, 2021). Este processo infeccioso normalmente se comporta de forma assintomática, podendo posteriormente ser eliminado, porém, como é considerado um organismo intracelular facultativo, o fungo pode permanecer de forma latente no interior da célula fagocítica, vivendo ali por longos períodos e, em alguns casos, ser reativado diante de um quadro de imunossupressão, escapando da fagocitose por extrusão (ZARAGOZA, 2019). Assim, o *Cryptococcus* pode evadir dos pulmões causando infecção em uma grande variedade de tecidos, como pele e olhos, ou atingir o sistema nervoso central (SNC), causando meningoencefalite (GUSHIKEN *et al.*, 2021) (Figura 2). As manifestações pulmonares podem evoluir para pneumonia com síndrome do desconforto respiratório agudo e, até mesmo, para meningite criptocócica, manifestação extrapulmonar mais frequente e grave.

Dentre os principais fatores de virulência que contribuem para a proliferação e infecção do *Cryptococcus*, destaca-se: a termorresistência, de modo que o fungo pode sobreviver e crescer em altas temperaturas (37 °C) e, por isso, pode infectar vários animais; a cápsula polissacarídica, que promove efeitos protetores frente ao sistema imunológico do hospedeiro; a produção de pigmentos de melanina nas paredes celulares, prevenindo o estresse oxidativo; e a produção de enzimas extracelulares, como proteases, lipases e ureases (ZARAGOZA, 2019).

**Figura 2** – Infecção criptocócica típica e disseminação para o sistema nervoso central



**Fonte:** o próprio autor

O papel da urease na sobrevivência do *Cryptococcus* é fundamentalmente semelhante ao do *H. pylori*. No entanto, ao invés de neutralizar o ambiente para a adaptação do patógeno, a urease neutraliza o pH ácido gerado no processo de fagocitose, o que retarda a replicação da levedura, causando menos danos aos macrófagos e prolongando a residência intracelular, promovendo assim a saída dos macrófagos sem matar as células hospedeiras (extrusão) (FU *et al.*, 2018). Além disso, alguns estudos mostraram que a persistência do patógeno dentro dos macrófagos é uma maneira pela qual ele pode atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) (OLSZEWSKI *et al.*, 2004; SINGH *et al.*, 2013). Estudos mais recentes mostram que a urease está associada à regulação de importantes vias metabólicas, como no metabolismo de poliaminas, como a putrescina e a espermidina, de modo que as células deficientes em urease diminuem a síntese das enzimas biossintéticas de poliaminas que, conseqüentemente, impacta no desenvolvimento e crescimento celular do patógeno (TOPLIS *et al.*, 2020, 2021).

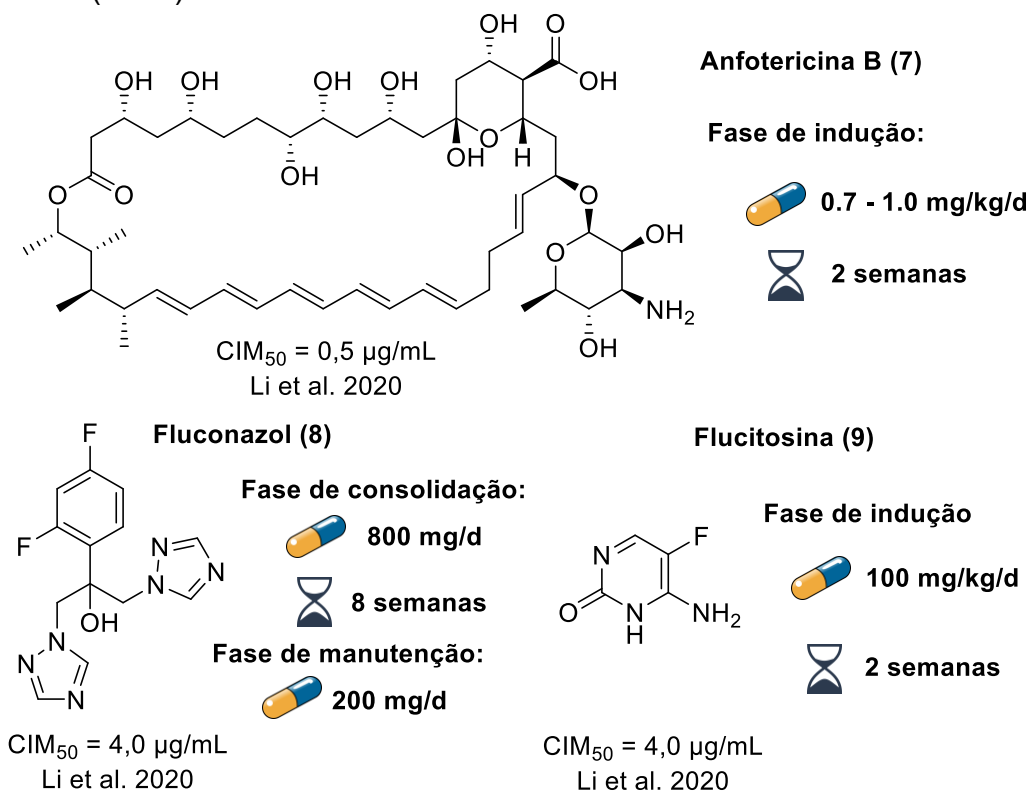
A gravidade da infecção criptocócica é um equilíbrio entre o patógeno e o sistema imunológico do hospedeiro. Esta infecção raramente resulta em doença

cl clinicamente invasiva na população em geral, mas é um problema significativo em pacientes imunocomprometidos (ZARAGOZA, 2019). De fato, quando o sistema imunológico está comprometido, a virulência da criptococose é maior do que o habitual, como por exemplo, em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), e naqueles que fizeram transplante de órgãos ou fazem uso de tratamentos imunossupressores. Segundo a OMS, estima-se que ocorram mais de 223.000 casos de meningite criptocócica a cada ano entre pessoas com HIV e que 181.000 morram, o que representa 15% de todas as mortes relacionadas à AIDS em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Ademais, com a pandemia de COVID-19 e o uso da terapia imunomoduladora para tratar os pacientes, a co-infecção de pacientes sem HIV por criptococose aumentou nos últimos anos e, infelizmente, a maioria com desfechos trágicos (GHANEM; SIVASUBRAMANIAN, 2021; ISAAC *et al.*, 2021; KHATIB *et al.*, 2021; TRAVER; MALAVÉ SÁNCHEZ, 2022). Além disso, a criptococose é a terceira infecção fúngica invasiva mais comum em receptores de transplante de órgãos sólidos (BADDLEY; FORREST, 2019).

O tratamento da criptococose, em todas as formas graves (SNC, disseminada e pulmonar), é limitado a três medicamentos, usados isoladamente ou em combinação: anfotericina B (7), fluconazol (8) e flucitosina (9). Nos casos de meningite criptocócica, o tratamento preconizado pela OMS, para o regime de indução, consiste na administração de anfotericina B (7) com flucitosina (9) por uma semana, seguido do tratamento de consolidação por oito semanas com Fluconazol (8) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Nos casos de persistência da doença, o paciente deve ser tratado com 200 mg diários de fluconazol (8) por 6-12 meses (fase de manutenção) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018) (Figura 3). Algumas opções no regime de indução são duas semanas de fluconazol (8) (1200 mg/d) + flucitosina ou duas semanas de anfotericina B (7) + fluconazol (8) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Em casos de outra doença não meníngea, para pacientes imunossuprimidos ou imunocompetentes, como infecção pulmonar e doença localizada não pulmonar, as diretrizes da *Society for Infectious Diseases of America* recomendam 400 mg/d de fluconazol (8) por 6-12 meses após a terapia de indução (PERFECT *et al.*, 2010). No entanto, em casos de indisponibilidade ou contraindicação do fluconazol (8), alguns antifúngicos azólicos alternativos podem ser

usados, como voriconazol (200 mg duas vezes/dia), itraconazol (200 mg/dia) e posaconazol (400 mg duas vezes/dia) (PERFECT *et al.*, 2010).

**Figura 3** – Substâncias e tratamento recomendado em casos de meningite criptocócica (OMS)



**Fonte:** o próprio autor (LI, Y. *et al.*, 2020)

**Legenda:** CIM<sub>50</sub> determinado pelos autores, pela média de 110 cepas de *Cryptococcus* que incluem *C. neoformans* e *C. gatti*

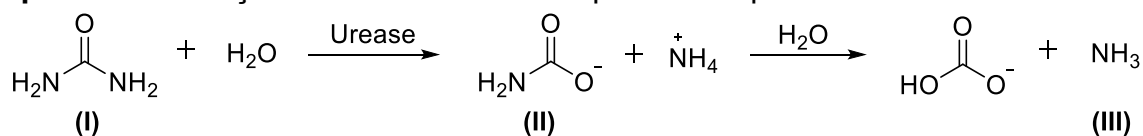
Apesar do tratamento disponível, as opções farmacológicas limitadas e a diminuição da suscetibilidade ao fluconazol (8) em *Cryptococcus* têm sido motivo de preocupação (MOENG *et al.*, 2020). Além disso, a infecção criptocócica é uma das infecções oportunistas mais importantes entre as pessoas que vivem com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) avançada. Ademais, a alta mortalidade associada à meningite criptocócica é maior em países de baixa renda devido à disponibilidade limitada e alto custo dos medicamentos antifúngicos de primeira linha (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Outra preocupação é o fato de que a difusão de moléculas para os tecidos cerebrais é muito difícil por causa da BHE e das bombas de efluxo teciduais, de modo que a penetração de antifúngicos para tratar

infecções do SNC, como meningoencefalite, é muito limitada (WIRTH *et al.*, 2018). Portanto, a busca por novas substâncias com potencial antifúngico para o tratamento da criptococose é extremamente necessária.

## 1.2 UREASES: BREVE HISTÓRIA, CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E CATALÍTICAS

As ureases (EC 3.5.1.5) são um grupo de metaloenzimas pertencentes à família das amidoidrolases e fosfotriestrases. Entre outras hidrolases dependentes de metais binucleares, as ureases são as únicas que possuem íons  $\text{Ni}^{2+}$  no sítio ativo (KRAJEWSKA, 2009). São comuns entre plantas, algas, fungos e bactérias, mas não são encontrados em animais. Independentemente do organismo, a principal função da urease é promover a hidrólise da ureia (I), resultando em carbamato (II) e amônia (III) como produtos. Este processo enzimático é  $10^{14}$  vezes mais rápido do que a decomposição da ureia por uma reação de eliminação (LIPPARD, 1995) (Esquema 1).

**Esquema 1** – Reação de hidrólise de ureia promovida pela urease



**Fonte:** o próprio autor

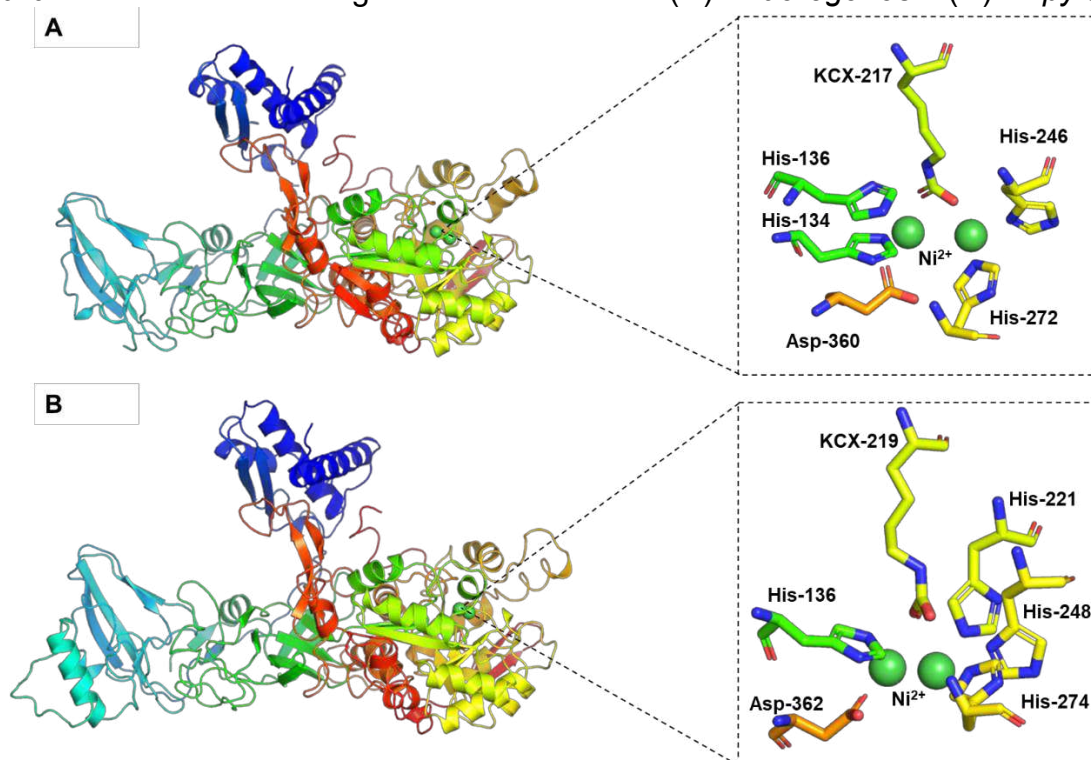
A urease é historicamente importante por seu papel em alguns dos principais eventos da comunidade científica e no avanço da Bioquímica. Essa história começou em 1864, quando Philippe Edouard Léon van Tieghem isolou o primeiro microrganismo com atividade ureolítica, o *Micrococcus ureae*. Dez anos depois, Frédéric Alphonse Musculus isolou a primeira enzima com atividade ureolítica de uma amostra de urina pútrida (KAPPAUN *et al.*, 2018). Pierre Miquel, que dedicou seus estudos a descrever e reconhecer microrganismos capazes de decompor a ureia, foi o responsável por sugerir o nome urease em 1890 (FEARON, 1923). Por fim, a descoberta de Yuchi Takeuchi da urease vegetal extraída da soja (*Glycine max*), em 1909, permitiu um intenso avanço nas investigações sobre o assunto ao fornecer uma maior fonte de obtenção da enzima para estudos (KAY, 1923).

Cerca de cinquenta anos após a descoberta da primeira urease, em

1926, a urease de *Canavalia ensiformis* (CEU) foi isolada de sementes de feijão-deporco e foi a primeira enzima a ser cristalizada. Esta descoberta feita por James B. Sumner demonstrou a natureza proteica das enzimas, prova inegável de que eram bem definidas como compostos químicos, o que lhe rendeu o Prêmio Nobel de Química em 1946 (SUMNER, 1926).

Outro evento importante na história da urease foi o reconhecimento do significado biológico dos íons metálicos como cofatores enzimáticos. Em 1975, Burt Zerner e colaboradores relataram a presença de íons níquel no sítio ativo da urease de *C. ensiformis*, essencial para sua atividade catalítica (DIXON *et al.*, 1975). Cerca de setenta anos após a primeira cristalização da urease, Evelyn Jabri *et al.* (1995) descreveram outro avanço, relatando a elucidação da estrutura cristalina (Figura 4A) da enzima urease da bactéria *Klebsiella aerogenes* (KAU) por difração de raios X, revelando detalhes da topologia molecular de seu sítio ativo (JABRI *et al.*, 1995).

**Figura 4** – Estrutura cristalográfica de ureases de (A) *K. aerogenes* e (B) *H. pylori*



**Fonte:** o próprio autor

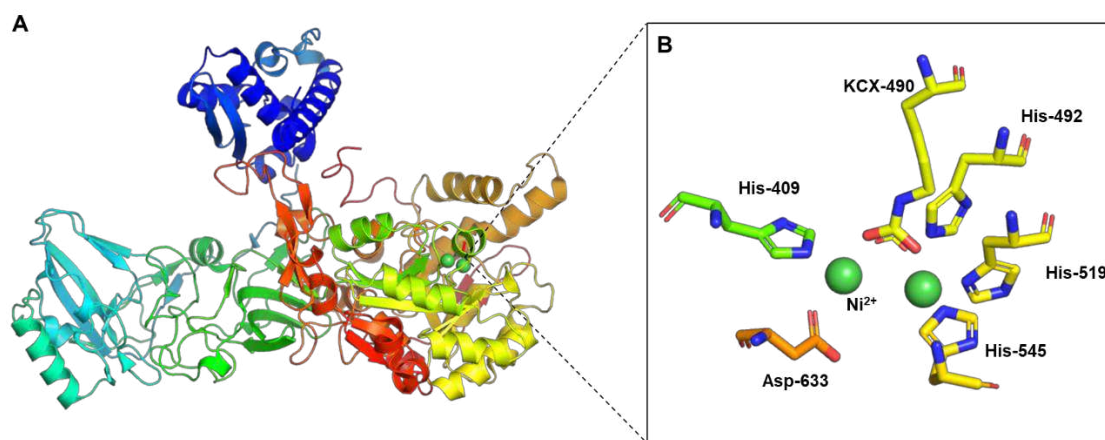
**Legenda:** As estruturas estão disponíveis no Protein Data Bank - PDB (<http://www.rcsb.org/>). Códigos: 2KAU (KAU) e 1E9Z (HPU)

Mais recentemente, no século XXI, devido aos estudos sobre a atividade ureolítica de bactérias na patogênese de algumas doenças humanas e

animais (MOBLEY *et al.*, 1995), estudos aprimorados com ureases bacterianas, principalmente aquelas produzidas pela bactéria *Helicobacter pylori* (HPU), levaram a determinação da estrutura cristalográfica desta urease (Figura 4B) por Nam Ha e colegas em 2001 (HA *et al.*, 2001).

Embora a urease de *Canavalia ensiformis* (CEU) tenha sido a primeira enzima a ser cristalizada, a determinação de sua estrutura cristalina (Figura 5A) só foi alcançada em 2010 por Anuradha Balasubramanian & Karthe Ponnuraj devido à dificuldade em obter grandes quantidades desta enzima com um bom grau de pureza para estudos refinados (BALASUBRAMANIAN; PONNURAJ, 2010). CEU tem dois íons  $\text{Ni}^{2+}$  em seu sítio ativo (Figura 5B), ambos coordenados por uma lisina carbomilada e dois resíduos de histidina cada, e ainda para um dos íons níquel, um resíduo terminal de aspartato (JABRI *et al.*, 1995; NORDLANDER; CARLSSON, 2010).

**Figura 5** – (A) Estrutura cristalográfica do CEU e (B) Representação tridimensional do seu sítio ativo



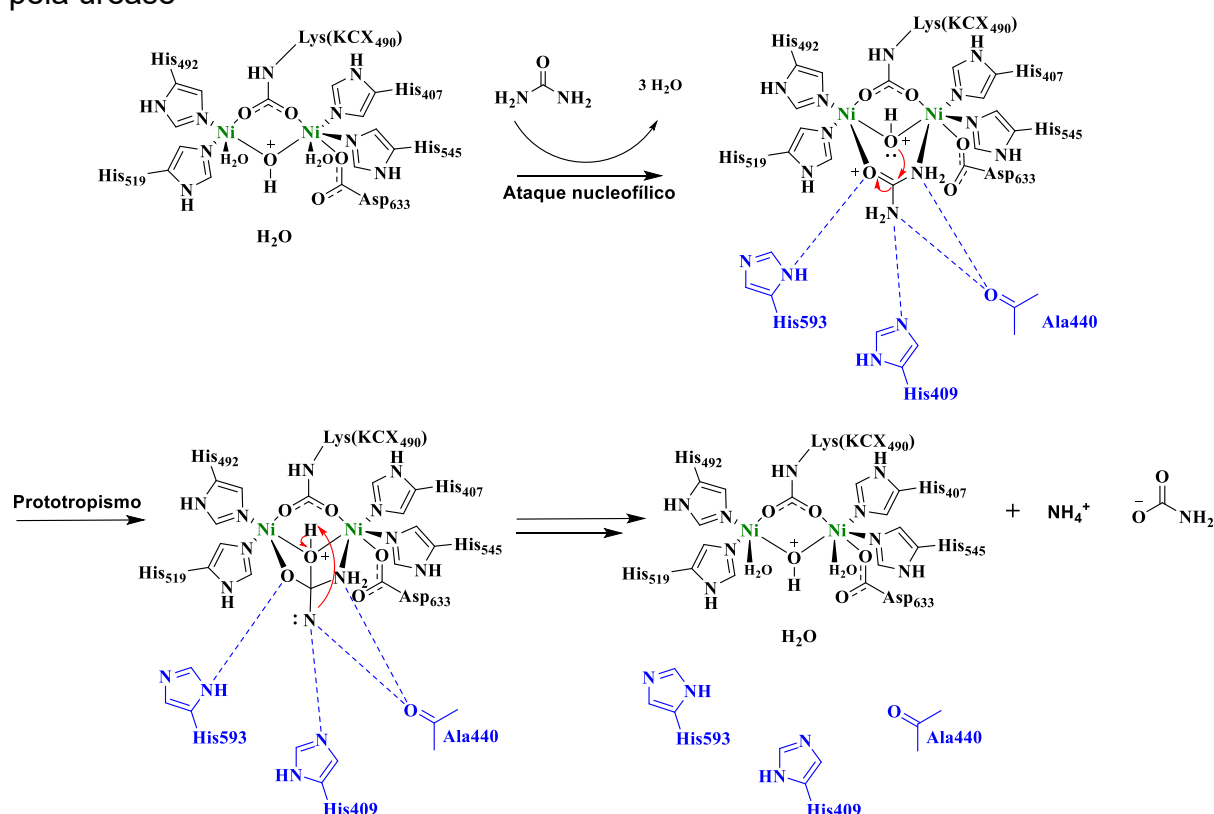
**Fonte:** o próprio autor  
**Legenda:** PDB ID: 4H9M

As ureases vegetais, assim como as ureases fúngicas, são constituídas de subunidades idênticas de aproximadamente 90 kDa organizadas em trímeros ou hexâmetros. Por exemplo, o CEU é composto por 840 aminoácidos e sua forma nativa é um hexâmero de aproximadamente 540 kDa (RIDDLES *et al.*, 1991). Por outro lado, as ureases bacterianas, são compostas por três subunidades diferentes, com massa molar entre 190 a 300 kDa (KAPPAUN *et al.*, 2018). Mesmo com essas características distintas, estudos apontam para o mesmo antecedente

comum para ureases fúngicas, vegetais e bacterianas (BALASUBRAMANIAN; PONNURAJ, 2010).

O mecanismo da ação catalítica das ureases é amplamente discutido na comunidade científica. Uma das propostas sugere que o processo se inicie com o deslocamento das moléculas de água pela presença de ureia no sítio ativo, o que permite o ataque nucleofílico da ureia aos íons  $Ni^{2+}$ , levando à coordenação do tipo bidentado com a urease (Esquema 2). Posteriormente, o ataque nucleofílico ocorre pela ponte hidroxila entre os íons  $Ni^{2+}$  na carbonila da ureia, resultando em um intermediário tetraédrico, a partir do qual, após muitas etapas de transferências intermoleculares de prótons e reações com moléculas de água presentes no meio, amônia e carbamato são liberados (BENINI *et al.*, 1999).

**Esquema 2** – Mecanismo proposto para a reação de hidrólise enzimática da ureia pela urease



**Fonte:** Adaptado de Benini *et al.*, 1999

**Legenda:** CEU, PDB ID: 4H9M

Desde sua descoberta, a urease tem sido objeto de extensa pesquisa que inclui sua ocorrência e funções na natureza. Seu principal papel ambiental é permitir que o organismo utilize a ureia (substrato natural) como fonte de nitrogênio e,

além disso, participe efetivamente das vias sistêmicas de transporte de nitrogênio, atuando como uma toxina proteica para a defesa das plantas (POLACCO; HOLLAND, 1993). Portanto, a aplicabilidade da urease na ciência é vasta, e, como vimos até o momento, a enzima urease é um fator chave de virulência de infecções por *Cryptococcus* spp e *Helicobacter pylori* e um excelente alvo biológico a ser considerado para o tratamento dessas doenças.

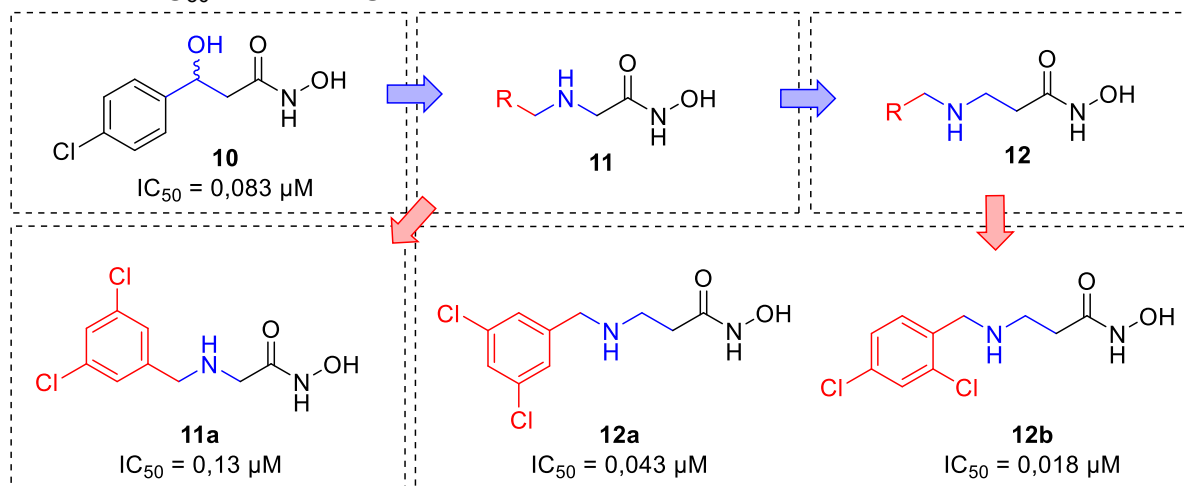
### 1.3 – SUBSTÂNCIAS INIBIDORAS DE UREASE COM ENSAIOS FENOTÍPICOS

Estudos *in vitro* utilizando a urease vegetal (CEU) para determinar a atividade antiureolítica de substâncias são bem difundidos na literatura, uma vez que esta é mais acessível e comercialmente disponível. Assim, buscou-se avaliar os estudos recentes de substâncias com potencial antiureolítico que fornecessem a avaliação *in vitro* na urease, aliado a ensaios fenotípicos sobre os microrganismos de interesse (*H. pylori* e *Cryptococcus*) para avaliar as principais subunidades estruturais envolvidas na inibição da enzima.

Uma nova série de ácidos hidroxâmicos contendo o grupamento arilamino descritos por Liu et al. (2018) foi projetada, sintetizada e avaliada como possíveis inibidores de HPU. O projeto foi proposto com base em derivados do fármaco comercializado, o ácido acetoidroxâmico. Primeiramente, o grupo de Liu avaliou a inibição do derivado **10**, que apresentou  $IC_{50} = 0,083 \mu\text{M}$  contra extrato bruto de HPU (LIU *et al.*, 2018). Em seguida, o grupo determinou como nova proposta a substituição do centro quiral COH do composto (**10**) por NH, para avaliar a diversidade estrutural e a sua influência na atividade de inibição e ainda, estudos de REA dos diferentes substituintes na subunidade arilamina, gerando uma série de ácidos 2-(*N*-arilamino)acetoidroxâmicos (**11**). Dentre a série dos derivados **11** avaliados, a substância contendo o radical 3,5-diclorofenila (**11a**) foi a mais promissora, com  $IC_{50} = 0,13 \mu\text{M}$  (Figura 6). Contudo, os derivados sintetizados apresentaram um perfil inibitório melhor que o do ácido acetoidroxâmico ( $IC_{50} = 27,9 \mu\text{M}$ ), mas a substituição de COH por NH influenciou negativamente a inibição, uma vez que os valores de  $IC_{50}$  diminuíram quando comparados a **10**. Assim, o grupo realizou uma nova modificação estrutural nas substâncias ao inserir um grupo etileno entre o ácido acetoidroxâmico e as porções NH-fenil, levando a uma nova série de ácidos 3-(*N*-

arilamino)propionilhidroxâmico (**12**) (Figura 6).

**Figura 6** – Melhores substâncias das séries planejadas por Liu et al. (2018), derivadas do ácido 3-(3-clorofenil)-3-hidroxi-propionilhidroxâmico (**10**), com seus respectivos valores de  $IC_{50}$  contra HPU



**Fonte:** o próprio autor

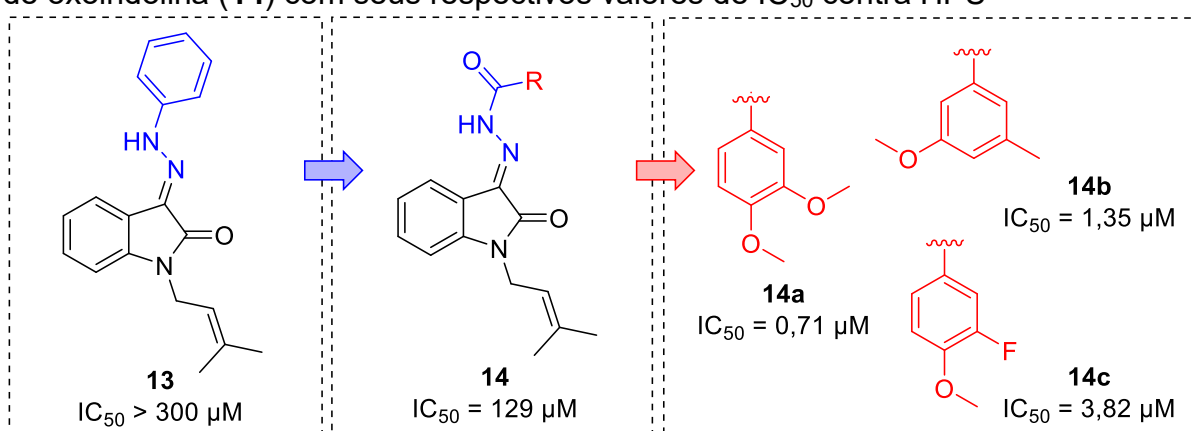
**Legenda da cor:** Azul: mudança estrutural na cadeia principal da molécula; Vermelho: diferentes substituintes

De modo geral, observou-se que o aumento da cadeia contribuiu positivamente para a atividade inibitória, com valores de  $IC_{50}$  variando de 0,018 a 21,13  $\mu\text{M}$  entre todos os substituintes avaliados por Liu et al. (2018). Os derivados contendo os substituintes diclorofenila também foram os melhores inibidores da série **12**. Podemos ver que a substância **12a** ( $IC_{50} = 0,043 \mu\text{M}$ ) apresentou um potencial de inibição 3x maior que o seu corresponde da série **11**. Além disso, o derivado **12b** (2,4-CIPh), melhor inibidor de urease das séries avaliadas ( $IC_{50} = 0,018 \mu\text{M}$ ), foi quase 5x mais potente que **10** (Figura 6). Os derivados clorados **11a**, **12a** e **12b** também mostram um perfil inibitório contra HPU em um ensaio de células intactas com valores de  $IC_{50}$  de 16,9, 3,9 e 0,14  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Os estudos cinéticos desses três compostos selecionados sugeriram um mecanismo de inibição mista e os valores de  $K_i$  variaram de 0,11 a 0,39  $\mu\text{g/mL}$ . Adicionalmente, a avaliação dos compostos **12a** e **12b** como agentes antivirulência para o tratamento de gastrite mostrou que o desenvolvimento de gastrite foi significativamente reduzido (dose de 32 mg/kg b.i.d) e erradicação de *H. pylori* foi igual a 92,3 e 100%, respectivamente.

Estudos anteriores descrevendo flavonoides como inibidores de urease (XIAO et al., 2013) instigaram Yang et al. (2018) a projetar uma série de

derivados de oxoindolina, baseada em estudos de docagem molecular, na qual a subunidade cromona é substituída por uma porção de 2-oxoindolina. Além disso, fenilidrazina (**13** - em azul) ou benzoilidrazona e uma subunidade de 3-metilbut-2-enil (**14**) do produto natural shikonina, descrito como inibidor de *H. pylori*, foram inseridos nos novos derivados para investigar sua atividade inibitória (Figura 7) (YANG *et al.*, 2018).

**Figura 7** – Modificações realizadas por Yang et al. (2018) em uma série de derivados de oxoindolina (**14**) com seus respectivos valores de IC<sub>50</sub> contra HPU



Fonte: o próprio autor

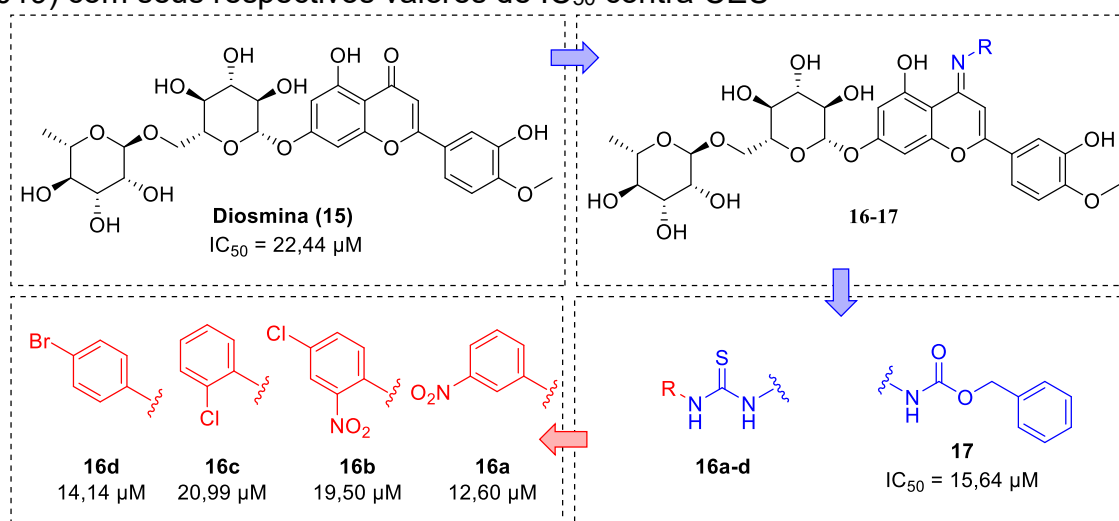
Legenda da cor: Azul: mudança estrutural na molécula; Vermelho: diferentes substituintes

O derivado de 2-oxoindolina com o grupo fenilhidrazilideno (**13**) apresentou uma fraca atividade de inibição para o extrato bruto de urease de HPU, com IC<sub>50</sub> > 300 μM, em comparação com o ácido acetidroxâmico (IC<sub>50</sub> = 17,2 μM). Por outro lado, a substituição do fenilhidrazilideno por benzoilhidrazilideno (**14**) influenciou positivamente, levando a um aumento de sua atividade em 2 vezes (IC<sub>50</sub> = 129 μM). O grupo observou que, em geral, a presença de grupos doadores de elétrons (ERG) na posição *orto* e *para* forneceu os melhores resultados. Os derivados 3,4-dimetoxilados (**14a**), 3,5-dimetoxilados (**14b**) e 3-fluor-4-metoxifenila (**14c**) apresentaram os melhores resultados, com IC<sub>50</sub> de 0,71, 1,35 e 3,82 μM, respectivamente. Além disso, os compostos foram avaliados *in vitro* contra *H. pylori* e apresentaram valores de concentração inibitória mínima (CIM) de 0,48, 1,96 e 3,94 μM, respectivamente, mais de 60 vezes mais potente que o fármaco padrão metronidazol (CIM = 31,3 μM).

Kataria e Khatkar (2019) projetaram uma série de 12 derivados de Diosmina, contendo ariltioureias e tiossemicarbonas, como inibidores de urease e

os avaliaram através de métodos *in silico* e *in vitro*. Diosmina é um flavonoide natural abundante em frutas cítricas com amplo perfil biológico de atividade. Assim, esses autores exploram a subunidade cromona presente na Diosmina, produzindo bases de Schiff e adicionando os substituintes desejados (Figura 8) (KATARIA; KHATKAR, 2019).

**Figura 8** – Algumas das modificações realizadas na Diosmina por Kataria e Khatkar (2019) com seus respectivos valores de IC<sub>50</sub> contra CEU



Fonte: o próprio autor

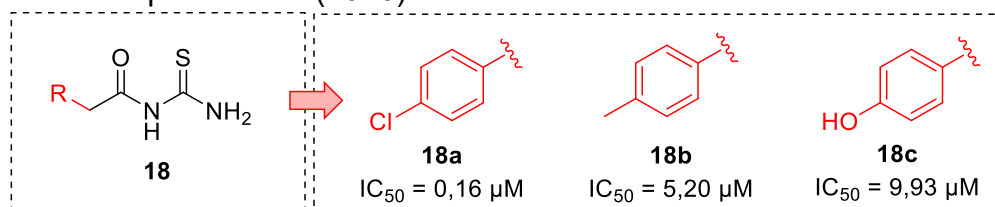
Legenda da cor: Azul: mudança estrutural na molécula; Vermelho: diferentes substituintes

Este estudo mostrou que a adição da subunidade de tioureia (**16**) e da hidrazina (**17**) à estrutura melhora a atividade dos derivados de Diosmina como inibidores de CEU (*jack bean*). Quando na presença de um forte EWG em *meta* como o 3-nitroarila (**16a** - IC<sub>50</sub> = 12,60 μM), há um aumento na atividade antiureolítica dos derivados, seguido do derivado contendo o substituinte bromo em *para* (**16d**) com IC<sub>50</sub> = 14,14 μM. Em contraste, o átomo de cloro não se mostrou um bom substituinte, uma vez que não foi observado uma melhora considerável na atividade das substâncias. Os derivados mais potentes da série (**16a**, **16d** e **17**) foram avaliados *in vitro* contra *H. pylori* (DSM 4867), e **16a** foi o inibidor mais potente com um CIM<sub>50</sub> = 500 μg/mL, comparável ao padrão (ácido acetoidroxâmico, CIM<sub>50</sub> = 500 μg/mL). Para essa substância, os autores também investigaram seu potencial inibitório, por meio de estudos cinéticos, que mostraram que o **16a** é um inibidor competitivo da CEU.

Li e colaboradores (2020) também avaliaram derivados de tioureias N-monosubstituídas (**18**) como inibidores de HPU (Figura 9). Esses compostos foram

projetados com base na conhecida atividade inibitória da urease exibida pelos derivados da tiourea, que são análogos estruturais da ureia (BRITO *et al.*, 2015; KANWAL *et al.*, 2019). Entre as tioureas, as *N,N'*-dissubstituídas são a classe mais estudada, apresentando um modo de ligação diferente da ureia por serem mais volumosas que o substrato natural, o que dificulta o acesso ao sítio catalítico. Por essas razões, os autores decidiram sintetizar e avaliar a atividade inibitória de tioureas *N*-monosubstituídas contra o extrato bruto de urease de *H. pylori* (LI, W.-Y. *et al.*, 2020).

**Figura 9** – Atividade inibitória de urease das melhores tioureas *N*-monosubstituídas (**18**) sintetizadas por Li et al. (2020)



**Fonte:** o próprio autor

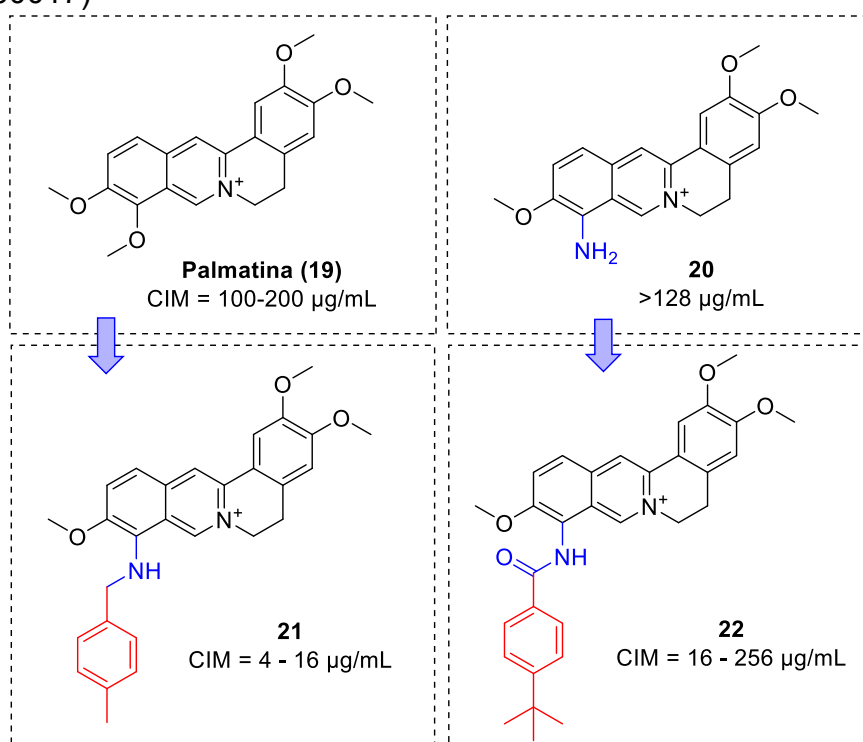
**Legenda da cor:** Vermelho: diferentes substituintes

Dentre os compostos sintetizados pelo grupo, as substâncias mais potentes são apresentadas na Figura 9. A melhor substância, 4-cloro-fenilacetotiourea (**18a**), é 158 vezes mais potente que o HAE, o controle positivo ( $IC_{50} = 27,2 \mu M$ ). Observou-se que este substituinte é fundamental para a atividade inibitória, uma vez que a substituição por metila (**18b**), hidroxila (**18c**) e outros substituintes (não mostrados) na mesma posição diminui a potência de 27 a 968 vezes. Além disso, para entender o mecanismo de inibição, os compostos mais promissores foram selecionados para realizar os ensaios cinéticos em urease pura (CEU). As substâncias **18a**, **18b** e **18c** apresentaram valores calculados de  $K_i$  (constante de inibição urease-inibidor) e  $K_i'$  (constante de inibição para urease-urea-inibidor) de 0,04 e 0,16  $\mu M$ , 1,28 e 2,84  $\mu M$ , 2,54 e 11,3  $\mu M$ , respectivamente, sugerindo que estes compostos apresentam um mecanismo competitivo misto, mas devido aos menores valores de  $K_i$  em relação ao  $K_i'$ , o complexo urease-inibidor é mais estável que o complexo urease-urea-inibidor.

Na busca contínua de identificar novos compostos antibacterianos com novas estruturas químicas e novos mecanismos, Fan e colaboradores (2020) exploraram o potencial dos alcaloides de protoberberina (FAN, Tian–Yun *et al.*, 2018;

FAN, Tianyun *et al.*, 2018). Entre eles, a palmatina (PMT, Figura 10) é o representante mais proeminente devido à sua variedade de efeitos biológicos, inclusive contra bactérias Gram-positivas e negativas (SONG *et al.*, 2018). Além disso, devido à presença de um nitrogênio ionizável, o PMT pode se acumular nas membranas de bactérias Gram-negativas (RICHTER *et al.*, 2017). Portanto, considerando o PMT como líder, os autores sintetizaram uma série de 20 novos derivados de PMT e realizaram um estudo de REA focado no substituinte na posição 9 (Figura 10) (FAN *et al.*, 2020).

**Figura 10** – Melhores derivados de PMT (**20**, **21** e **22**) e seus respectivos valores de CIM contra cepas de *H. pylori* (suscetível e resistente ao metronidazol - ATCC43504, CCPMAP160007, CCPMAP160008, CCPMAP160010, CCPMAP160011, CCPMAP160017)



**Fonte:** o próprio autor

**Legenda da cor:** Azul: mudança estrutural na molécula; Vermelho: diferentes substituintes

Devido à grande preocupação no combate às infecções causadas por cepas de *H. pylori* resistentes aos fármacos comumente utilizados, como metronidazol e claritromicina, os derivados de PMT foram avaliados contra seis cepas resistentes ao metronidazol (MTZ) (ATCC43504 e cinco cepas clínicas isoladas de hospitais chineses - CCPMAP). Em geral, os derivados contendo um grupo amino secundário (**21**) foram mais ativos do que aqueles com um grupo amida (**22**) ou aqueles com um

grupo amino primário (**20**) na posição 9. Esses resultados indicam que uma substituição adequada nesta posição é crítica para a atividade contra cepas de *H. pylori*, particularmente resistentes a MTZ.

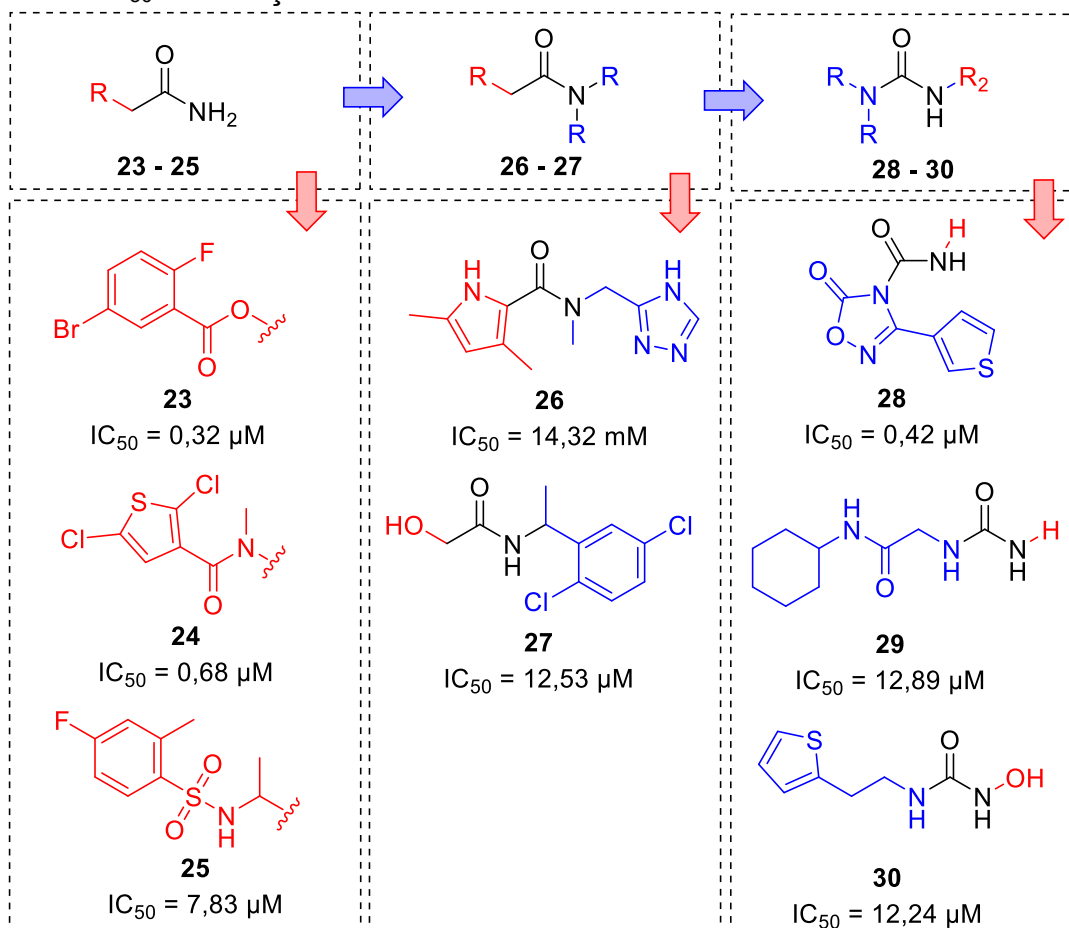
Dentre todos os derivados, o composto **21** foi o mais promissor em todas as cepas resistentes e, portanto, seu potencial inibitório foi avaliado contra a CEU, uma vez que o mecanismo catalítico é altamente conservado com a urease de *H. pylori* (BALASUBRAMANIAN; PONNURAJ, 2010). Esses estudos demonstraram que o derivado **21** inibiu a enzima com um  $IC_{50} = 6,76 \mu\text{g/mL}$ , pelo menos 4,7 vezes menor que o PMT ( $> 32 \mu\text{g/mL}$ ).

Usando abordagens computacionais hierárquicas, Imran et al. (2020) pesquisaram inibidores de urease em bancos de dados químicos comerciais e os avaliaram como inibidores de urease e de crescimento de cepas bacterianas, incluindo *H. pylori*. Primeiro, os autores usaram uma abordagem de triagem virtual, sobreposição rápida da estrutura química (ROCS), que é um método de similaridade de forma (TAWA et al., 2009), para selecionar estruturas de *hits* da biblioteca HTS do banco de dados de enaminas. Depois disso, as substâncias mais promissoras foram docadas na CEU (PDB: 4H9M) e, com base em suas pontuações de docagem e diferença estrutural, oito substâncias foram selecionados e testados *in vitro* como inibidores de urease vegetal (CEU) (Figura 11) (IMRAN et al., 2020).

As substâncias selecionadas possuem diferentes esqueletos; no entanto, todas as substâncias são carboxamidas, com as subunidades amida ou ureia. Todas as moléculas apresentaram percentual de inibição acima de 80%, e os compostos **23**, **24** e **28** foram os inibidores de urease mais promissores, com  $IC_{50} = 0,32$ ,  $0,68$  e  $0,42 \mu\text{M}$ , respectivamente. Estudos de cinética enzimática revelaram que os compostos exibiram perfis dose-dependentes e que os compostos **23** e **28** são inibidores competitivos, com  $K_i = 9,24$  e  $9,69 \mu\text{M}$ , respectivamente, enquanto **24** é um inibidor do tipo misto ( $K_i = 7,14 \mu\text{M}$ ), que pode interagir em um sítio alostérico ou no sítio ativo da enzima urease. Além disso, as constantes de inibição apresentadas pelos derivados demonstraram que as substâncias possuem maior afinidade de interação com a urease do que o inibidor padrão, a tioureia ( $K_i = 18,18 \mu\text{M}$ ). Ademais, os compostos também foram testados quanto à sua capacidade de bloquear a atividade da urease em cultura de *H. pylori*. O ensaio de tolerância ao estresse ácido mostrou uma diminuição na viabilidade celular de *H. pylori* na presença de inibidores

em pH 5,0, principalmente por parte das substâncias **23** e **24**, e nenhuma viabilidade foi observada para bactérias em pH 3,5 tratadas com todos os compostos selecionados.

**Figura 11** – Compostos selecionados por Imran et al. (2020) com seus respectivos valores de IC<sub>50</sub> em relação à CEU

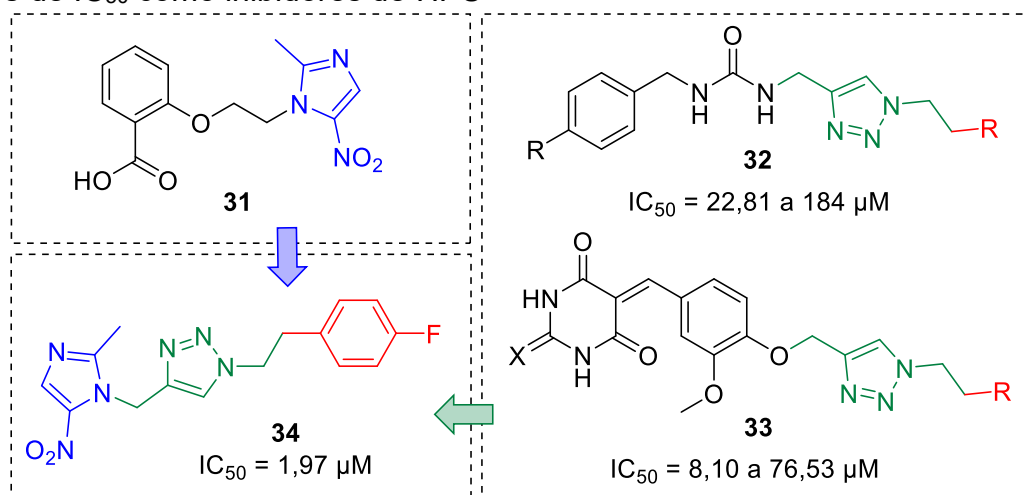


**Fonte:** o próprio autor

**Legenda da cor:** Azul: mudança estrutural na molécula; Vermelho: diferentes substituintes

Recentemente, em 2021, Rezaei et al., utilizaram a estratégia de hibridização molecular para sintetizar uma nova série de metronidazol-1,2,3-triazóis (**34**) (BABAZADEH *et al.*, 2021) com base em estudos anteriores de seu grupo de pesquisa sobre derivados de arilureia-1,2,3-triazol (**32**) (MOGHIMI *et al.*, 2018), derivados do ácido 1,2,3-triazol-(tio)barbitúrico (**33**) (ASGARI *et al.*, 2020) e 2-metil-5-nitro-1H-imidazol (**31**, em azul) (MAO *et al.*, 2009), todos previamente relatados como inibidores de urease (Figura 12).

**Figura 12** – Planejamento utilizado por Rezaei et al., (2021) na síntese de derivados de metronidazol-1,2,3-triazol e a melhor substância da série (**34**) com seus respectivos valores de  $IC_{50}$  como inibidores de HPU



**Fonte:** o próprio autor

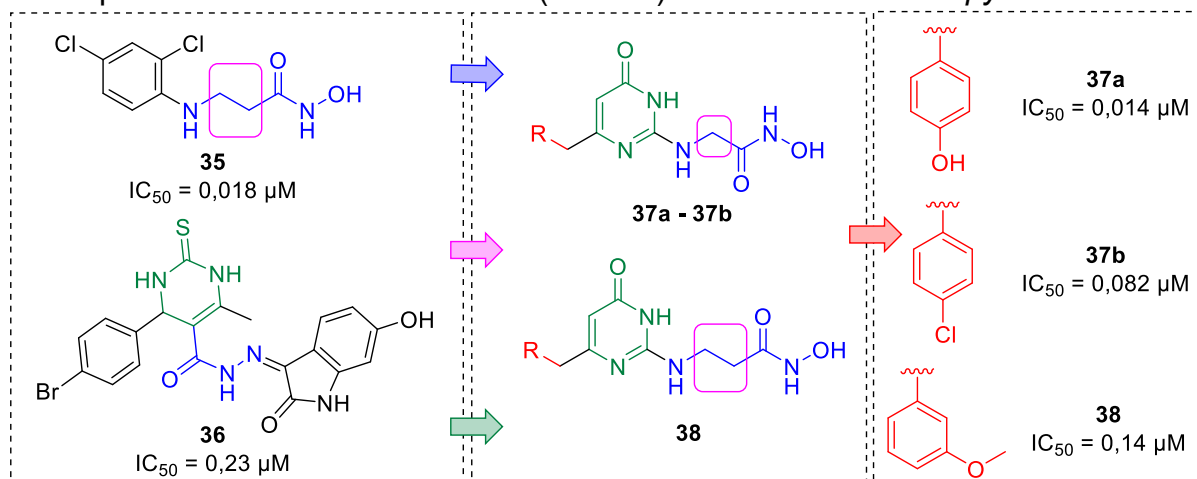
**Legenda da cor:** Azul e verde: mudança estrutural na molécula; Vermelho: diferentes substituintes

Todos os derivados da série **34** desenvolvidos pelo grupo foram mais potentes do que o padrão, a tioureia ( $IC_{50} = 22,0 \mu\text{M}$ ), e mais ativos que as séries **32** e **33**, relatados anteriormente. Além disso, o grupo observou que os derivados substituídos na posição *para* com grupos halogenados como 4-F, 4-Br e 4-Cl demonstraram quase o dobro da atividade inibitória em relação a outros substituintes, com valores de  $IC_{50}$  de 1,97, 4,02 e 3,47  $\mu\text{M}$ , respectivamente (REZAEI *et al.*, 2021). Por fim, o derivado **34** (4-F) foi o que apresentou a atividade antiureolítica mais potente e, nos estudos cinéticos, foi determinado como um inibidor não competitivo com  $K_i = 1,21 \mu\text{M}$ .

Mamidala e colaboradores (2021) relataram a síntese de híbridos contendo diidropirimidina e derivados do ácido acetidroxâmico (**37** e **38**) e os avaliaram *in vitro* como inibidores da urease de *H. pylori*. As substâncias relatadas pelo grupo foram planejadas por hibridação molecular entre o ácido amino hidroxâmico (**35** - em azul) e o farmacóforo de diidropirimidina (**36** - em verde) (MAMIDALA *et al.*, 2021). O primeiro pode interagir com os íons metálicos de níquel no sítio ativo (XIAO *et al.*, 2013), e o segundo pode se ligar a uma região móvel da proteína (C321 e H322), próxima ao sítio ativo que é crítica para a atividade da urease (KHAN *et al.*, 2016). Além disso, os autores propuseram avaliar a influência de dois (**37**) ou três (**38**) espaçadores de carbono (em rosa) entre o anel heteroaromático e a porção de ácido acetidroxâmico. Por fim, a fração arila (em vermelho) foi introduzida

em C4 do anel dihidropirimidina para conduzir um estudo de REA (Figura 13).

**Figura 13** – Identificação e atividade inibitória dos melhores híbridos de dihidropirimidina e ácido hidroxâmico (**37** e **38**) contra urease de *H. pylori*



**Fonte:** o próprio autor

**Legenda de cores:** Azul e verde: mudança realizada por meio da estratégia de hibridização molecular; Rosa: espaçadores de carbono; Vermelho: diferentes substituintes

Todos os derivados foram avaliados *in vitro* por meio de um ensaio de atividade de inibição de urease livre de células (Figura 13). Em geral, os resultados mostraram que os derivados da série **37** foram mais potentes que os da série **38**, mostrando a importância de apenas um carbono como espaçador entre as cadeias laterais. Além disso, verificou-se que o melhor derivado das duas séries foi o **37a** que tem um substituinte doador de elétrons na posição *para* (4-OH) e que pode atuar como receptor e doador de ligação de hidrogênio, de modo que sua potência foi 1000 vezes maior que o HAE. Os três melhores compostos sintetizados (**37a**, **37b** e **38**) foram selecionados para estudos cinéticos para entender o mecanismo de inibição da urease. Esses resultados demonstraram que os compostos exibiram perfis de inibição enzimática mista e dependente da dose. Esses estudos também reforçaram a potência de **37a**, cujo valor de  $K_i$  foi muito baixo (0,008 µg/mL), indicando sua alta afinidade de ligação a enzima. Além disso, os três derivados apresentaram valores de  $K_i' > K_i$ , indicando que o padrão de inibição enzimática é mais favorável a um mecanismo do tipo competitivo do que a um modo de inibição não competitivo.

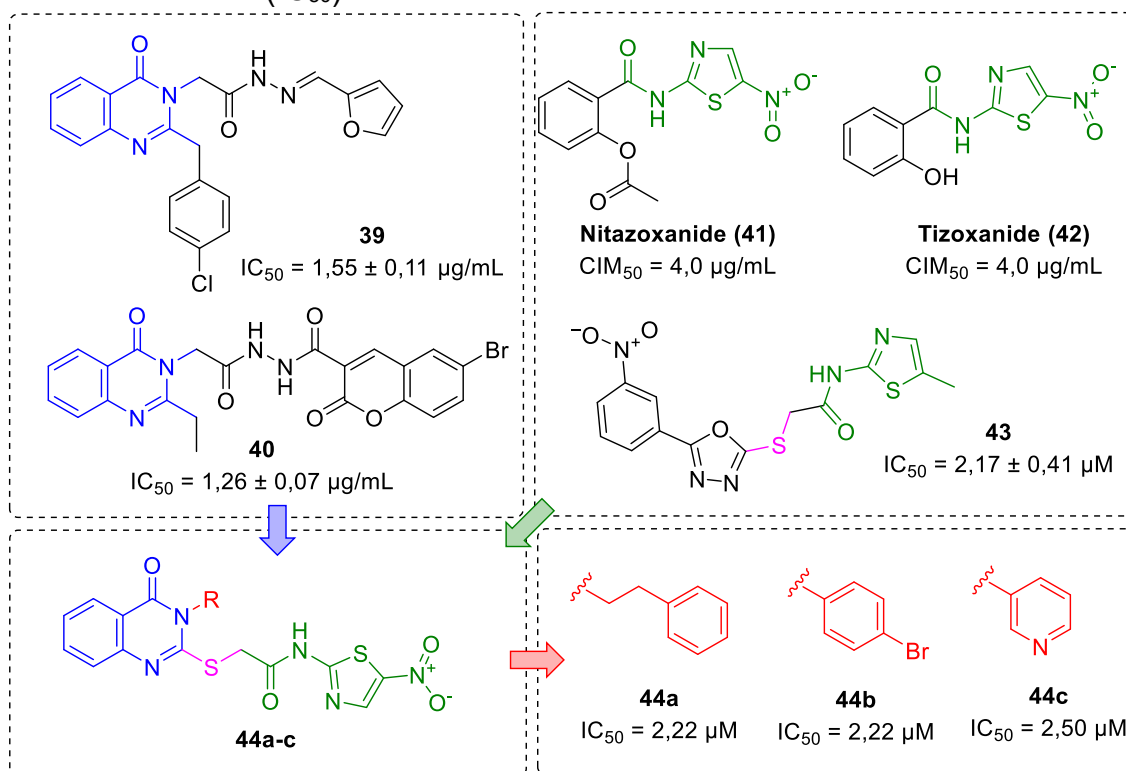
Conforme discutido, a urease é um alvo bem definido para a infecção por *H. pylori*, mas ainda é um fator de virulência pouco estudado para a criptococose. Assim, são poucos os estudos que trazem a inibição da urease como alvo da doença.

De fato, nos últimos anos, encontrou-se apenas um estudo (veja abaixo), que avaliou a atividade antiureolítica dos compostos sintetizados com capacidade de inibir o crescimento celular de *Cryptococcus neoformans*.

Sohrabi e colaboradores (2022) projetaram e sintetizaram uma série de nitrotiazolacetamidas conjugadas com diferentes tioquinazolinonas (**44**) e avaliaram seu potencial antiureolítico (Figura 14) (SOHRABI *et al.*, 2022). Em seguida, o melhor inibidor identificado foi avaliado contra *C. neoformans*. Esses compostos foram desenhados por hibridização molecular para explorar a estrutura da quinazolinona, presente em compostos já testados como potentes inibidores de urease (**39** e **40** - em azul) (AKYÜZ *et al.*, 2018; MENTEŞE *et al.*, 2018), e o potencial da subunidade aminonitrotiazol (em verde), presente em importantes agentes antibacterianos, como nitazoxanida (**41**) e tizoxanida (**42**), que têm atividade contra *H. pylori* (YAMAMOTO *et al.*, 1999). Além disso, os autores usaram a tioacetamida (**43** - em rosa, Figura 14)(ATHAR ABBASI *et al.*, 2019) como um ligante entre a quinazolinona e o aminonitrotiazol, assumindo que esta subunidade pudesse prover interações com resíduos críticos do sítio ativo da urease.

Os derivados de tioquinazolinonas mais potentes (**44a-c**, Figura 14) foram avaliados quanto a sua atividade antimicrobiana contra dois microrganismos urease-positivos, *Cryptococcus neoformans* e *Proteus vulgaris*. Porém, os compostos testados não apresentaram atividade antimicrobiana, com CIM > 512 µg/mL. Entretanto, as mesmas substâncias **44a-c** foram avaliadas como inibidores ureolíticos de organismos, por meio de ensaio colorimétrico, e os três derivados apresentaram alta atividade antiureolítica contra *C. neoformans*, com IC<sub>50</sub> de 173,8, 241,8 e 129,4 µg/mL, respectivamente. Assim, o derivado **44a** foi considerado o composto mais promissor em ambos os ensaios. Dessa forma, os autores avaliaram seu mecanismo de inibição por um estudo cinético, e a análise gráfica do gráfico recíproco de Lineweaver–Burk mostrou que o derivado é um inibidor de urease não competitivo com um  $K_i$  estimado de 1,99 µM.

**Figura 14** – Compostos projetados por Sohrabi et al. 2022 e seu potencial como inibidores de urease ( $IC_{50}$ )

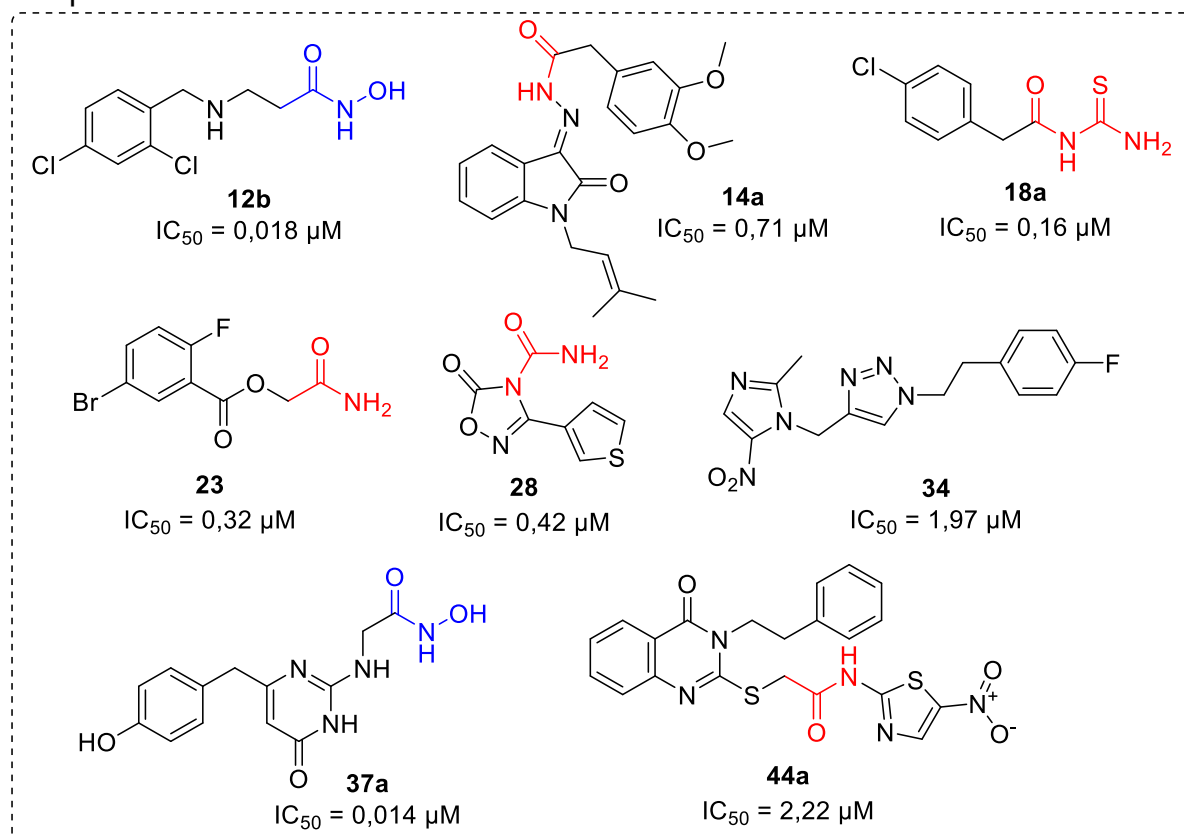


**Fonte:** o próprio autor

**Legenda de cores:** Azul: subunidade quinazolinona; Verde: nitrothiazolacetamida; Rosa: ligante de enxofre; Vermelho: substituintes planejados para a série composta

Dentre os trabalhos aqui apresentados, pode-se observar que as substâncias com maior potência de inibição são substâncias que em algum ponto de sua estrutura mimetizam a ureia, o substrato natural da urease (em vermelho - Figura 15). Além disso, derivados do ácido acetidroxâmico e da tioureia, inibidores clássicos da urease são, de fato, as substâncias que apresentam os melhores resultados de inibição. Ainda, observou-se que estas subunidades geralmente estão posicionadas na extremidade da estrutura, de modo que tenham flexibilidade para adentrar o sítio ativo e, possivelmente interagir com os íons de  $Ni^{2+}$  e/ou resíduos próximos a eles, indispensáveis para a atividade enzimática.

**Figura 15** – Resumo gráfico das melhores substâncias antiureolíticas apresentadas no tópico



**Fonte:** o próprio autor

**Legenda de cores:** Azul: subunidade correspondente ao HAE; Vermelho: subunidade que mimetiza a ureia.

#### 1.4 MÉTODOS COMPUTACIONAIS NO DESENHO DE FÁRMACOS

Os métodos computacionais são um conjunto de ferramentas *in silico* que tem desempenhado um importante papel na descoberta e desenvolvimento de fármacos. Esta estratégia, conhecida como CADD (do inglês: *Computer-Aided Drug Discovery*), consiste no uso de técnicas computacionais para estabelecer um padrão de relação entre a atividade e a estrutura química de substâncias (SURABHI; SINGH, 2018). É um método que vem sendo muito utilizado nas últimas décadas devido a sua capacidade de reduzir tempo e custos na descoberta e desenvolvimento de fármacos. Em geral, os métodos de CADD destacam-se por: serem capazes de filtrar grandes bibliotecas de compostos; auxiliar na otimização de compostos líderes, seja para aumentar a afinidade com o alvo molecular ou otimizar suas propriedades farmacocinéticas; e projetar novos compostos por meio da inserção de fragmentos ou

grupos funcionais para formar novas entidades químicas (SLIWOSKI *et al.*, 2014).

De modo geral, os métodos de CADD que devem ser utilizados irão depender de quais informações sobre o alvo e o ligante estão disponíveis (MAIA *et al.*, 2020). Dito isso, tais métodos são divididos em dois grandes grupos, aqueles baseados na estrutura do ligante (LBDD – do inglês: *Ligand-based Drug Design*) e os baseados na estrutura do alvo molecular (SBDD – do inglês: *Structure-based Drug Design*).

A estratégia de LBDD é considerada uma abordagem indireta para o desenvolvimento de fármacos, pois é utilizada quando nenhuma ou pouca informação estrutural (3D) a respeito do alvo molecular está disponível. Assim, o método baseia-se na análise estrutural de ligantes conhecidos por interagir com o alvo molecular de interesse, de modo que suas propriedades físico-químicas importantes para a interação com o alvo sejam mantidas enquanto que as informações não necessárias, descartadas (SLIWOSKI *et al.*, 2014). As abordagens mais conhecidas desse método incluem a modelagem de farmacóforos, abordagens de similaridade molecular e o estudo de relações quantitativas de estrutura-atividade (QSAR – do inglês: *Quantitative Structure-Activity Relationship*) (LEELANANDA; LINDERT, 2016).

A estratégia de SBDD pode ser aplicada quando informações estruturais tridimensionais sobre o alvo molecular são conhecidas ou possíveis de serem obtidas por meio de modelagem molecular comparativa, bem como outras abordagens, como inteligência artificial (IA) ou cálculo *ab initio* (WANG *et al.*, 2018). Dessa forma, o objetivo central da SBDD é projetar substâncias específicas ao alvo molecular, de modo que se liguem fortemente ao alvo e gerem poucas interações com outras biomacromoléculas (SLIWOSKI *et al.*, 2014). Um dos usos mais comuns dessa estratégia é na triagem virtual de bibliotecas de compostos, docagem molecular e *design* de ligantes (LEELANANDA; LINDERT, 2016).

#### 1.4.1 Docagem Molecular

A docagem molecular é uma abordagem utilizada como forma de prever a afinidade de ligação entre um ligante e uma macromolécula, de modo a avaliar a interação de substâncias com um alvo molecular de interesse (MAGHSOUDI *et al.*, 2022). Portanto, os programas que realizam estes cálculos devem ser capazes

de prever uma pose (um modo de ligação) de uma substância, por meio de funções de busca; com o máximo de afinidade possível com o alvo molecular, utilizando para isso funções de pontuação, de modo rápido e eficaz. Assim, os algoritmos de busca irão pesquisar o melhor espaço conformacional para encontrar a melhor pose de encaixe entre o ligante e a proteína e, então, uma função de pontuação irá prever a afinidade de ligação nessa pose (LEELANANDA; LINDERT, 2016). Alguns dos algoritmos de busca mais usuais são: Monte Carlo, buscas sistemáticas, métodos aleatórios ou estocásticos e métodos de simulação (YADAVA, 2018).

Na busca conformacional, os parâmetros estruturais dos ligantes como graus de liberdade de torção, translacional e rotacional, são modificados até a determinação da conformação mais favorável (YADAVA, 2018). Além disso, a quantidade de experimentos gerados e a complexidade dos cálculos será determinado pela flexibilidade das moléculas envolvidas. Assim, os algoritmos de docagem podem ser categorizados em três conjuntos: docagem de corpo rígido, o qual considera ligante e a macromolécula como sistemas rígidos; docagem semiflexível, onde o ligante é considerado flexível e a macromolécula rígida; e docagem flexível, onde a proteína e o ligante são considerados flexíveis em seu processo de encaixe (SHARMA *et al.*, 2021). Contudo, independente da flexibilidade considerada no processo, o número total de modos possíveis de encaixe aumenta exponencialmente à medida que o tamanho das duas moléculas ancoradas aumenta (LEELANANDA; LINDERT, 2016). Assim, devido à complexidade dos cálculos que são gerados com o aumento da flexibilidade, a maior parte das ancoragens são realizadas em modo semiflexível.

Na busca sistemática, os algoritmos tentam explorar todos os graus de liberdade de uma molécula, acrescentando pequenas variações nos parâmetros estruturais, de modo a localizar a conformação de mais baixa energia, o mínimo global correspondente ao modo de ligação mais provável (SLIWOSKI *et al.*, 2014; YADAVA, 2018). Esta abordagem ainda pode ser classificada de duas formas, em algoritmos de busca exaustiva, onde a melhor conformação do ligante é encontrada girando sistematicamente todas as ligações rotacionáveis da estrutura dentro de um intervalo de tempo específico; e algoritmos baseados em fragmentações, onde faz-se a construção incremental do ligante no sítio ativo, de modo que a flexibilidade da estrutura é incorporada por meio de fragmentos, ligando-os covalentemente, até atingir a conformação bioativa de menor energia (SLIWOSKI *et al.*, 2014; YADAVA,

2018). GLIDE, DOCK, FlexX e SURFLEX são exemplos de programas que utilizam algoritmos de busca sistemática (SLIWOSKI *et al.*, 2014).

Os métodos de busca estocásticos fazem alterações aleatórias no ligante (translacionais ou rotacionais) usando uma função de probabilidade predefinida, de modo que as mudanças favoráveis são aceitas pelo modelo (SLIWOSKI *et al.*, 2014; YADAVA, 2018). Assim, o algoritmo gera um conjunto de conformações para o ligante, com um amplo espectro energético, e aumenta a probabilidade de encontrar um mínimo global (YADAVA, 2018). Algoritmos genéticos, simulações de Monte Carlo e busca tabu são exemplos de métodos estocásticos usando diferentes critérios de probabilidade de aceitação. GOLD e AutoDock são exemplos de programas que utilizam algoritmos genéticos, enquanto que GROMOS, GROMACS e MCDOCK são programas que utilizam algoritmo de Monte Carlo (YADAVA, 2018).

O quão bem uma substância se liga ao seu alvo é determinada pela predição da afinidade de ligação da pose que, por sua vez, é feita por uma pontuação (LEELANANDA; LINDERT, 2016). Assim, as funções de pontuação devem ser capazes de avaliar com rapidez e precisão a pose de afinidade gerada, como forma de classificar os complexos ligante-alvo, e diferenciar as previsões de pose válidas das inválidas (SHARMA *et al.*, 2021; SLIWOSKI *et al.*, 2014).

As funções de pontuação são geralmente categorizadas em quatro tipos: baseadas em campo de força, do tipo empírica, baseadas em conhecimento e as funções baseadas em consenso. As funções de pontuação baseadas em campo de força são desenvolvidas com base nos cálculos da mecânica clássica, que levam em consideração as interações de van der Waals (potencial de Lennard-Jones) e forças eletrostáticas (coulombianas) (LEELANANDA; LINDERT, 2016). Funções como GoldScore, LGA (do inglês: *Lamarckian Genetic Algorithm*), CHARMM, Amber e OPLS são exemplos de funções baseadas em campo de força (WANG *et al.*, 2018).

Funções de pontuação empíricas utilizam dados de estruturas determinadas experimentalmente e parametrizam essas informações, de modo a obter uma energia livre de ligação como a soma ponderada de termos não correlacionados (LEELANANDA; LINDERT, 2016). Esses termos podem ser energias de interação de van der Waals, energia de ligação de hidrogênio, energia eletrostática, hidrofobicidade, energia de dessolvatação (WANG *et al.*, 2018). ChemScore, SCORE,

GlideScore, FlexX e LUDI são alguns exemplos dessa função de pontuação (LEELANANDA; LINDERT, 2016; SHARMA *et al.*, 2021).

Diferentemente das outras funções apresentadas, as baseadas em conhecimento derivam de informações estruturais de complexos ligante-proteína, retirados de banco de dados experimentais como o PDB, para gerar potenciais estatísticos (WANG *et al.*, 2018). Esses potenciais são determinados com base na distribuição de estados de Boltzmann (LEELANANDA; LINDERT, 2016). Por se tratar de um potencial determinado com base em um conjunto de dados específicos, os cálculos tornam-se dependentes dos dados usado para criá-los (LEELANANDA; LINDERT, 2016). Alguns exemplos de funções baseadas em conhecimento incluem ASP (do inglês: *Astex Statistical Potential*), DrugScore, PMF (do inglês: *Potential of Mean Force*), Bleep e IT-Score (LEELANANDA; LINDERT, 2016; SHARMA *et al.*, 2021).

Apesar do grande desenvolvimento presente nos cálculos ao longo dos anos, nenhuma das funções é perfeita em termos de precisão e aplicabilidade, todas possuem suas vantagens e limitações. Assim, a pontuação de consenso foi projetada para combinar várias funções de pontuação e gerar um resultado com menos erros e com mais precisão (LEELANANDA; LINDERT, 2016; WANG *et al.*, 2018). Estratégias baseadas em métodos estatísticos como combinações ponderadas, média e votação de classificações de pontuação podem ser utilizadas nesse processo (SLIWOSKI *et al.*, 2014; WIGGERS *et al.*, 2011). Funções como X-CSCORE, Multi-Score, GFscore, SeleX-CS e CONSENSUS-DOCK são exemplos de funções baseadas em consenso (LEELANANDA; LINDERT, 2016; WANG *et al.*, 2018).

Uma outra estratégia que pode ser utilizada nos cálculos de docagem molecular, no que se refere a validação do método e estratégias para combinar resultados, de modo a obter menos erros, destaca-se também a validação por *cluster*. Neste tipo de abordagem os resultados podem ser agrupados de acordo com similaridades, de modo a se obter diferentes conjuntos de resultados, com pontos de dados semelhantes no mesmo *cluster* e pontos de dados diferentes em *clusters* diferentes (ZHANG, 2022).

Em suma, os cálculos envolvidos no processo de docagem molecular devem ser capazes de fazer previsões a respeito do estado conformacional correto e

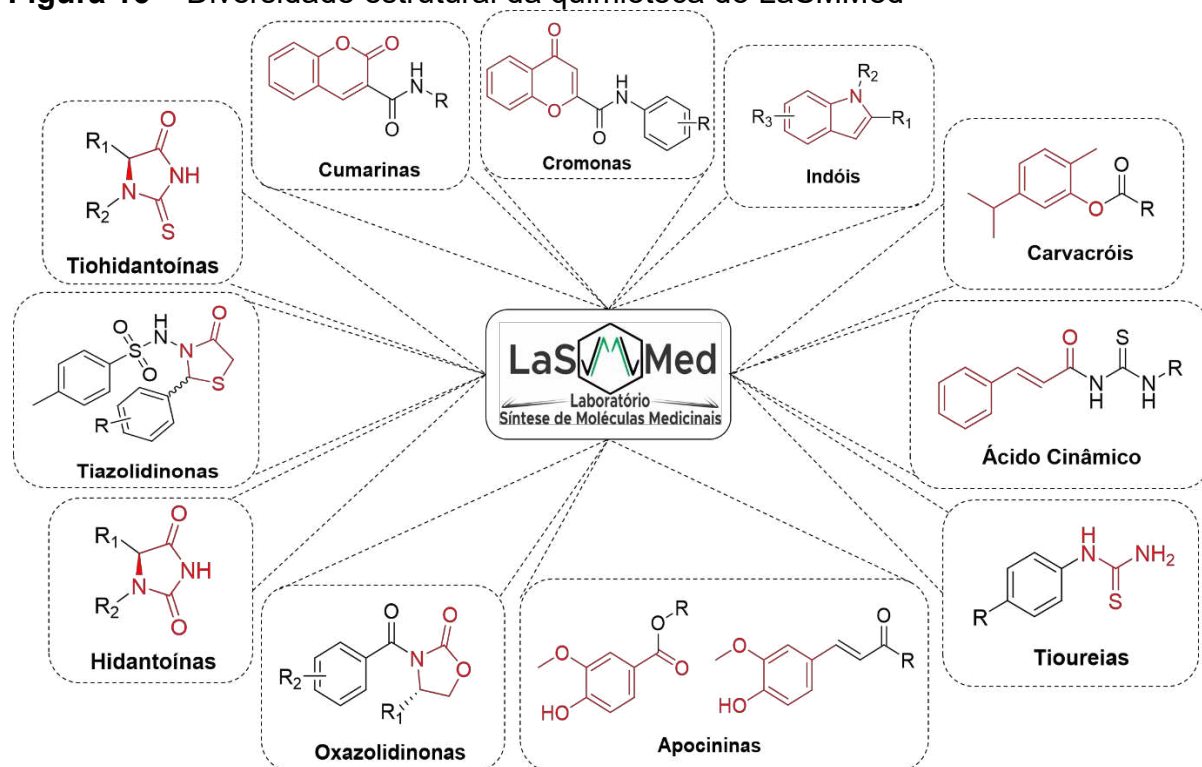
orientação relativa das substâncias, de modo a obter resultados com o máximo de afinidade possível com o alvo molecular. O desempenho desses algoritmos deve ser avaliado de acordo com a sua semelhança de resultados com os complexos experimentais (LEELANANDA; LINDERT, 2016). A maneira mais comum de comparar essa similaridade estrutural é por meio do cálculo de RMSD (desvio quadrático médio) entre as coordenadas atômicas obtidas da simulação e da estrutura cristalográfica (LEELANANDA; LINDERT, 2016; YADAVA, 2018).

### 1.5 APRESENTAÇÃO DO ESPAÇO QUÍMICO – QUIMIOTECA DO LASMMED

As moléculas utilizadas para a triagem virtual foram planejadas e sintetizadas por nosso grupo de pesquisa, o LaSMMed (Laboratório de Síntese de Moléculas Mediciniais) e o LAPSSO (Laboratório de Propriedades e Síntese de Substâncias Orgânicas). A quimioteca do LaSMMed possui uma vasta diversidade estrutural e é composta, atualmente, por mais de 300 substâncias. Dentro destas, derivados indólicos, cumarínicos, tiazolidinonas, carvacrólicos, oxazolidinonas, hidantoínas, tihidantoínas, derivados do ácido cinâmico e tioureias que se apresentam como potenciais grupos farmacofóricos para atividades antibacteriana e antifúngica (Figura 16). Dentro destas diferentes classes de substâncias, substituintes com diferentes características estereo-eletrônicas permitem uma avaliação da influência destes substituintes sobre a atividade biológica desejada. Todos os derivados, em suas estruturas completas, com seus respectivos substituintes, estão dispostos no Apêndice A.

O carvacrol é um monoterpreno, mais comumente encontrado no óleo essencial de orégano e tomilho. A maior parte dos estudos relacionados a este núcleo se concentram no fato de este ser um excelente antibacteriano, até mesmo de bactérias patogênicas humanas como o *H. pylori* (BASSANETTI *et al.*, 2017; BKHAITAN *et al.*, 2018), mas outras propriedades também estão relacionadas com esta subunidade, como anti-inflamatória, antifúngica, antiviral e antioxidante (FRIEDMAN, 2014). Em nosso grupo de pesquisa, o carvacrol foi esterificado, inserido diferentes substituintes (Figura 17) e avaliado como antimicobacteriano frente a cepa H37Rv do *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 27294) e *Xanthomonas* spp (não publicado). (OLIVEIRA, 2020).

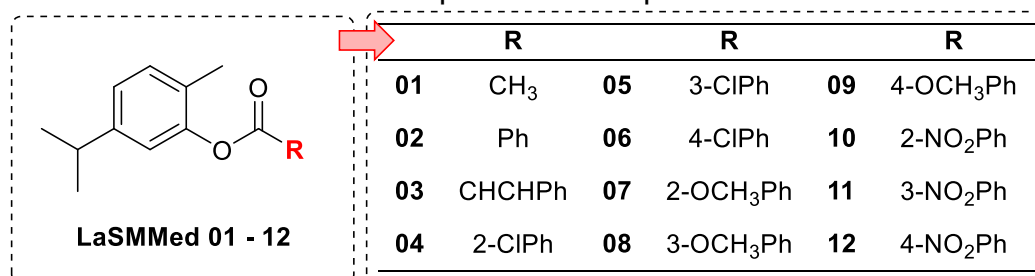
**Figura 16** – Diversidade estrutural da quimioteca do LaSMMed



Fonte: o próprio autor

Legenda de cores: Vermelho: Subunidade principal dos derivados

**Figura 17** – Derivados do carvacrol presentes na quimioteca do LaSMMed



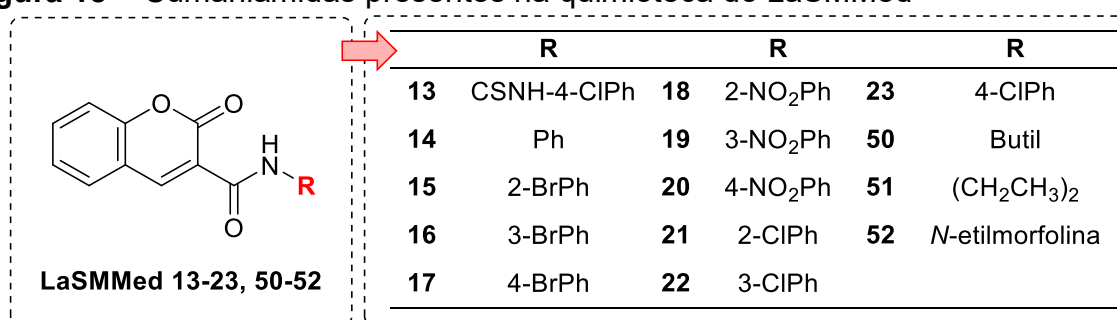
Fonte: o próprio autor

Legenda de cores: Vermelho: Local de inserção dos diferentes substituintes

As cumarinas (2H-Cromen-2-ona) são lactonas do ácido o-hidróxido-cinâmico, presentes no metabolismo secundário de diversas plantas e com um vasto espectro de atividades biológicas relacionadas a este núcleo (AYGUL *et al.*, 2018; KHAN, I. *et al.*, 2020), como antimicrobiana (NUHA *et al.*, 2023), anti-inflamatória (KIRSCH *et al.*, 2016) e antitumoral (CUI *et al.*, 2022). Sinteticamente é um núcleo de fácil obtenção, por meio de reações clássicas de condensação do tipo Knoevenagel, Perkin e Pechman (CUNHA *et al.*, 2015; SALEM *et al.*, 2018). Em nosso grupo de pesquisa, os derivados cumarínicos (Figura 18) foram avaliados quanto a sua

atividade antibacteriana em cepas Gram-positivas de *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC12228) e Gram-negativas de *Escherichia coli* (ATCC25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), além de sua atividade antimicobacteriana como inibidores do *M. tuberculosis* (ATCC 27294) (FABRIS, 2019; SILVA, 2018). Ademais, algumas cumarilamidas também foram avaliados quanto a sua atividade antiureolítica (**LaSMMed 13-23**), antioxidante, antiglicante e fator de proteção solar (dados não publicados).

**Figura 18** – Cumarilamidas presentes na quimioteca do LaSMMed



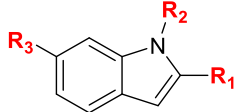
**Fonte:** o próprio autor

**Legenda de cores:** Vermelho: Local de inserção dos diferentes substituintes

O núcleo indólico é constituído por um sistema bicíclico heteroaromático, derivado da fusão do anel pirrol e o benzeno. Devido ao seu amplo espectro de atividade biológicas, o indol é considerado uma subunidade privilegiada, e o desenvolvimento de novas substâncias contendo este núcleo torna-se de grande interesse para a comunidade (DA SILVA *et al.*, 2022; KUMAR; RITIKA, 2020). Naturalmente presente em nosso organismo em substâncias como o triptofano e serotonina, os indóis também estão presente em diversos fármacos comerciais como a Oxipertina, um antipsicótico e antidepressivo; o Arbidol, um antiviral e a Indomelactina um antiinflamatório (KAUSHIK *et al.*, 2013). Além disso, um estudo recente, 2020, conduzido por Khan e colaboradores, híbridos de indol-triazol foram planejados e testados como inibidores de urease e todas as substâncias desenvolvidas foram mais ativas que o controle padrão, a tioureia (melhor derivado: IC<sub>50</sub> = 0,029 µM) (KHAN, W. *et al.*, 2020). Em nosso grupo de pesquisa, parte dos derivados indólicos sintetizados (**LaSMMed 24-33** - Figura 19) foram avaliados como antimicobacterianos de cepa *M. tuberculosis* (ATCC 27294), susceptível tanto à Rifampicina como à Isoniazida, e o derivado **LaSMMed 33** apresentou uma singela inibição da cepa, com CIM = 25 µg/mL (SILVA, 2020), levando então a síntese dos

derivados clorados e fluorados (LaSMMed 34-37 e 74).

**Figura 19** – Derivados indólicos presentes na quimioteca do LaSMMed



LaSMMed 24-37, 74

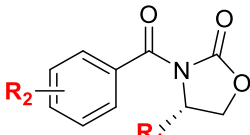
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
24	H	H	CH <sub>3</sub>	29	H	H	4-BrPh	34	5-Cl	H	4-OCH <sub>3</sub> Ph
25	H	H	<i>i</i> -Bu	30	H	H	4-COOCH <sub>3</sub> Ph	35	5-Cl	H	4-BrPh
26	H	H	Ph	31	H	Boc	Ph	36	5-Cl	H	4-COOHPh
27	H	H	4-COOHPh	32	5-Cl	Bz	<i>i</i> -Bu	37	5-Cl	H	4-COOCH <sub>3</sub> Ph
28	H	H	4-OCH <sub>3</sub> Ph	33	5-Cl	H	Ph	74	5-F	H	Ph

Fonte: o próprio autor

Legenda de cores: Vermelho: Local de inserção dos diferentes substituintes

As oxazolidinonas são núcleos conhecidos por estarem presentes em antibióticos sintéticos cuja ação é principalmente bactérias Gram-positivas multirresistentes, como *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE), *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) e *M. tuberculosis* (FOTI *et al.*, 2021). Linezolida foi a primeira oxazolidinona sintética aprovada para uso clínico, posteriormente, a Tedizolida foi aprovada como antibacteriano de segunda geração e na sequência novas modificações estruturais vem sendo realizados na busca por melhores agentes antibacterianos (ZHAO *et al.*, 2021). A combinação deste núcleo com outros vem permitindo a obtenção de novas substâncias antibacterianas com ação em bactérias Gram-negativas e antifúngicas (ZHAO *et al.*, 2021). No LaSMMed, os compostos sintetizados (Figura 20) também foram avaliados como antimicobacterianos, mas não apresentaram resultados promissores (HENRIQUE, 2020; SILVERIO, 2019).

**Figura 20** – Oxazolidinonas presentes na quimioteca do LaSMMed



LaSMMed 38-43, 55-60

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
38	<i>i</i> -Bu	H	41	Bn	4-Cl	55	H	H	58	CH <sub>3</sub>	H
39	Bn	H	42	<i>i</i> -Bu	4-OCH <sub>3</sub>	56	H	4-Cl	59	CH <sub>3</sub>	4-Cl
40	<i>i</i> -Bu	4-Cl	43	Bn	4-OCH <sub>3</sub>	57	H	4-OCH <sub>3</sub>	60	CH <sub>3</sub>	4-OCH <sub>3</sub>

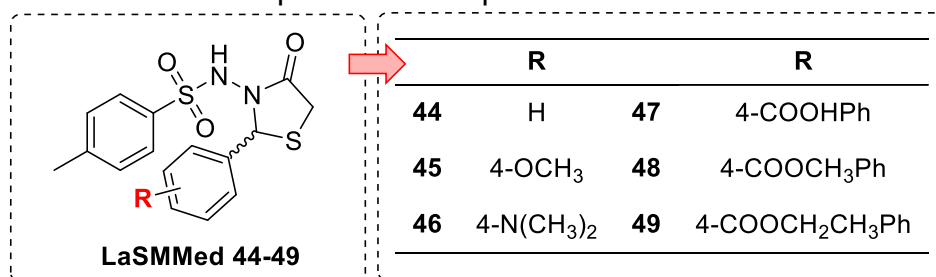
Fonte: o próprio autor

Legenda de cores: Vermelho: Local de inserção dos diferentes substituintes

As tiazolidinonas são subunidades cíclicas de 5 membros, que

contém em sua estrutura um átomo de enxofre, um nitrogênio e uma carbonila (2, 4 ou 5) (JOSE *et al.*, 2021). Seus derivados possuem aplicações clínica em diversas doenças, como antidiabéticos (troglitazona), anti-inflamatória, antiviral, antimalarial e antibacteriana (AQLAN *et al.*, 2022; DHANYA *et al.*, 2021). Além disso, alguns estudos demonstram que este núcleo está associado a substâncias inibidoras da bactéria *H. pylori* e inibidora da enzima urease (KHOMAMI *et al.*, 2019; MAHMOOD *et al.*, 2020). Em nosso grupo, as tiazolidinonas sintetizadas são mostradas na Figura 21, e foram avaliadas como antimicobacterianas, porém não apresentaram atividade inibitória significativa (DAMICO, 2019).

**Figura 21** – Tiazolidinonas presentes na quimioteca do LaSMMed

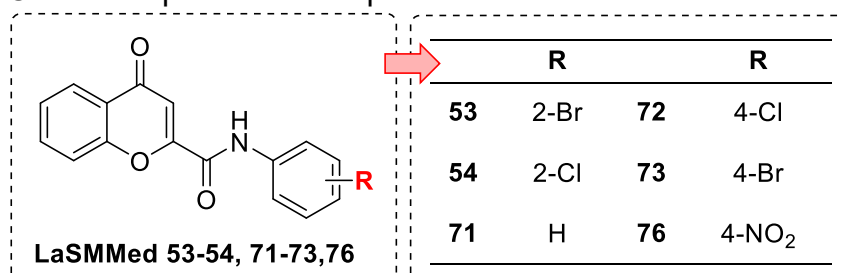


**Fonte:** o próprio autor

**Legenda de cores:** Vermelho: Local de inserção dos diferentes substituintes

Assim como as cumarinas, as cromonas são subunidades heretocíclicas do tipo benzo- $\gamma$ -pirona e amplamente distribuídos na natureza. Atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, anticancerígena e antioxidante estão associadas ao núcleo (FAN *et al.*, 2022; MOHAMMED *et al.*, 2023; SUN *et al.*, 2022). Em nosso grupo de pesquisa, os derivados sintetizados estão sendo investigados quanto suas atividades antioxidantes e como fator de proteção solar (Figura 22).

**Figura 22** – Cromonas presentes na quimioteca do LaSMMed



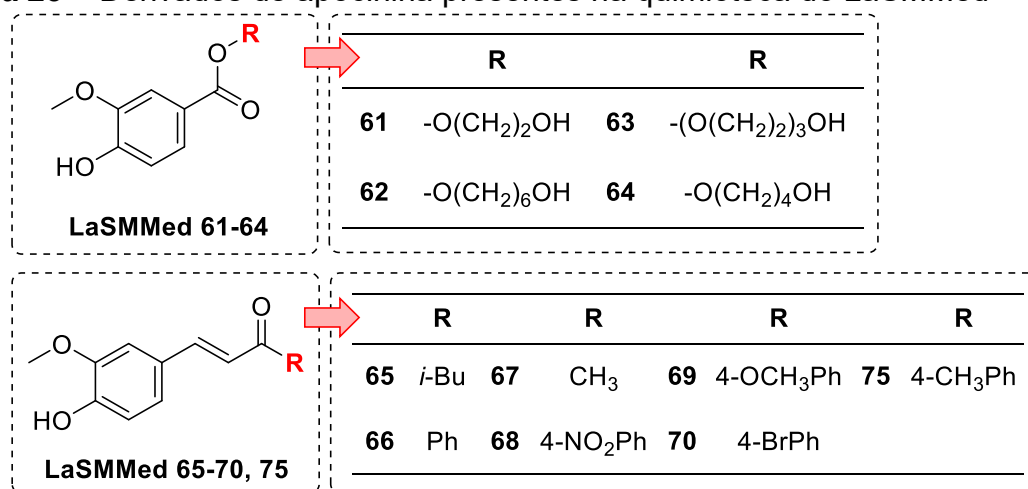
**Fonte:** o próprio autor

**Legenda de cores:** Vermelho: Local de inserção dos diferentes substituintes

Em nosso grupo de pesquisa, os ésteres de apocinina foram

planejados e sintetizados como possíveis inibidores da NADPH oxidase (NOX-2), para o controle do processo de estresse oxidativo (Figura 23) (CAVALCANTE, 2020). Seu potencial anti-inflamatório é bem consolidado na literatura e, por isso, seus derivados são muito estudados para o tratamento de desordens inflamatórias como aterosclerose, hipertensão e doenças renais, Alzheimer, Parkinson e colite ulcerativa (BOSHTAM *et al.*, 2021; STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008).

**Figura 23** – Derivados de apocinina presentes na quimioteca do LaSMMed



**Fonte:** o próprio autor

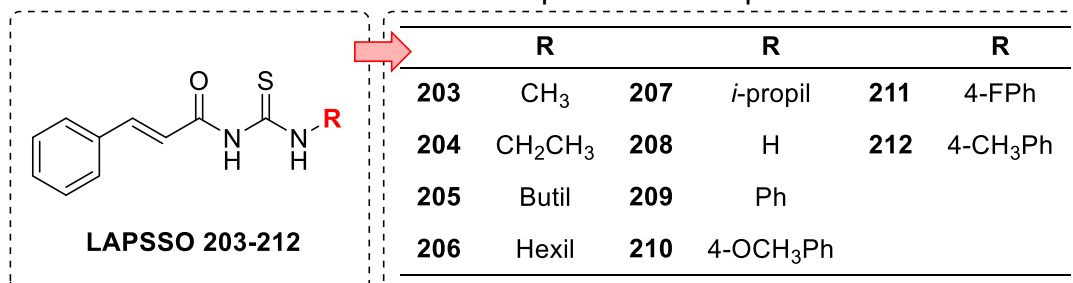
**Legenda de cores:** Vermelho: Local de inserção dos diferentes substituintes

As tioureias são um núcleo já conhecido e estudado em nosso grupo de pesquisa. Brito e colaboradores sintetizaram e avaliaram cerca de 69 benzoiltioureias como inibidores de urease para uso agrícola (BRITO *et al.*, 2015). Devido aos excelentes resultados apresentados, os derivados também foram avaliados como agente antimicrobianos e antiparasitário, com resultados relevantes em ambas frentes (BIASI-GARBIN *et al.*, 2022; BRITO *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2021). Assim, alguns derivados do ácido cinâmico, contendo a subunidade da tiourea, foram sintetizados por nosso grupo de pesquisa (**LAPSSO 203-212** – Figura 24) e atualmente compõem a quimioteca do LaSMMed.

As hidantoínas e tihidantoínas são acilureias/aciltioureias cíclicas, uma classe de compostos heterocíclicos de 5 membros que assim como os outros núcleos, estão associados a diversas atividades biológicas (CARVALHO, 2021). As substâncias sintetizadas pelo grupo de pesquisa (**LAPSSO 168-202** – Figura 25) já foram relatadas na literatura como antiureolíticas (CAMARGO *et al.*, 2022), antimicrobiana (DE CARVALHO *et al.*, 2019), antioxidantes (CAMARGO *et al.*, 2021)

e como agentes anti-leishmania (CAMARGO *et al.*, 2022).

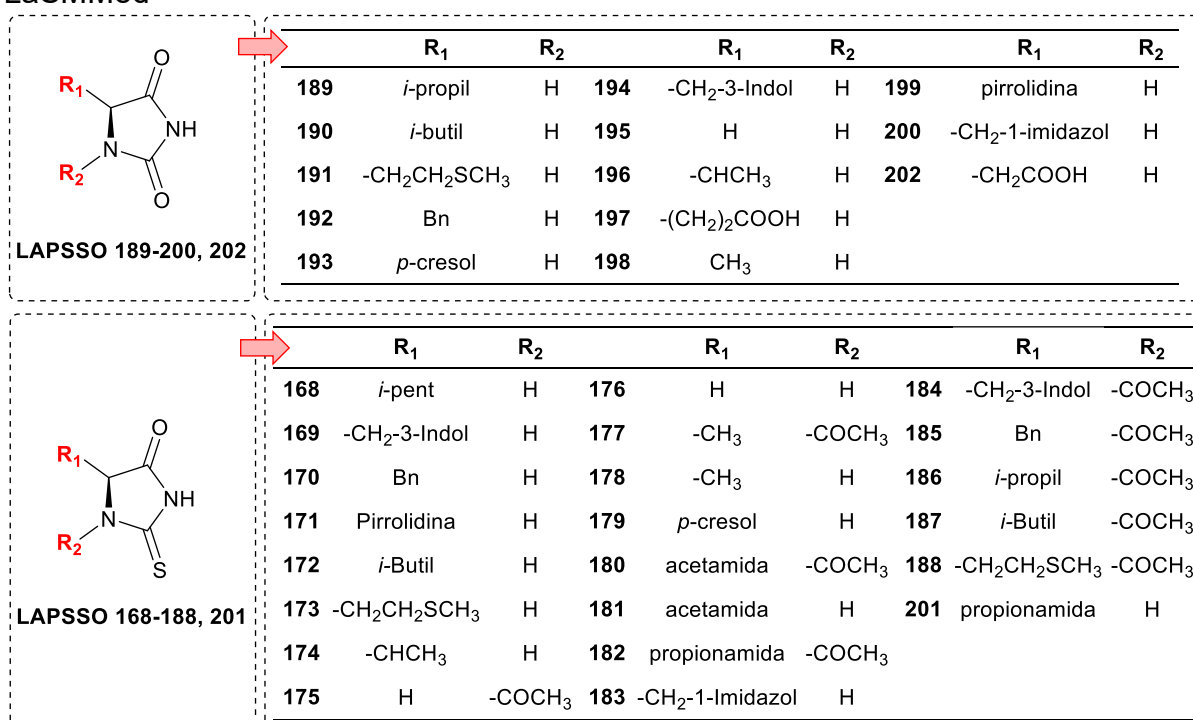
**Figura 24** – Derivados do ácido cinâmico presentes na quimioteca do LaSMMed



**Fonte:** o próprio autor

**Legenda de cores:** Vermelho: Local de inserção dos diferentes substituintes

**Figura 25** – Derivados de hidantoínas e tiohidantoínas presentes na quimioteca do LaSMMed



**Fonte:** o próprio autor

**Legenda de cores:** Vermelho: Local de inserção dos diferentes substituintes

Portanto, tendo em vista a versatilidade biológica das substâncias da quimioteca do LaSMMed, aliada ao fato de que estas possuem pelo menos uma subunidade em sua estrutura associada a atividade antimicrobiana e, considerando o papel essencial da enzima urease para a sobrevivência e virulência dos patógenos, utilizou-se esse espaço químico para realização da triagem virtual e identificação de possíveis substâncias-protótipo com potencial inibitório frente a ureases.

## 2 OBJETIVO

Identificar e avaliar substâncias que compõem a quimioteca do Laboratório de Síntese de Moléculas Medicinais (LaSMMed) como potenciais inibidores de urease de microrganismos ureolíticos, por meio de uma triagem virtual baseada em docagem molecular e ensaios *in vitro* de atividade anti-ureolítica

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 – Síntese e caracterização de derivados indólicos e do ácido cinâmico que compõem a quimioteca do LaSMMed;
- 2 – Validação das metodologias de docagem molecular por *redocagem* em urease de *Canavalia ensiformis* e *Helicobacter pylori*;
- 3 – Identificação de possíveis inibidores dentre os 130 compostos pertencentes à quimioteca do LaSMMed por meio de uma triagem virtual;
- 4 – Avaliação *in vitro* da atividade antiureolítica das substâncias selecionadas em urease vegetal (CEU) e em extrato bruto de urease de *Cryptococcus neoformans*;
- 5 – Estudo cinético de mecanismo de inibição enzimática das substâncias mais promissoras em CEU.
- 6 – Avaliação *in silico* das propriedades de fármaco-similaridade e parâmetros farmacocinéticos das substâncias promissoras.

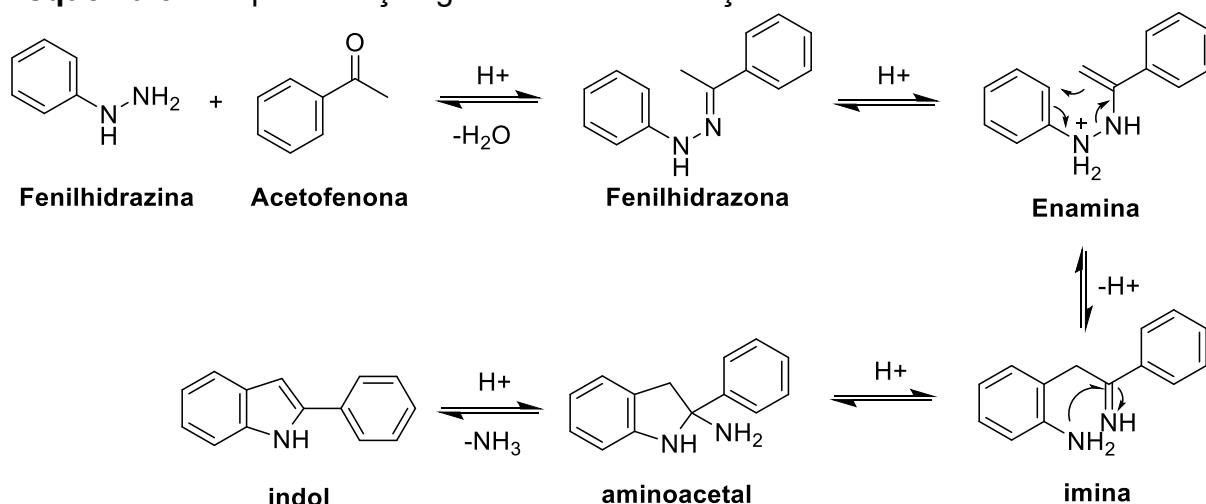
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 EXPANSÃO DA QUIMIOTECA DO LASMMED

##### 3.1.1 Síntese e Caracterização dos Derivados Indólicos

A síntese dos derivados indólicos é baseado na reação conhecida como indolização de Fischer. Neste tipo de reação, a carbonila da acetofenona é ativada por meio de um catalisador ácido, que atua como ácido de Bronsted, tornando-o propício ao ataque nucleofílico da fenilhidrazina para gerar a ligação carbono-nitrogênio e formar a fenilhidrazona correspondente (Esquema 3). Em seguida, ocorre a isomerização da fenilhidrazona para a formação da enamina e depois, após protonação, um rearranjo sigmatrópico ocorre, seguido da rearomatização do sistema através da abstração de um hidrogênio do anel aromático, para a formação da imina correspondente. Por fim, o grupo amino provoca o ataque nucleofílico ao carbono imínico, gerando o anel de cinco membros (aminoacetal cíclico) que, sob catálise ácida, elimina uma molécula de amônia e gera o indol desejado.

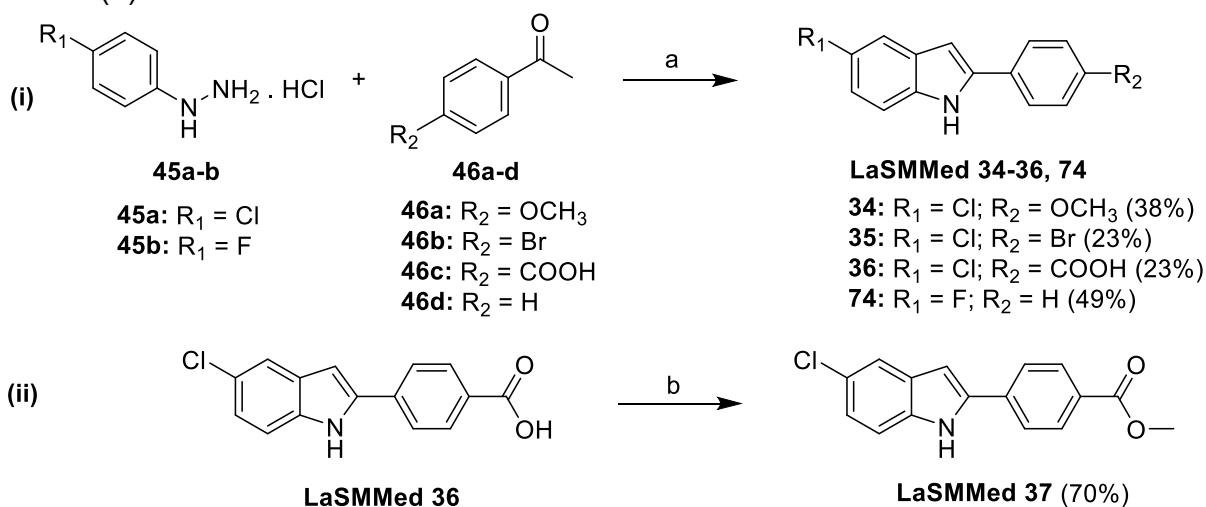
**Esquema 3** – Representação genérica da indolização de Fischer



Fonte: adaptado de Creencia et al. (2011)

Assim, os derivados indólicos (**LaSMMed 34-37** e **74**) foram sintetizados conforme rota sintética sumarizada no Esquema 4.

**Esquema 4** – Rota sintética de obtenção dos derivados indólicos (i) **LaSMMed 34-36** e **74** e (ii) **LaSMMed 37**



**Condições reacionais:** a) PTSA, tolueno, refluxo, 4 - 24h. b) SOCl<sub>2</sub>, MeOH, 0 °C - t.a, 24h.

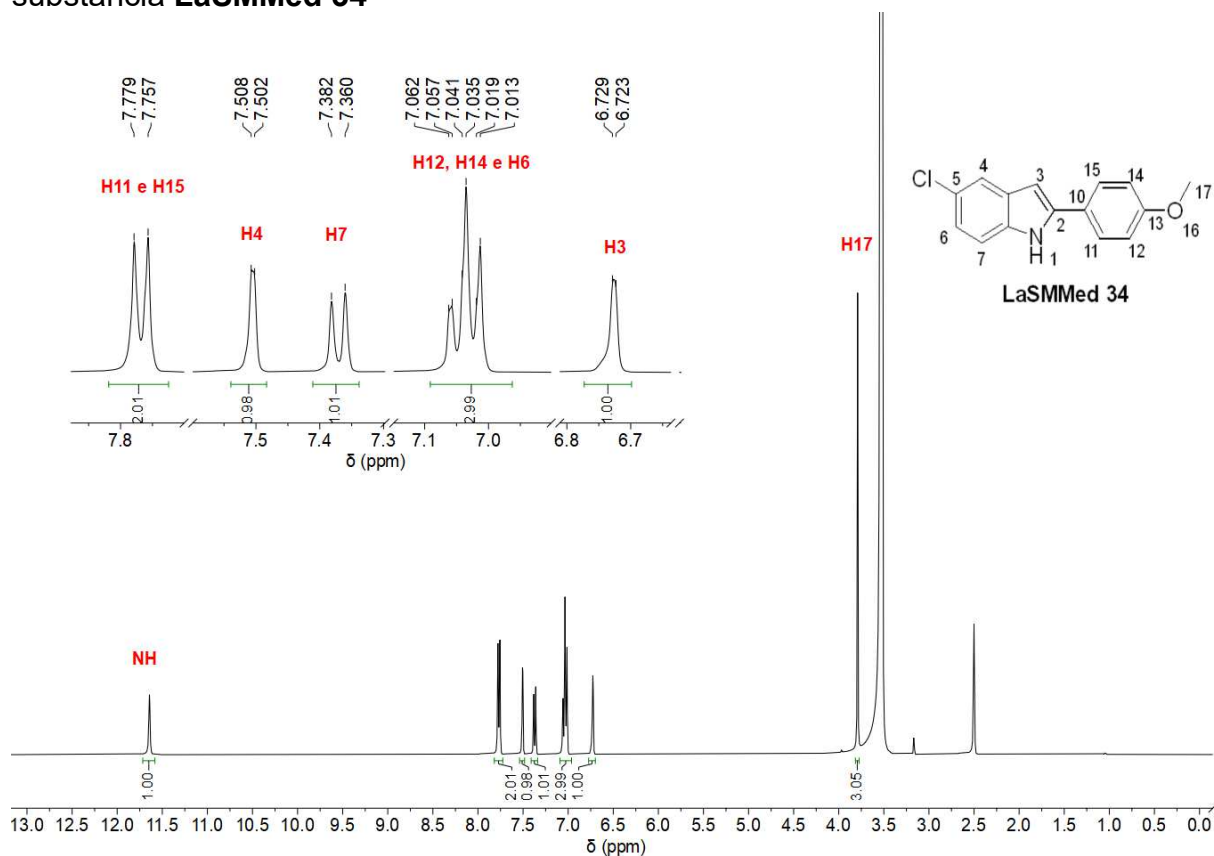
**Fonte:** o próprio autor

De modo geral, a síntese dos derivados ocorre por meio da reação entre a fenilhidrazina desejada (**45a** e **45b**) com a acetofenona substituída (**46a-d**), utilizando como catalisador o ácido *p*-toluenosulfônico (PTSA), a 110 °C, para ciclização e formação *one-pot* dos produtos **LaSMMed 34-36** e **74** (CREENCIA *et al.*, 2011). Posteriormente, para obtenção do **LaSMMed 37**, realizou-se uma reação de esterificação do indol **LaSMMed 36**, por meio de reação com cloreto de tionila (SOCl<sub>2</sub>) e metanol, obtendo-se o indol **LaSMMed 37** (DA COSTA *et al.*, 2012). Todos os produtos obtidos foram recristalizados em metanol, obtendo-se rendimentos finais de 23 a 70%.

Todos os derivados já são relatados na literatura e os espectros de referência foram descritos na seção de METODOLOGIA (p.132-141). Os indóis sintetizados **LaSMMed 34-37** e **74** tiveram suas estruturas confirmadas por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e as respectivas atribuições são mostradas nas figuras dos espectros (Figura B1-10) dispostas no Apêndice B. De maneira geral, os espectros de RMN de <sup>1</sup>H apresentaram sinais característicos do anel indólico, como por exemplo um simpleto largo com deslocamento químico entre 11,94 e 8,33 ppm, que é referente ao sinal do hidrogênio ligado ao nitrogênio indólico, bem como um sinal entre 7,05 ppm e 6,73 ppm, que corresponde ao sinal do H3, além de sinais de hidrogênios aromáticos entre 7,0 e 8,0 ppm. O RMN de <sup>13</sup>C, da mesma forma, apresentou os sinais com

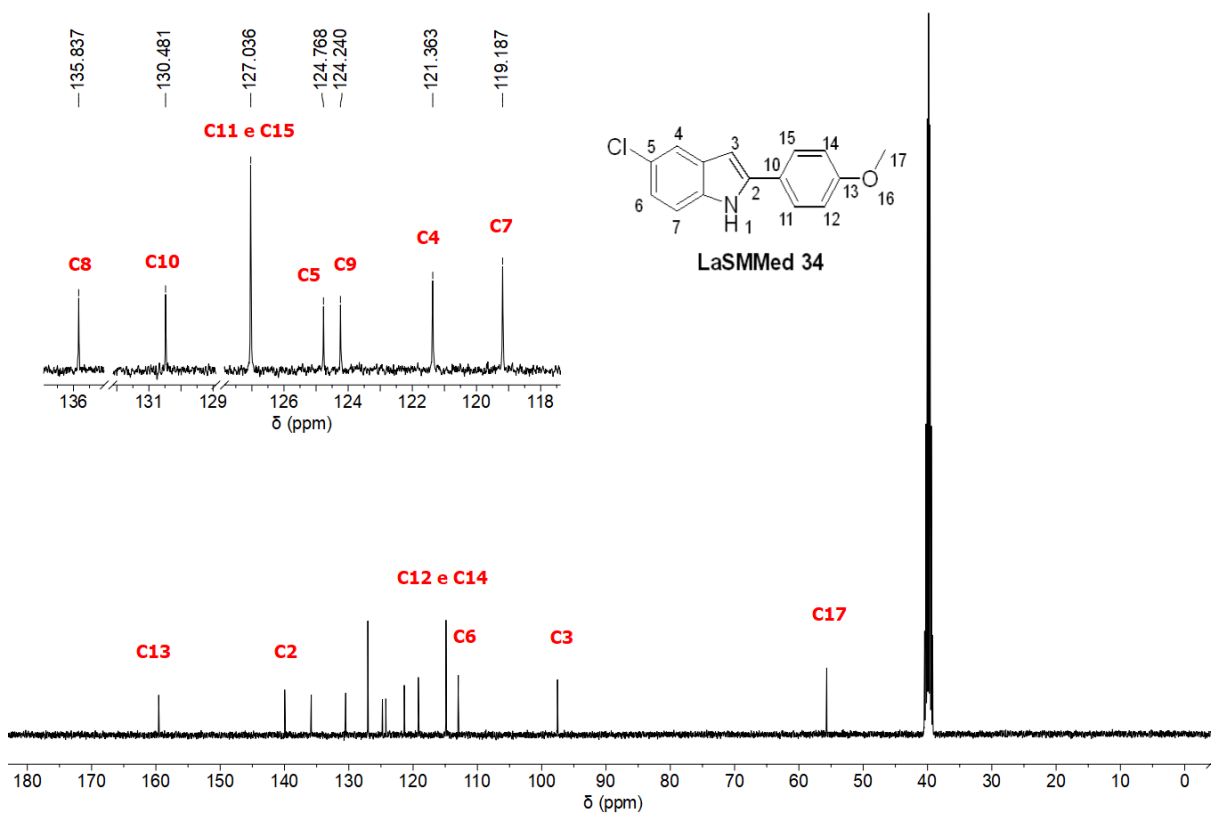
deslocamento característico do carbono ligado ao NH do indol, entre 130 – 140 ppm (C2 e C8), e do sinal do C3 com deslocamentos próximos a 100 ppm. Um exemplo de ambos os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  obtidos na caracterização do **LaSMMed 34** são mostrados nas Figuras 26 e 27.

**Figura 26** – Exemplo de espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) obtido para a substância **LaSMMed 34**



Fonte: o próprio autor

**Figura 27** – Exemplo de espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz) obtido para a substância **LaSMMed 34**



Fonte: o próprio autor

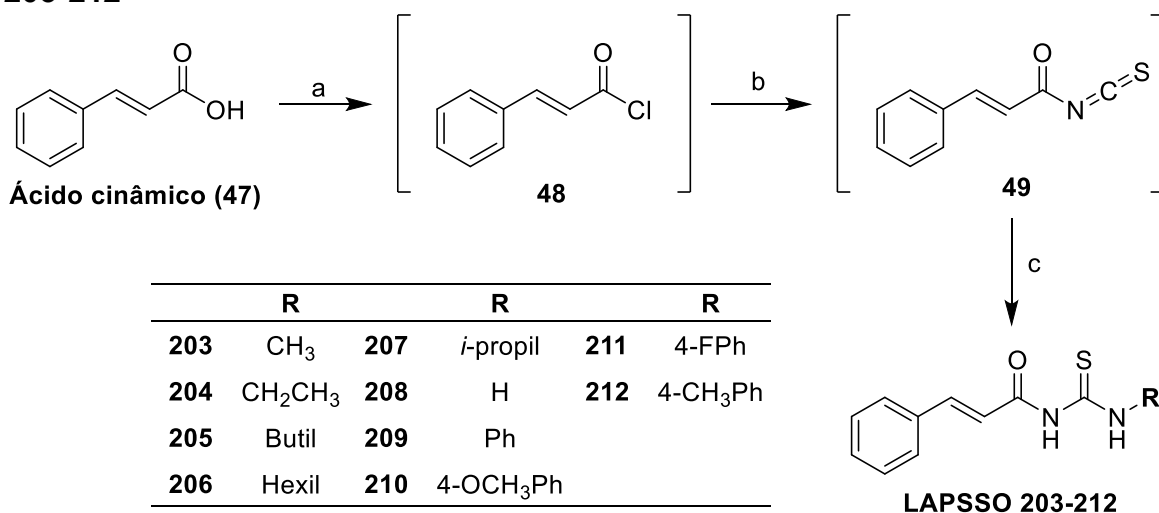
### 3.1.2 Síntese e Caracterização dos Derivados de Tioureia do Ácido Cinâmico

A síntese das tioureias derivadas do ácido cinâmico (**LAPSSO 203-212**) seguiu a metodologia previamente descrita por nosso grupo de pesquisa para a formação de benzoiltioureias, com algumas modificações (BRITO *et al.*, 2015). O preparo das substâncias ocorreu por meio da reação de aminas primárias com o isotiocianato de cinamóila **49**, produzido *in situ*, por meio de um mecanismo de reação de sucessivos processos de adição-eliminação.

Primeiramente, foi realizada a síntese do cloreto do ácido cinâmico (**48**), por meio da reação do ácido cinâmico (**47**) com o  $\text{SOCl}_2$ , sob refluxo e utilizando a dimetilformamida (DMF) como catalisador. Em seguida, a mistura reacional foi concentrada a pressão reduzida e o produto bruto obtido **48** (cloreto do ácido cinâmico), foi dissolvido em acetona seca. Na sequência, numa reação *one pot*, fez-se a adição do tiocianato de amônio ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ ), que reage prontamente com o **48**, para a formação *in situ* do isotiocianato correspondente **49**. Por fim, a amina primária

correspondente é acrescentada ao meio reacional, reagindo com o carbono *sp* eletrofílico do isotiocianato **49**, resultando na formação das substâncias desejadas (**LAPSSO 203-212**) com rendimentos que variaram de 12 a 30%, após devida purificação por recristalização (Esquema 5).

**Esquema 5 – Rota sintética de obtenção dos derivados do ácido cinâmico LAPSSO 203-212**



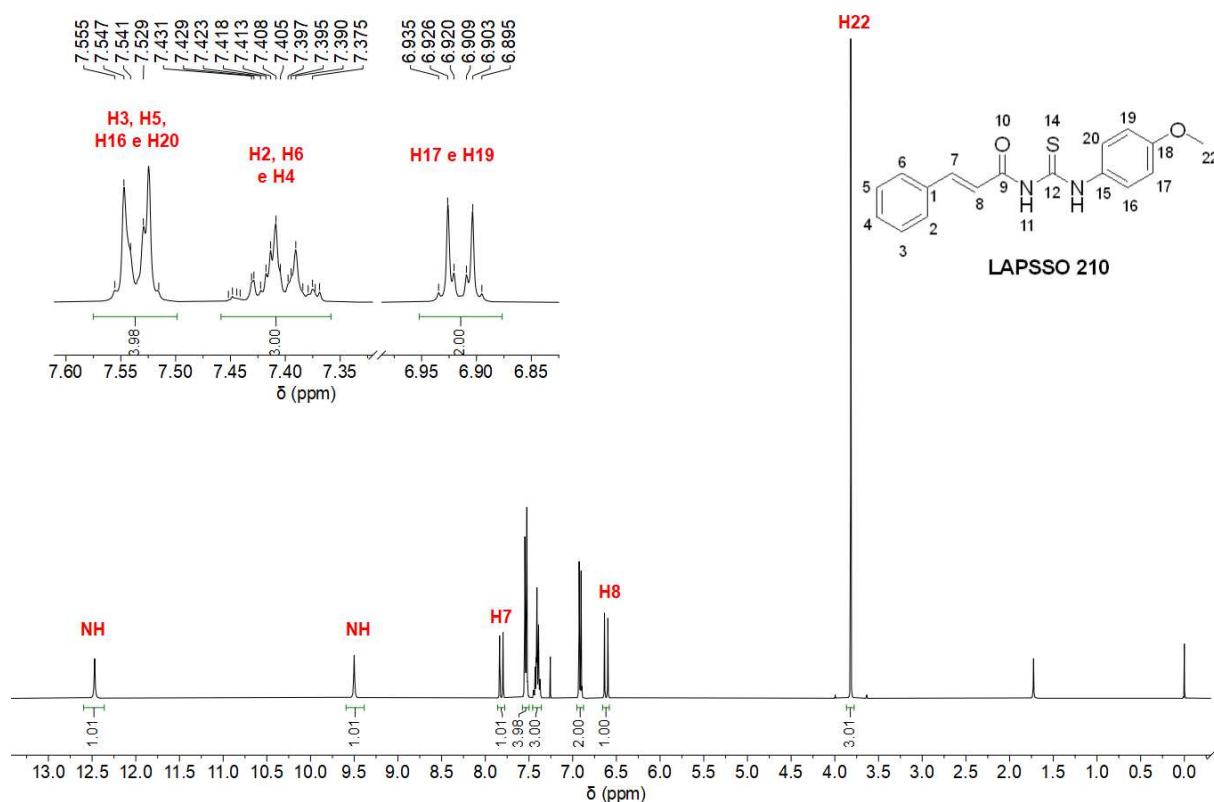
**Condições reacionais:** a) SOCl<sub>2</sub>, DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, refluxo, 3h. b) NH<sub>4</sub>SCN, acetona, refluxo, 15 min. c) RNH<sub>2</sub>, acetona, t.a., 40 min.

**Fonte:** o próprio autor

Os derivados **LAPSSO 203-212** tiveram suas estruturas confirmadas por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (Figura B21-37 – Apêndice B). No RMN de <sup>1</sup>H, é possível observar os sinais característicos de formação dos produtos como um simpleto acima de 10 ppm, característico do NH mais desblindado, entre a carbonila e a tiona; e outro simpleto de NH mais blindado, entre 8,5 - 9,5 ppm. Observa-se também os dupletos característicos dos hidrogênios α (H8) e β (H7) carbonila, em 6,5 – 7,0 ppm e 7,5 – 8,0 ppm, respectivamente, com constante de acoplamento (*J*) de 15,5 – 15,7 Hz. Além disso, a existência dos hidrogênios metínicos na região dos aromáticos (7,0 - 8,0 ppm) confirmam a presença do anel benzênico da porção cinamato e, quando esperado, deste anel diferentemente substituído. Ademais, os espectros de RMN de <sup>13</sup>C também apresentam os sinais de carbono correspondes aos hidrogênios citados: C8 em 120 ppm e C7 próximo a 145 ppm; aromáticos acima de 110 ppm, bem como os carbonos quaternários que caracterizam a formação dos produtos, tais quais: carbonos derivados de ácido carboxílico como C9 e C12, próximos a 180 e 170 ppm,

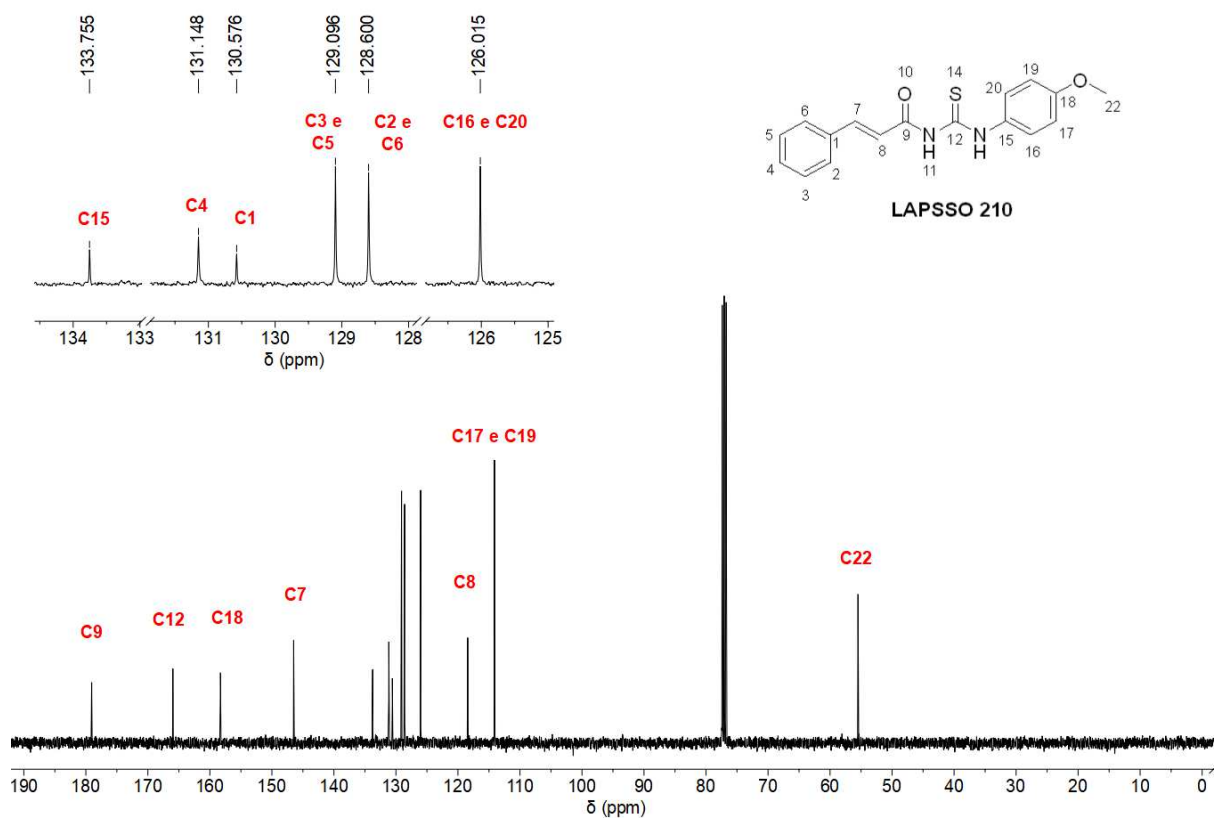
respectivamente; e C1 com deslocamento químico próximo a 130 ppm. Um exemplo de ambos os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  obtidos na caracterização do **LAPSSO 210** são mostrados nas Figuras 28 e 29.

**Figura 28** – Exemplo de espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) obtido para a substância **LAPSSO 210**



Fonte: o próprio autor

**Figura 29** – Exemplo de espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) obtido para a substância **LAPSSO 210**



Fonte: o próprio autor

## 3.2 UREASE COMO ALVO MOLECULAR

### 3.2.1 Similaridade das Ureases

Apesar de estar presente em diferentes microrganismos e plantas, a urease possui um sítio ativo e uma estrutura primária similar entre os diferentes organismos. Embora possam ser constituídas de uma, duas ou três cadeias polipeptídicas, as ureases derivam de um mesmo ancestral comum (KAPPAUN *et al.*, 2018; QIN; CABRAL, 2002). Isso impacta na similaridade dessas substâncias, principalmente com relação a conservação do sítio ativo dessas enzimas e mecanismo catalítico.

Para avaliar a similaridade entre as ureases de interesse, foi realizado o alinhamento da sequência de aminoácidos entre as ureases: vegetal, de *Canavalia ensiformis* (CEU, PDB:4H9M), fúngica, de *Cryptococcus neoformans* (CNU, NCBI:

P0CS23) e bacteriana, de *Helicobacter pylori* (HPU, PDB:6ZJA), que apresentam os seguintes graus de identidade: 57,57% entre CEU e CNU; 39,76% entre CEU e HPU (cadeia B), e 38,92% entre CNU e HPU (cadeia B). O alinhamento completo está disposto na Figura H1, no apêndice H, enquanto que parte do alinhamento, que corresponde a região do sítio ativo e suas vizinhanças está disposto na Figura 30. Neste alinhamento, são destacados em cinza, os resíduos que compõem o sítio ativo das ureases, especificamente os resíduos da CEU, H407, H409, K490, H492, H519, H545 e D633 e seus respectivos idênticos das ureases de CNU e HPU.

**Figura 30** – Parte do alinhamento da sequência de aminoácidos entre as cadeias de CEU, CNU e HPU

4H9M_CEU	404	IDCHVHYICPQLVVEAISSGITTLVGGGTGPAAGTRATTCTPSPTQMRLMLQSTDDLPLNFGFTGKGSSSKPEDLHEIIK	483
CryNB_CNU	397	LDVEMHYICPQLMTEALASGITTVVGGGTGPADGSNATTCSSSFYMQNMKATDTPVPLNFGFTGKGNDSGTNALRDVIE	476
6ZJA_HPU	133	IDTHHFISPQIPTAFASGVTTMIGGGTGPADGTNATTITPGRRLKWMRLAAEEYSMNLGFLAKGNTSNDASLADQIE	212
4H9M_CEU	484	AGAMGLKIHEDWGSTPAADNCLTIAEHDIQINIHDTLNEAGFVEHSIAAFKGRTIHTYHSEGAGGGHAPDIIKVCGI	563
CryNB_CNU	477	AGACGLKIHEDWGATPEVIDRALSDAEDYDVQVNLHSDTLNESGYVESTLAAIKGRTIHSYHTEGAGGGHAPDIIIVCEY	556
6ZJA_HPU	213	AGAIGFKIHEDWGTTPSAINHALDVADKYDVQVAIHTDLNEAGCVEDTMAAIAAGRTMHTFHTTEGAGGGHAPDIIKVAGE	292
4H9M_CEU	564	KNVLPSSSTNPTRPLTSNTIDEHLDMMLVCHHLDRIPEDLAFHRSRIRKKTIAAEDVLNDIGAISSISDQAMGRVGEV	643
CryNB_CNU	557	ENVLPSSSTNPTRPYAVNTLDEHLDMMLVCHHLKSKIPEDIAFADSRIRSETVAAEDVLQDTGAIMISSDQAMGRIGEV	636
6ZJA_HPU	293	HNILPASTNPPTIPFTVNTAEHMDMLVCHHLKSKIKEDVQFADSRIRPQTIAAEDTLHDMGIFISITSSDQAMGRVGEV	372

**Fonte:** o próprio autor

**Legenda:** Resíduos idênticos entre as sequências são dados em vermelho e aqueles que são semelhantes em azul. Os resíduos destacados em cinza são resíduos chave do sítio ativo das enzimas. O alinhamento foi realizado pelo servidor Cobalt ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re\\_cobalt.cgi](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi)) (PAPADOPOULOS; AGARWALA, 2007) e os cálculos de identidade e similaridade pelo Bioinformatics server ([https://www.bioinformatics.org/sms2/ident\\_sim.html](https://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html)) (STOTHARD, 2000).

Assim, devido à similaridade superior a 50% entre a CEU e a CNU, aliado ao fato de que a CNU não possui uma estrutura disponível no banco de dados de proteínas, optamos por utilizar a estrutura da CEU (PDB: 4H9M) como modelo de urease de *Cryptococcus* em nossos estudos de docagem molecular.

### 3.2.2 Mapeamento dos Sítios de Ligação das Ureases de *H. pylori* e *C. ensiformis*

Conhecer a estrutura do alvo molecular é um pré-requisito para estratégias baseadas em SBDD, uma vez que é possível obter informações claras sobre os sítios de ligação, como cavidades, fendas e bolsos alostéricos. Assim, esta informação pode ser aplicada para projetar ligantes de alta afinidade para seu alvo

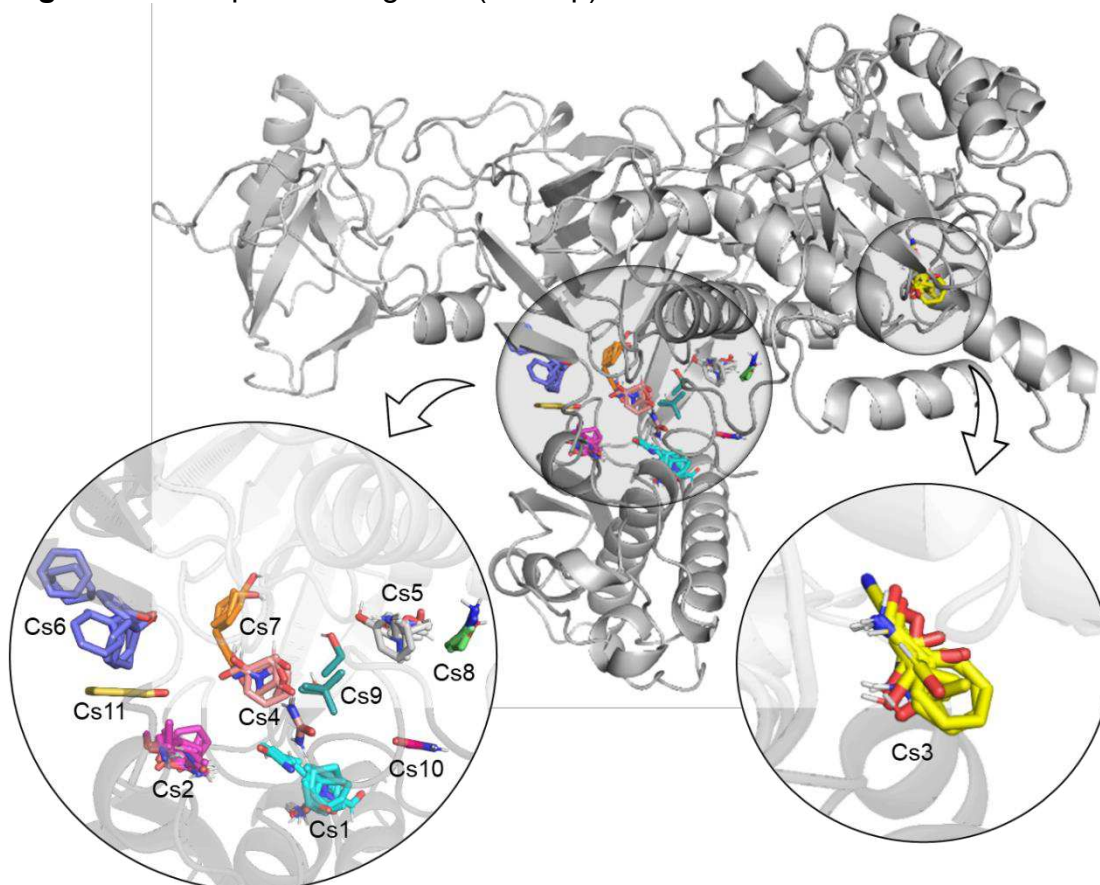
(WANG *et al.*, 2018). Diante do exposto, a docagem molecular é uma etapa decisiva do SBDD, visto que se pode prever o fenômeno da interação proteína-ligante e usar esses dados para estimar a afinidade entre moléculas pequenas e a macromolécula, considerando orientação e conformação dos ligantes, bem como as interações envolvendo resíduos do sítio ativo.

Aqui, usamos o método baseado em energia (FTSite) e o servidor de mapeamento computacional (FTMap) para obter informações sobre os possíveis sítios de ligação da CEU (PDB: 4H9M) e HPU (PDB: 6ZJA). FTMap identifica os *hotspots* de macromoléculas através de diferentes pequenas moléculas (sondas), variando o tamanho, forma e polaridade dessas estruturas, e encontra as posições mais favoráveis para cada sonda (JONES *et al.*, 2022). Em seguida, a sobreposição dessas sondas indica os sítios de consenso, classificando os grupamentos de acordo com a energia média e indicando os resíduos mais favoráveis para interagir por ligações de hidrogênio e interações apolares com essas sondas (BRENKE *et al.*, 2009). Quanto maior a população de sondas, mais importante é o sítio da proteína, e seu menor consenso identifica outros subsítios importantes.

O mapeamento global do CEU mostrou onze pontos relevantes (*hotspots*), que foram divididos em duas grandes regiões de bolsões de consenso (Figura 31). A região menor é composta pelo sítio de consenso três (Cs3) que agrupa 14 sondas, com características diferentes, de etanol a benzaldeído, representadas como bastões amarelos, caracterizando o sítio ativo da CEU.

A segunda região do *hotspot*, a maior, é composta por um total de dez grupamentos de consenso, sendo Cs1 (ciano – Figura 31) e Cs2 (em roxo – Figura 31) a maior população de sondas, com 20 sondas de consenso cada. Esta região corresponde aos sítios alostéricos do CEU. Os outros agrupamentos de consenso identificados pelo FTMap, caracterizam subsítios menores como mostrado na Figura 31, onde há o Cs4 (salmão) com dez sondas de consenso, Cs5 (cinza) e Cs6 (azul) com oito sondas cada, Cs7 (laranja) com cinco sondas de consenso, Cs8 (verde pálido) apresentando consenso de quatro sondas e outras até o décimo primeiro consenso.

**Figura 31** – Mapeamento global (FTMap) da CEU



**Fonte:** o próprio autor

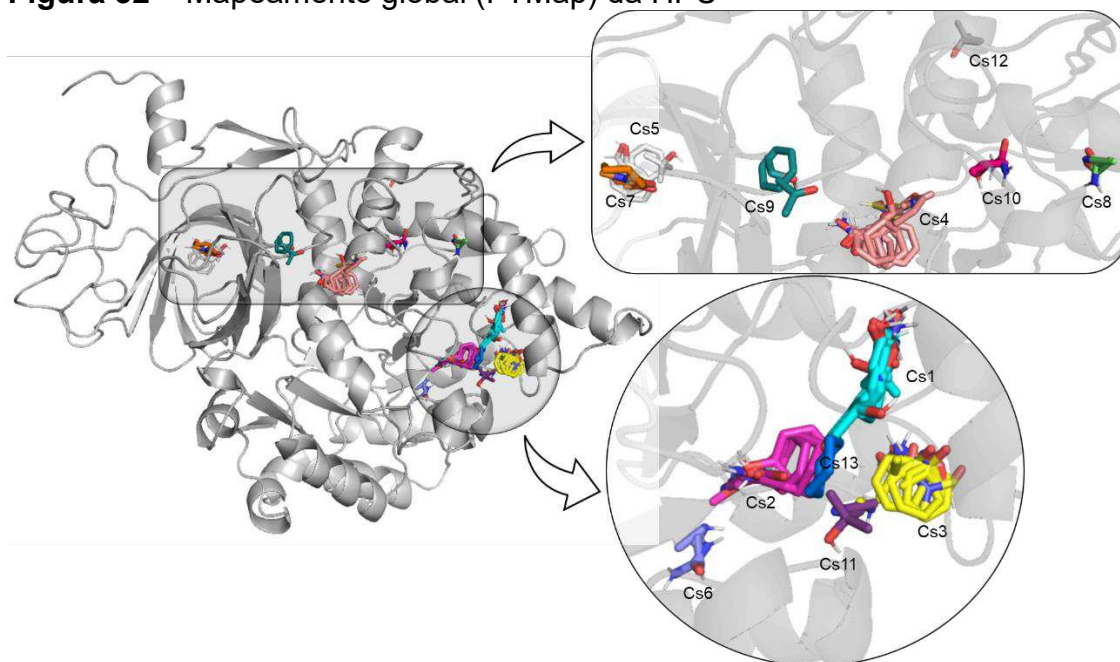
**Legenda de cores:** As sondas são codificadas por cores de carbono para distinguir entre os diferentes Cs: Cs1, ciano; Cs2, magenta; Cs3, amarelo; Cs4, salmão; Cs5, cinza; Cs6, azul; Cs7, laranja; Cs8, verde pálido; Cs9, azul marinho; Cs10, rosa e Cs11, amarelo pálido. Os outros átomos são coloridos como os elementos: O: vermelho; N: azul e H: branco.

De acordo com o FTMap, dentre os resíduos de aminoácidos que compõem a estrutura da CEU, E742, K716, Q82, H492, E718, Y32, V744, S421, R609 e H519, respectivamente, são os mais propensos a fazer interações por ligações de hidrogênio, enquanto Y32, F712, K716, T33, V36, E742, V744, D730, A80 e A37 são mais propensos a fazer interações hidrofóbicas com as sondas.

O FTMap de HPU apresentou resultados semelhantes na distribuição de sondas para CEU, sendo que uma das regiões é mais populosa enquanto outra está distribuída em pequenas regiões de consenso (Figura 32). Um total de 13 *hotspots* foram identificados para o HPU FTMap, mas podemos ver que os três primeiros *grupamentos* de consenso com a maior população (18 grupamentos de sonda para o Cs1 e Cs2 e 16 grupamentos de sonda para o Cs3) estão muito mais próximos entre si e pode ser encontrado no sítio ativo da HPU, o que implica que o

sítio é drogável (KOZAKOV *et al.*, 2015). Além disso, sondas secundárias com menos grupamentos de consenso (Cs6, Cs11 e Cs13 com 4, 2 e 1 sonda, respectivamente) também estão próximas aos *hotspots* populosos. Por fim, há sete sítios de consenso majoritariamente menores fora do sítio ativo da HPU, onde o cluster mais populoso é Cs4 (salmão), com 12 consensos de sonda; Cs5 com cinco sondas, seguido por Cs7, Cs8, Cs9, Cs10 e Cs12 com quatro, três e duas sondas de consenso.

**Figura 32** – Mapeamento global (FTMap) da HPU



**Fonte:** o próprio autor

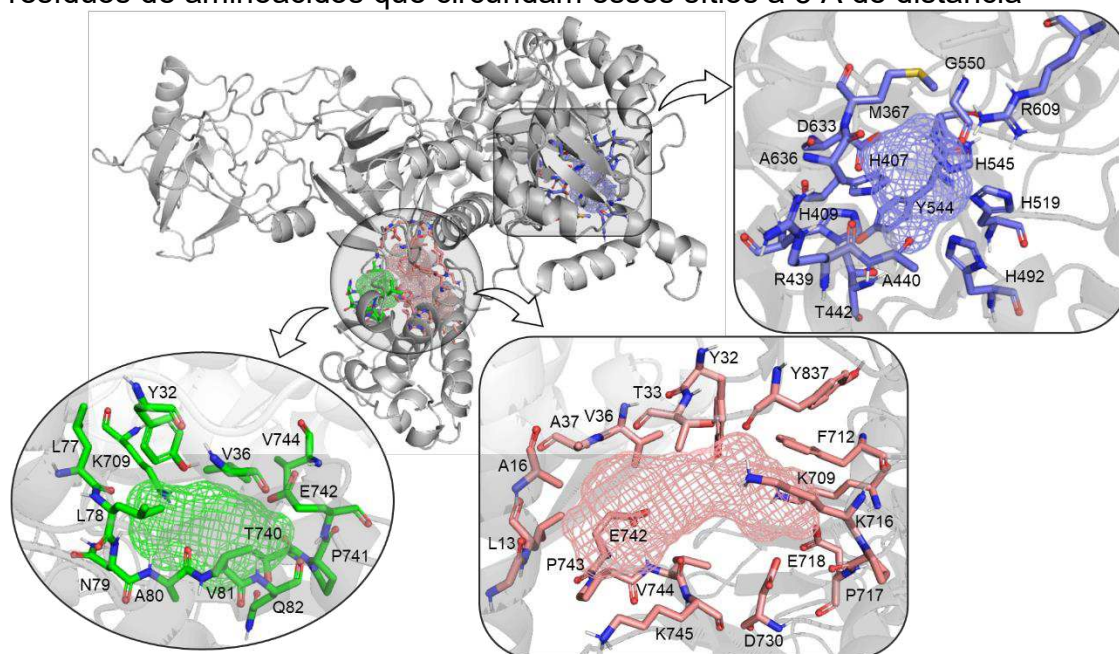
**Legenda de cores:** As sondas são codificadas por cores de carbono para distinguir entre os diferentes Cs: Cs1, ciano; Cs2, magenta; Cs3, amarelo; Cs4, salmão; Cs5, cinza; Cs6, azul; Cs7, laranja; Cs8, verde pálido; Cs9, azul marinho; Cs10, rosa e Cs11, amarelo pálido. Os outros átomos são coloridos como os elementos: O: vermelho; N: azul e H: branco.

De acordo com HPU FTMap, os dez resíduos de aminoácidos mais favoráveis para interações via ligação de hidrogênio com as sondas são R338, H221, D362, H248, A365, C321, H274, H322, A169 e G279, respectivamente. Por outro lado, para interações hidrofóbicas, os resíduos mais favoráveis para interagir com as sondas são L318, A169, H138, H248, M317, H314, M366, H221, D362 e H136.

O servidor FTSite pode combinar *hotspots* próximos previstos pelo FTMap para identificar possíveis locais de ligação de substâncias nas macromoléculas (NGAN *et al.*, 2012). De acordo com o FTSite, o sítio de ligação geralmente tem um *hotspot* forte; assim, para a CEU e HPU, o *software* identificou três sítios de ligação para cada urease. A CEU tem dois sítios de ligação fortes

identificados no “cabo de martelo” da macromolécula e outro na cabeça do martelo (Figura 33). Podemos ver a região rosa que corresponde ao sítio de ligação mais forte (área de superfície = 433,67 Å<sup>2</sup>), é cercado pelos resíduos de aminoácidos da cadeia inicial (L13 - A37) e do final da sequência de aminoácidos (até Y837). O sítio de ligação verde (área de superfície = 257,99 Å<sup>2</sup>) possui resíduos terminais como o rosa, de K709 até V744; porém, localiza-se mais na extremidade esquerda da proteína, interagindo principalmente com os resíduos iniciais da cadeia A (Y32 - Q82). Por fim, o *hotspot* azul corresponde ao sítio ativo da CEU (área de superfície = 106,95 Å<sup>2</sup>). Este centro é cercado por quatro resíduos de histidina (H407, H409, H492 e H519), dois resíduos de alanina (A440 e A636) e dois resíduos de arginina (R439 e R609), uma metionina (M367), uma treonina (T442), uma glicina (G550), uma tirosina (Y544) e um resíduo de aspartato (D633). Esses resíduos de aminoácidos estão a uma distância de 5 Å do centro do sítio ativo, para que possam interagir com os ligantes que poderiam se ligar à macromolécula.

**Figura 33** – Três sítios de ligação identificados pelo FTSite da CEU (PDB: 4H9M) e os resíduos de aminoácidos que circundam esses sítios a 5 Å de distância



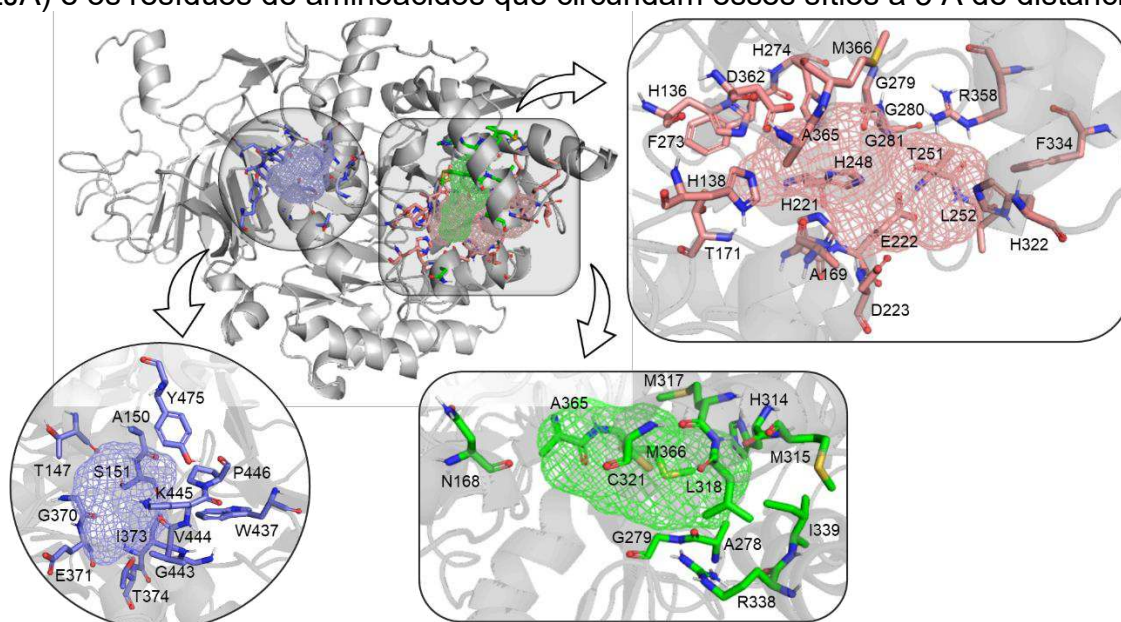
**Fonte:** o próprio autor

**Legenda de cores:** Sítio de ligação 1: salmão; 2: verde e 3: azul.

O servidor FTSite identificou na HPU o sítio ativo como o *hotspot* principal 'forte' (rosa – Figura 34). Os resíduos que circundam o sítio ativo são seis

resíduos de histidina (H136, H138, H221, H248, H274 e H322), três resíduos de glicina (G279, G280 e G281), dois resíduos de alanina (A169 e A365), dois resíduos de fenilalanina (F273 e F334), dois resíduos de aspartato (D223 e D362), bem como resíduos de T171, E222, L252, R358, M366 e os dois íons  $\text{Ni}^{2+}$ . Este sítio é ligeiramente maior do que o sítio ativo da CEU, com uma área de superfície de 238,29  $\text{\AA}^2$ . Além disso, o *hotspot* secundário (verde – Figura 34) está próximo o suficiente para ser alcançado por um ligante presente no *hotspot* principal, o que pode ser observado pelos resíduos de aminoácidos em comum que circundam ambos os locais (G279, A365 e M366). Além disso, resíduos como N168, A278, H314, M315, M317, L318, C321, R338 e I339 também compõem o sítio verde (área de superfície = 202,29  $\text{\AA}^2$ ). O FTSite também identificou um terceiro sítio de ligação na HPU (azul – Figura 34). Este sítio de ligação é menor (área de superfície = 206,17  $\text{\AA}^2$ ) e pode ser interpretado como o sítio alostérico da cadeia B da HPU. Este tem como centro correspondente o *cluster* de consenso Cs4 identificado pelo FTMap e próximo ao Cs9.

**Figura 34** – Sítios de ligação identificados pelo FTSite da cadeia B da HPU (PDB: 6ZJA) e os resíduos de aminoácidos que circundam esses sítios a 5  $\text{\AA}$  de distância



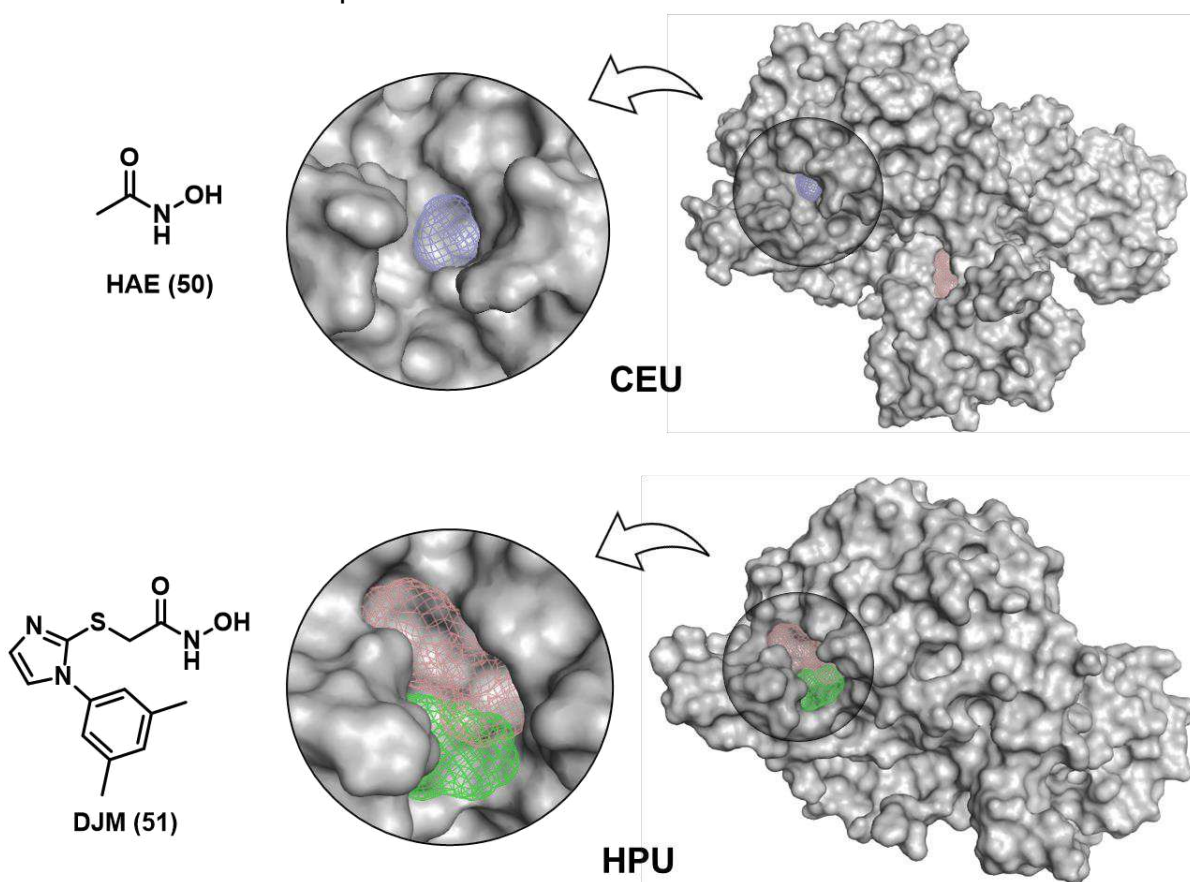
**Fonte:** o próprio autor

**Legenda de cores:** Sítio de ligação 1: salmão; 2: verde e 3: azul.

Podemos ver por meio das análises FTMap e FTSite que o tamanho dos sítios ativos para as duas enzimas é diferente. O sítio ativo da CEU é pequeno, enquanto o sítio ativo da HPU é grande e parece suportar estruturas com maior

volume molecular (Figura 35). De fato, isto pode ser visualizado pelos inibidores presentes nos sítios ativos de ambas as biomacromoléculas. CEU possui uma molécula de ácido acetoidroxâmico (HAE - **50**) co-cristalizada em seu sítio ativo, enquanto que HPU possui um derivado do HAE, o 2-[[1-(3,5-dimetilfenil)-1H-imidazol-2-il]sulfanil]-*N*-hidroxiacetamida (DJM - **51**).

**Figura 35** – Os sítios ativos identificados pelo FTSite: CEU (malha azul) e HPU (malha salmão e verde) juntamente com as estruturas 2D dos ligantes (HAE e DJM) co-cristalizados com as respectivas ureases



**Fonte:** o próprio autor

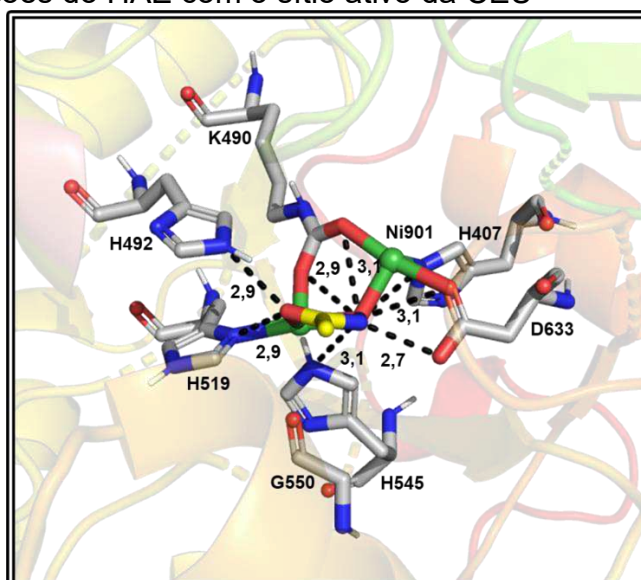
**Legenda de cores:** Sítio de ligação em malha salmão, verde e roxo. As proteínas são mostradas como superfícies

### 3.3 UREASE DE CANAVALLIA ENSIFORMIS

O ácido acetoidroxâmico (HAE) é considerado um bom agente quelante e, por isso, desde sua descoberta, vem sendo utilizado como inibidor de metaloproteínas (KUMAR; KAYASTHA, 2010). Ainda nos anos 1960, o HAE foi relatado como um potente inibidor da urease e, desde então, vem sendo empregado

no tratamento de infecções do trato urinário e úlceras estomacais (GRIFFITH *et al.*, 1978; KOBASHI *et al.*, 1962). Na urease vegetal (CEU), o HAE possui uma potência inibitória ( $IC_{50}$ ) entre 17,30 – 43,20  $\mu\text{M}$  (BALASUBRAMANIAN; PONNURAJ, 2010; JABRI *et al.*, 1995). Este ligante interage com íons de níquel (Ni901 e Ni902) e faz interações por ligação de hidrogênio com cinco resíduos de aminoácidos, três histidinas, um aspartato e a lisina carboxilada (K490) (Figura 36). O oxigênio da carbonila presente no HAE quelar com o Ni902 e interage por ligação de hidrogênio com os nitrogênios das H492 e H519 a distância de 2,9 Å. O nitrogênio (NH) do HAE faz uma interação por ligação de hidrogênio a uma distância de 2,7 Å com o D633, enquanto que a hidroxila (OH) faz ligação de H com os oxigênios do carboxilato da K490 a distâncias de 2,9 e 3,1 Å. A hidroxila também é capaz de quelar com o Ni901 e interage com o oxigênio da carbonila do D633 e com os NH das H407 e H545 a distâncias de 3,1 Å. Ainda, ocorre uma interação hidrofóbica entre a cadeia carbônica do HAE com a G550. De fato, a maioria desses resíduos foram identificados pelas análises do FTSite e circundaram o local destacado em azul (Figura 33). Essas informações podem ser utilizadas no processo de validação do método de docagem molecular aplicado em nossa pesquisa.

**Figura 36** – Interações do HAE com o sítio ativo da CEU



**Fonte:** o próprio autor

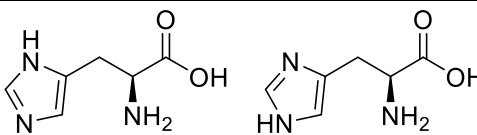
**Legenda de cores e representação:** A cadeia carbônica dos aminoácidos é demonstrada na cor cinza e do ligante na cor amarela, ambos na forma bastão. Os íons de níquel estão no formato de bolas de cor verde. O restante dos átomos é demonstrado nas cores correspondentes aos elementos. Vermelho: oxigênio; Azul: nitrogênio; Branco: hidrogênio. As interações por ligação de hidrogênio convencional são demonstradas como pontos pretos

Os estudos de docagem molecular podem ser validados por diferentes metodologias, contudo, o mais comum deles é denominado *redocagem* (PRIETO-MARTÍNEZ *et al.*, 2018). A aplicação deste último método só é possível se houver a presença de um ligante co-cristalizado com a macromolécula-alvo. Este processo visa avaliar a capacidade da função de pontuação em reproduzir a orientação do ligante co-cristalizado (COLE *et al.*, 2005; TRIPATHI *et al.*, 2020). Quanto menor for o valor de RMSD da pose obtida em relação àquela observada experimentalmente, maior será a capacidade preditiva da *redocagem*, de modo que as interações com os mesmos resíduos de aminoácidos dos dados experimentais também podem ser utilizadas para avaliar a qualidade da predição. Em geral, considera-se que um RMSD de até 2,0 Å é aceitável para atestar qualidade preditiva do modelo (HEVENER *et al.*, 2009; PRIETO-MARTÍNEZ *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2016).

### 3.3.1 Validação da Docagem Molecular

A presença do HAE no sítio ativo da enzima de *Canavalia ensiformis* nos permite a aplicação do protocolo de validação por *redocagem*. Assim, a docagem molecular do HAE foi realizada nas quatro funções de pontuação disponíveis no programa GOLD (GoldScore, ChemScore, ChemPLP e ASP). Além disso, fez-se necessário considerarmos a possibilidade de permutação dos tautômeros, das quatro histidinas presentes no sítio ativo (H409, H407, H545 e H519), conforme demonstrado na Tabela 1, onde a possibilidade 0 corresponde a protonação do nitrogênio ND1H e a possibilidade 1 do nitrogênio NE2H. Assim, para determinarmos o melhor resultado obtido na *redocagem* para as 16 possibilidades de permutação, avaliou-se o menor valor de RMSD, o número total de interações e, como fator de desempate, número de interações por ligação de hidrogênio em relação as interações do HAE experimental. As interações caracterizadas como impedidas estericamente não foram computadas na somatória total. O resultado pode ser visualizado na Tabela 2. Todos os valores de RMSD, pontuações e interações obtidas para as combinações estão dispostas no (Apêndice C).

**Tabela 1** – Melhor função de pontuação em termos de menor valor de RMSD e maior número de interações, para as 16 possibilidades de tautômeros das histidinas



	Possibilidade 0				Possibilidade 1			
	H407	H492	H519	H545	Menor RMSD	Função	Maior N° Interações	Função
1	0	0	0	0	0,243	ASP	6	ASP
2	0	0	0	1	0,238	ASP	5	ASP e ChemScore
3	0	0	1	0	0,314	ASP	6	ChemScore
4	0	0	1	1	0,238	ASP	6	ASP e ChemScore
5	0	1	0	0	0,222	ChemScore	7	ASP
6	0	1	0	1	0,214	ASP	6	ASP e ChemScore
7	0	1	1	0	0,225	ASP	8	ChemScore
8	0	1	1	1	0,199	ASP	7	ASP e ChemPLP
9	1	0	0	0	0,241	ASP	6	ChemScore
10	1	0	0	1	0,360	ASP	7	ASP
11	1	0	1	0	0,295	ASP	7	ChemScore
12	1	0	1	1	0,229	ASP	7	ChemScore
13	1	1	0	0	0,232	ASP	5	ASP e ChemScore
14	1	1	0	1	0,235	ASP	5	ASP e ChemScore
15	1	1	1	0	0,240	ASP	7	ASP
16	1	1	1	1	0,173	ASP	6	ASP

Fonte: o próprio autor

**Tabela 2** – Redocagem do HAE, considerando a combinação 16 de possíveis tautômeros para as histidinas

Função	Pontuação	RMSD (Å)	Interações									
			H 407	H 409	K 490	H 492	H 519	H 545	G 550	D 633	Ni 901	Ni 902
HAE	-	-										
GoldScore	36,32	1,191										
ChemScore	25,87	0,315										
ChemPLP	39,45	0,499										
ASP	29,73	<b>0,173</b>										

Fonte: o próprio autor

Legenda de cores:

	Hidrogênio convencional		Metal-Aceptor
	Hidrogênio não-convencional		Repulsão estérica

As quatro funções de pontuação utilizadas na redocagem podem ser

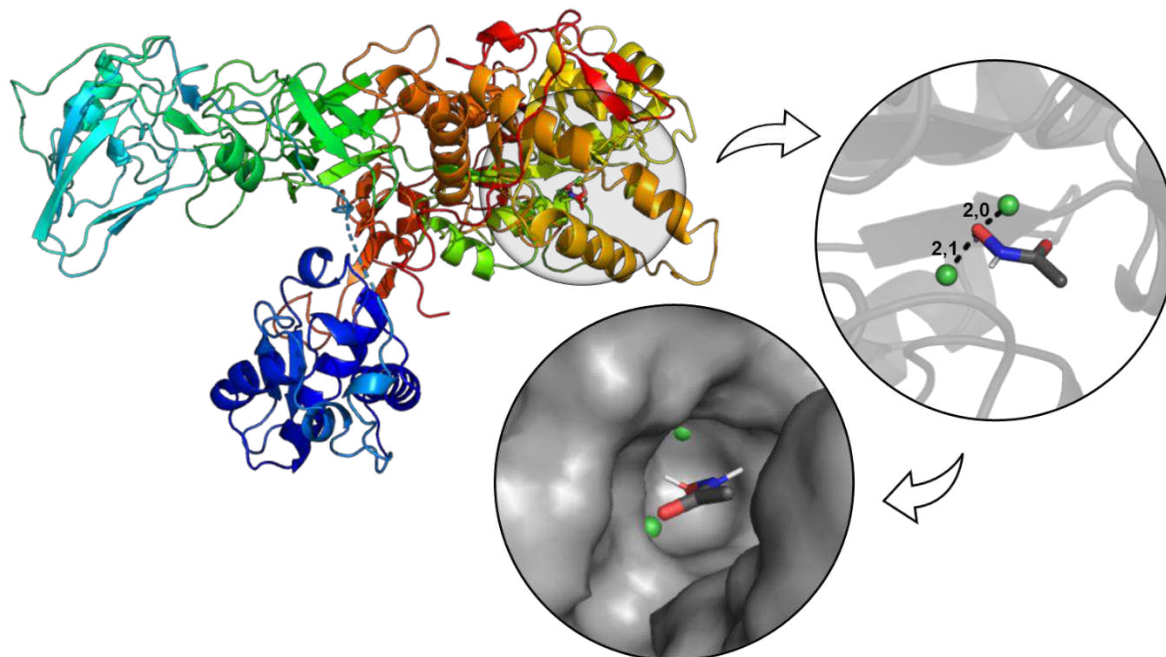
consideradas adequadas, capazes de prever a pose do HAE, uma vez que possuem RMSD abaixo de 2 Å. Contudo, das 16 combinações analisadas, a função ASP forneceu a menor variação em relação ao dado experimental, seguido da função ChemScore, ChemPLP e GoldScore. Quanto ao número de interações, ASP e ChemScore foram as funções que apresentaram o maior número de interações totais, aproximadamente 5 a 8, bem como o maior número de interações por ligação de H e concordância de interação com os resíduos de aminoácido (resíduos de aminoácidos-chave) que também interagem com HAE no complexo obtido experimentalmente.

Assim sendo, de acordo com os resultados obtidos, a combinação 16, em que se considerou a protonação do N (NE2) para todas as histidinas, apresentou os melhores resultados para a redocagem do HAE, tanto em termos de RMSD (o menor apresentado para as possibilidades = 0,173 Å), quanto em termos de interações (6 totais, sendo 4 ligações de hidrogênio), conforme demonstrado na Tabela 2. Portanto, esta possibilidade foi escolhida para ser utilizada na triagem virtual dos compostos.

### 3.3.2 Triagem Virtual

O HAE (**50**) possui uma estrutura muito pequena, apresentando cerca de 4,7 Å de distância entre seus átomos mais afastados, o que facilita o acesso desta substância ao sítio ativo da enzima e aproximação com os íons Ni<sup>2+</sup> (Figura 37). Como foi possível observar, a cavidade do sítio ativo é muito pequena e apenas substâncias com um pequeno volume molecular irão, de fato, conseguir interagir com os íons responsáveis pela catalise enzimática. Contudo, as estruturas das 130 substâncias da quimioteca do LaSMMed, avaliadas em nosso trabalho, possuem tamanhos variados, com até aproximadamente 16 Å de distância entre seus átomos mais afastados. Assim, considerando essa diferença de tamanho entre o HAE e as substâncias da quimioteca do LaSMMed, buscou-se estruturas que já possuem atividade de inibição *in vitro* frente a CEU descritas na literatura, com o intuito de fazer a docagem molecular dessas substâncias e, então, avaliar a complementariedade molecular existente entre o alvo e as substâncias. Dessa forma, podemos identificar possíveis interações com resíduos-chave, críticas para o reconhecimento molecular, buscando assim realizar uma validação complementar com ligantes da literatura.

**Figura 37** – Aproximação do HAE com os Ni<sup>2+</sup> do sítio ativo da CEU



**Fonte:** o próprio autor

*Legenda de cores e representação: Cartoon colorido e cinza: CEU. Ampliação 1: HAE (50). Ampliação 2: CEU em forma de superfície para representar o acesso do HAE ao sítio ativo da CEU. A cadeia carbônica do ligante é demonstrada na cor cinza e na forma bastão. Os íons de níquel estão no formato de bolas de cor verde. O restante dos átomos é demonstrado nas cores correspondentes aos elementos. Vermelho: oxigênio; Azul: nitrogênio; Branco: hidrogênio. Pontilhado preto: distância entre os íons e a hidroxila do HAE.*

Estudo anteriores já utilizaram este tipo de abordagem na busca por determinar resíduos-chave para a validação de protocolo de docagem molecular. Como exemplo, Jiang *et al.* (2013) selecionou substâncias com diferentes IC<sub>50</sub> descritos como inibidores da NADPH oxidase e analisou a interação destas substâncias com o alvo. Depois, verificou que as substâncias que interagem com uma lisina específica também apresentaram um maior potencial de inibição da NADPH oxidase (JIANG *et al.*, 2013). Assim, os pesquisadores determinaram que, provavelmente, as substâncias de interesse que interagissem com este resíduo também apresentariam uma alta potência de inibição (JIANG *et al.*, 2013). Em geral, estudos com esta abordagem são aplicados quando se tem pouca informação a respeito do sítio ativo, mas em nosso caso, utilizamos esta abordagem como complemento à validação por redocagem.

Assim sendo, um total de 500 substâncias foram selecionadas na literatura e divididas em 4 grupos, de acordo com suas faixas de potência, expressas em valores de IC<sub>50</sub>, conforme demonstrado na Tabela 3 (Apêndice D). O composto

padrão, utilizado como referência nos ensaios *in vitro*, a tioureia, possui uma faixa de inibição descrita na literatura de aproximadamente 20  $\mu\text{M}$  a 25  $\mu\text{M}$ , que corresponde a faixa de inibição intermediária (Faixa 3).

**Tabela 3** – Faixa de inibição ( $\text{IC}_{50}$ ) das estruturas pesquisadas na literatura

Classificação	Faixa ( $\text{IC}_{50}$ )	Nº Substâncias
1	< 0,1 $\mu\text{M}$	150
2	0,1 $\mu\text{M} \leq \text{IC}_{50} \leq 10 \mu\text{M}$	150
3	10 $\mu\text{M} \leq \text{IC}_{50} \leq 50 \mu\text{M}$	150
4	> 50 $\mu\text{M}$	50

Fonte: o próprio autor

Por meio de ferramentas quimiométricas como a Análise por Componentes Principais (PCA), avaliou-se uma possível correlação linear entre o  $\text{IC}_{50}$  e a pontuação obtida na docagem, porém os dados não demonstraram correlação (dados não mostrados). Dessa forma, buscou-se analisar, individualmente, as interações dos compostos com os resíduos do sítio ativo, de modo a selecionar resíduos-chave para a realização da triagem virtual do nosso espaço químico.

Para isso, foi feito o cálculo da porcentagem de substâncias que interagem com os resíduos de aminoácidos, conforme a Equação 1, apresentada no tópico 4.5.3.1 (p. 140), para avaliar quais são os principais aminoácidos em cada faixa de inibição. Na primeira faixa de inibição (substâncias mais potentes), a H407 interagiu com 5 das substâncias apresentadas na literatura como inibidor de urease. Ao todo, considerando os enantiômeros das 150 substâncias selecionadas, avaliou-se a interação de 185 moléculas nesta faixa de inibição. Portanto,  $(5/185) \cdot 100$  corresponde a 2,70%. Assim, na faixa 1, a H407 apresentou interação com 2,70% das substâncias. As demais porcentagens de interação estão listadas na Tabela 4.

**Tabela 4** – Porcentagem de interação (%) das moléculas relatadas na literatura, com os resíduos de aminoácido presentes na região do sítio ativo da CEU (4H9M)

Resíduos	Interação (%)			
	Muito Potente	Potente	Intermediária	Pouco Potente
H407	2,70	16,11	10,23	8,82
H409	7,03	22,78	19,07	13,24
<b>I411</b>	<b>13,51</b>	<b>4,44</b>	<b>2,33</b>	<b>1,47</b>
C412	2,16	4,44	0,47	0,00
<b>P434</b>	<b>5,41</b>	<b>2,22</b>	<b>0,47</b>	<b>0,00</b>
A435	0,00	0,00	0,00	1,47
A436	8,11	7,78	7,91	7,35
G437	0,54	0,56	0,47	0,00
R439	70,27	46,11	50,70	77,94
A440	73,51	74,44	66,05	60,29
T441	0,54	0,00	0,47	1,47
K490	1,08	0,00	13,49	5,88
H492	33,51	21,67	31,16	27,94
E493	4,86	37,78	10,70	4,41
D494	41,08	62,78	64,65	41,18
W495	3,24	3,33	8,84	4,41
H519	34,59	43,33	37,67	20,59
L523	12,43	23,33	24,65	13,24
H545	2,16	6,11	6,51	8,82
A549	0,00	0,56	0,00	0,00
G550	20,54	34,44	19,53	19,12
G551	0,00	2,78	0,00	0,00
P573	0,00	1,11	0,93	0,00
M588	8,11	11,67	10,70	11,76
L589	0,54	0,00	0,00	0,00
V591	1,08	1,67	1,86	0,00
C592	50,27	41,11	42,33	39,71
H593	78,38	83,89	84,65	76,47
<b>H594</b>	<b>9,73</b>	<b>13,33</b>	<b>14,88</b>	<b>7,35</b>
<b>L595</b>	<b>13,51</b>	<b>15,00</b>	<b>18,14</b>	<b>5,88</b>
<b>E601</b>	<b>1,08</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
<b>D602</b>	<b>0,54</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
F605	21,62	18,89	30,70	14,71
R609	37,84	52,78	62,79	48,53
D633	16,22	32,22	19,53	13,24
Q635	15,68	7,22	9,77	14,71
A636	68,11	65,56	80,47	80,88
M637	30,81	27,78	46,51	39,71
G638	0,54	0,56	1,40	0,00
R639	0,54	4,44	4,19	8,82
Ni901	10,81	29,44	26,98	7,35
Ni902	11,35	22,78	24,19	14,71
<b>Total Moléculas</b>	<b>185</b>	<b>180</b>	<b>215</b>	<b>68</b>

Fonte: o próprio autor

*Legenda de cores: Em destaque, os resíduos considerados chave para a atividade enzimática.*

Observou-se que alguns resíduos, como I411, P434, G437, A440, H519, L589, C592, H593, H594, L595, E601, D602, G638 e Ni901, apresentaram redução na porcentagem de interação, conforme houve a diminuição da potência das substâncias. Contudo, destes resíduos, destacam-se seis, pois apresentaram diferença apreciável entre a porcentagem de interação entre as Faixas 1 e 4, o que fica evidente para os resíduos I411, P434, H594 e L595; E601 e D602 (destacados na Tabela 4), visto que apresentaram interações com as substâncias “muito potentes” (Faixa 1) e nenhuma interação com as substâncias “pouco potentes” (Faixa 4).

Assim sendo, esses resíduos foram utilizados como marcadores para a triagem virtual da quimioteca do LaSMMed, de modo que as substâncias que interagem com um ou mais desses resíduos, poderiam ser promissoras como inibidores de urease.

O processo de docagem molecular das substâncias da quimioteca do LaSMMed seguiu o protocolo descrito para as moléculas da literatura. Como resultado, a análise das interações em termos de porcentagem está demonstrada abaixo (Tabela 5), enquanto que a análise das interações de todas as moléculas está demonstrada, em forma de quadro (vide Apêndice E).

Dentre as 130 substâncias da quimioteca do LaSMMed, doze substâncias foram selecionadas para a realização de ensaios de inibição *in vitro* frente a urease de *Canavalia ensiformis*. Esta seleção se deve a interação destas substâncias com os resíduos destacados anteriormente, mais precisamente I411, H594 e L595. Nenhuma substância da quimioteca do LaSMMed apresentou interações com os resíduos de P434, E601 e D602, por isso estes não aparecem destacados na Tabela 5. As substâncias selecionadas pertencem a diferentes classes, tais como: uma cumariltioureia (**LaSMMed 13**), duas cumarilamidas (**LaSMMed 16 e 22**), cinco indóis (**LaSMMed 30, 33, 34, 35 e 37**), uma tiazolidinona (**LaSMMed 49**), um derivado da apocinina (**LaSMMed 69**) e duas cromonamidas (**LaSMMed 72 e 73**). Os compostos selecionados são demonstrados no Quadro 1, bem como suas respectivas interações com os resíduos de aminoácidos no Quadro 2 e Quadro 3.

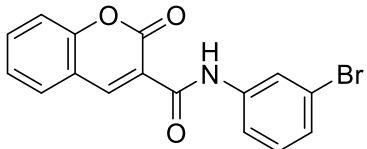
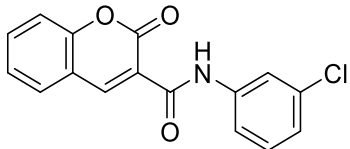
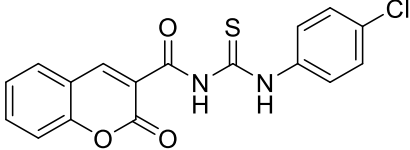
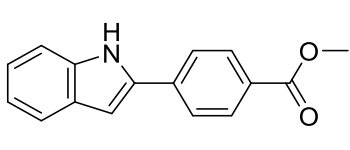
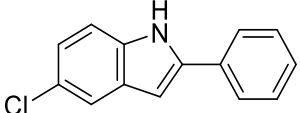
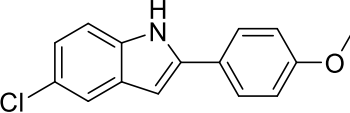
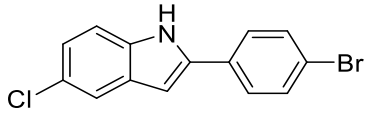
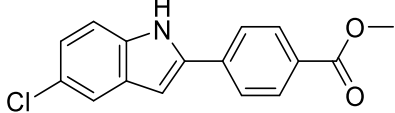
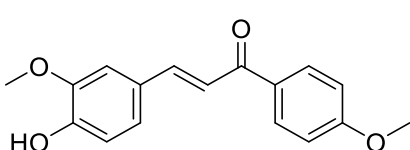
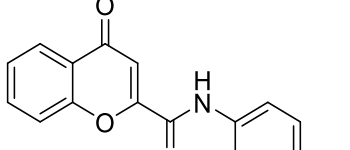
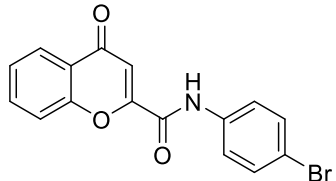
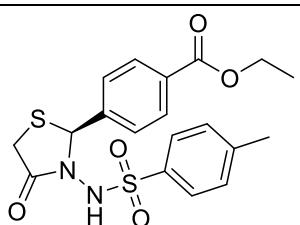
**Tabela 5** – Porcentagem de interação das substâncias da quimioteca do LaSMMed com os resíduos de aminoácido da CEU

<b>Resíduos</b>	<b>Nº Int. com o Resíduo</b>	<b>%</b>
H407	21,00	16,15
H409	20,00	15,38
I411	2,00	1,54
A436	1,00	0,77
R439	32,00	24,62
A440	95,00	73,08
K490	19,00	14,62
H492	77,00	59,23
E493	9,00	6,92
D494	58,00	44,62
W495	1,00	0,77
H519	76,00	58,46
L523	9,00	6,92
H545	5,00	3,85
G550	44,00	33,85
M588	1,00	0,77
C592	26,00	20,00
H593	91,00	70,00
H594	9,00	6,92
L595	1,00	0,77
F605	9,00	6,92
R609	88,00	67,69
D633	31,00	23,85
A636	77,00	59,23
M637	25,00	19,23
Ni901	52,00	40,00
Ni902	41,00	31,54
<b>Total Moléculas</b>	<b>130,00</b>	<b>-</b>

**Fonte:** o próprio autor

*Legenda de cores: Em destaque, os resíduos considerados chave para a atividade enzimática*

**Quadro 1** – Estruturas das substâncias da quimioteca do LaSMMed selecionadas por meio da triagem virtual devido a interação com os resíduos de aminoácido chave

Aminoácido chave	Substâncias	
I411	 <p data-bbox="683 539 845 573">LaSMMed 16</p>	 <p data-bbox="1123 539 1286 573">LaSMMed 22</p>
	 <p data-bbox="683 763 845 797">LaSMMed 13</p>	 <p data-bbox="1123 741 1286 775">LaSMMed 30</p>
H594	 <p data-bbox="683 943 845 976">LaSMMed 33</p>	 <p data-bbox="1123 943 1286 976">LaSMMed 34</p>
	 <p data-bbox="683 1111 845 1144">LaSMMed 35</p>	 <p data-bbox="1123 1111 1286 1144">LaSMMed 37</p>
	 <p data-bbox="683 1346 845 1379">LaSMMed 69</p>	 <p data-bbox="1123 1368 1286 1402">LaSMMed 72</p>
	 <p data-bbox="683 1603 845 1637">LaSMMed 73</p>	
	 <p data-bbox="683 1883 845 1917">LaSMMed 49S</p>	

Fonte: o próprio autor

**Quadro 2** – Interação em cores das substâncias selecionadas (**LaSMMed 13, 16, 22, 30, 33 - 35**) com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da CEU

	LaSMMed 13	LaSMMed 16	LaSMMed 22	LaSMMed 30	LaSMMed 33	LaSMMed 34	LaSMMed 35
<b>Score</b>	29,19	27,46	27,74	26,83	25,29	26,39	23,50
<b>H409</b>							
<b>I411</b>							
<b>R439</b>							
<b>A440</b>							
<b>H492</b>							
<b>D494</b>							
<b>H519</b>							
<b>C592</b>							
<b>H593</b>							
<b>H594</b>							
<b>R609</b>							
<b>D633</b>							
<b>A636</b>							
<b>M637</b>							
<b>Ni901</b>							

Fonte: o próprio autor

**Quadro 3** – Interação em cores das substâncias selecionadas (**LaSMMed 37, 49, 69, 72, 73**) com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da CEU

	LaSMMed 37	LaSMMed 49_R	LaSMMed 49_S	LaSMMed 69	LaSMMed 72	LaSMMed 73
<b>Score</b>	26,51	28,56	30,08	31,78	28,92	28,08
<b>H409</b>						
<b>A436</b>						
<b>A440</b>						
<b>K490</b>						
<b>H492</b>						
<b>D494</b>						
<b>W495</b>						
<b>H519</b>						
<b>G550</b>						
<b>C592</b>						
<b>H593</b>						
<b>H594</b>						
<b>L595</b>						
<b>F605</b>						
<b>R609</b>						
<b>D633</b>						
<b>A636</b>						
<b>M637</b>						
<b>Ni901</b>						

Fonte: o próprio autor

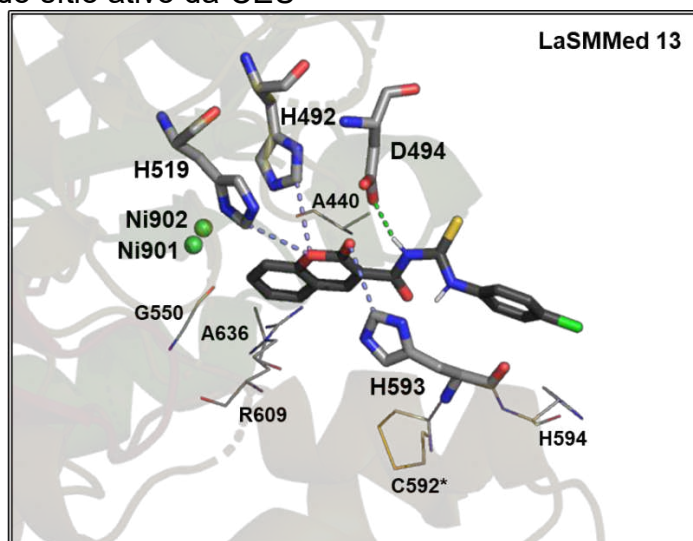
Legenda das cores de acordo com os tipos de interações:

	Interação de hidrogênio		Empilhamento $\pi$ -- $\pi$		$\pi$ – ânion
	Hidrogênio não-convencional		Empilhamento $\pi$ - $\pi$ em T		$\pi$ – cátion
	Carga atrativa (O-+N)		$\pi$ – alquila		Enxofre – X (O,N,S)
	Metal – acceptor		Alquila		Interação de halogênio
	Interação $\pi$ - hidrogênio		$\pi$ – Enxofre		$\pi$ – $\sigma$

A cumariltioureia (**LaSMMed 13**) é uma substância composta pelas subunidades cumarina e tioureia, as quais realizaram importantes interações com o sítio ativo da enzima. Especificamente, as interações de hidrogênio ocorreram, entre

o NH da subunidade da tioureia com o oxigênio do carboxilato do D494, a uma distância de 2,7 Å, enquanto que as interações por ligação de hidrogênio não-convencional, ocorreram entre os átomos de oxigênio presentes no anel cumarínico com os CH das histidinas H492, H519 e H593, a distâncias de 3,5, 3,4 e 3,5 Å, respectivamente (Figura 38). As interações cátion- $\pi$  ocorreram entre o anel cumarínico do **LaSMMed 13** com a subunidade guanidina da R609 e entre o NH da tioureia com anel imidazólico da H593. Paralelamente, a interação do tipo ânion- $\pi$  acontece entre o anel cumarínico e o D494, que se torna doador de densidade eletrônica negativa ao sistema  $\pi$  do anel piranona. Além disso, interações hidrofóbicas do tipo  $\pi$ -alquila entre a cumarina com os resíduos de A440 e A636, assim como entre o átomo de cloro do **LaSMMed 13** com a H594 também podem ser observadas (Figura 38).

**Figura 38** – Representação gráfica das interações da cumariltioureia (**LaSMMed 13**) com os resíduos do sítio ativo da CEU



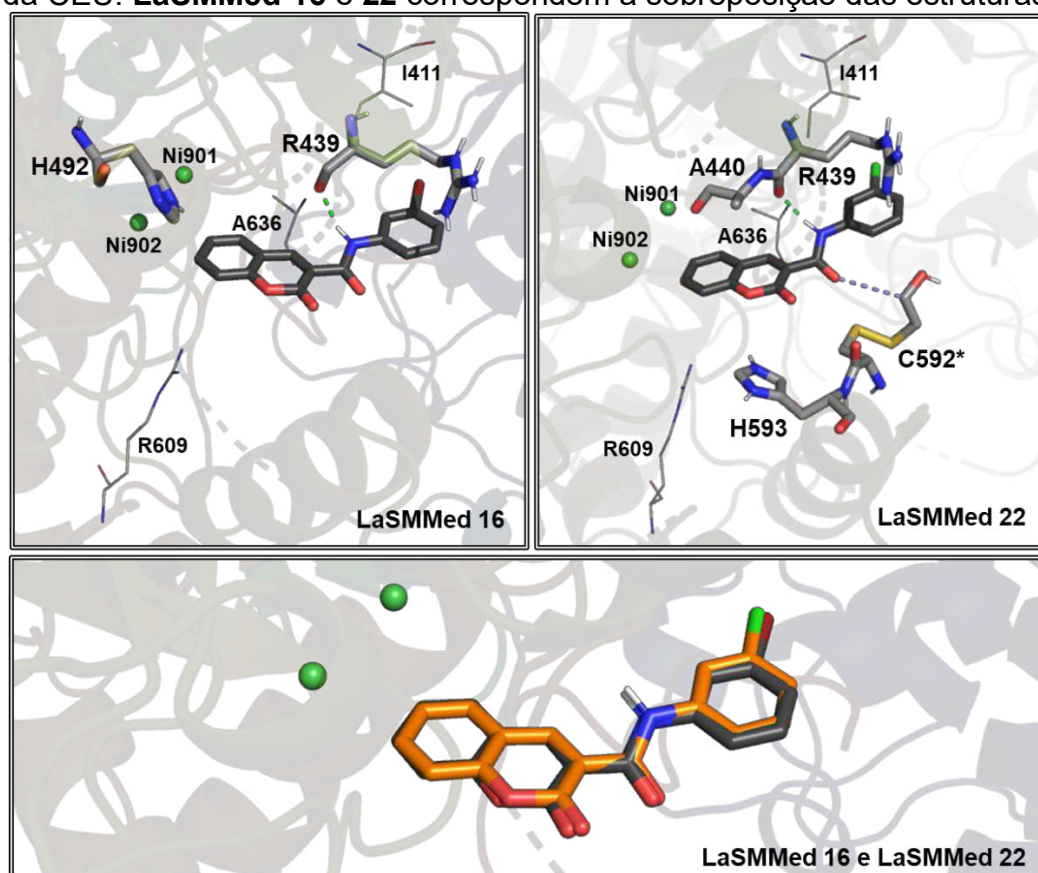
**Fonte:** o próprio autor

*Legenda de cores e representação: A cadeia carbônica dos aminoácidos é demonstrada na cor cinza e na forma de linha e bastão. A cadeia carbônica do ligante na cor preta e na forma palito. Os íons de níquel estão no formato de bolas de cor verde. O restante dos átomos é demonstrado nas cores correspondentes aos elementos. Vermelho: oxigênio; Azul: nitrogênio; Amarelo: enxofre; Branco: hidrogênio. As interações por ligação de hidrogênio convencionais são demonstradas como pontos verdes e não-convencionais como pontos azuis.*

As cumarilamidas selecionadas (**LaSMMed 16** e **22**) possuem como diferença estrutural apenas o halogênio presente na posição 3 do anel benzênico, sendo estes Br ou Cl, respectivamente. Assim sendo, observou-se grande semelhança nas poses obtidas, como demonstrado na sobreposição dos ligantes na

Figura 39, que reflete nos mesmos tipos e resíduos envolvidos nas interações. Tanto o **LaSMMed 16**, quanto o **LaSMMed 22**, fazem interação por ligação de hidrogênio entre o HN da função amida do ligante com a carbonila da R439 a uma distância de 2,1 Å e 1,9 Å, respectivamente. Ambos, também fazem interação do tipo  $\pi$ -cátion entre o anel cumarínico e a guanidina da R609. Contudo, observou-se que o **LaSMMed 22** se aproxima mais da C592\* (cisteína modificada), H593 e A440 fazendo interações do tipo ligação de hidrogênio não convencional (O--HC) entre a carbonila da amida do **LaSMMed 22** e o CH da C592\*; empilhamento  $\pi$  e  $\pi$ -alquila, respectivamente, com H593 e A440 entre o anel cumarínico do **LaSMMed 22** e o imidazol, para a histidina, e com a cadeia carbônica da A440; enquanto o **LaSMMed 16**, diferentemente do **LaSMMed 22**, realiza uma interação do tipo  $\pi$ -aceptor de hidrogênio entre o anel cumarínico (doador da densidade eletrônica) e o HN da H492, doador de hidrogênio (aceptor da densidade eletrônica)(Figura 39).

**Figura 39** – Interações das cumarilamidas **LaSMMed 16** e **22** com os resíduos do sítio ativo da CEU. **LaSMMed 16** e **22** correspondem a sobreposição das estruturas



**Fonte:** o próprio autor

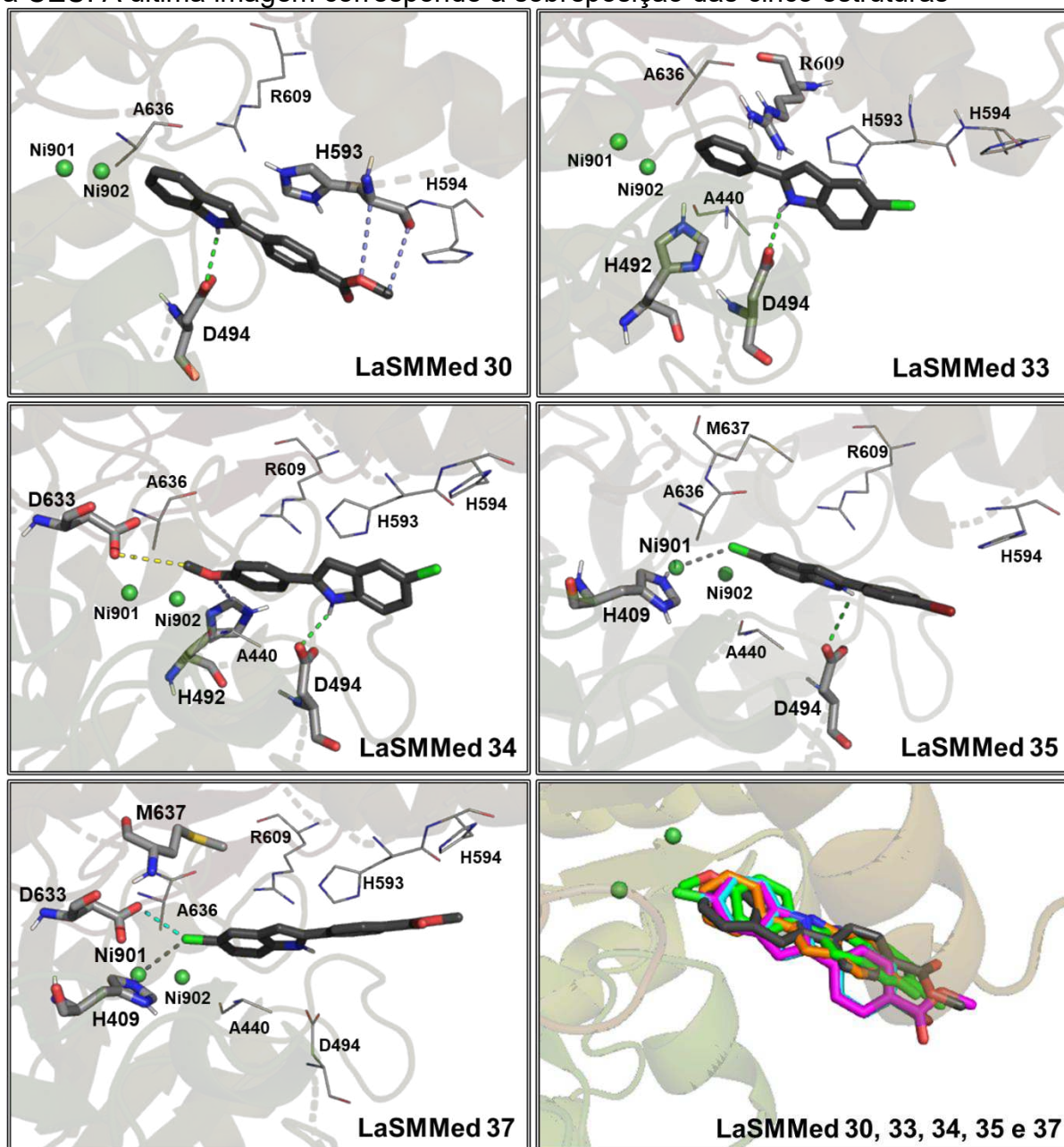
**Legenda de cores e representação:** A cadeia carbônica dos aminoácidos é demonstrada na cor cinza e na forma de linha e bastão. A cadeia carbônica dos ligantes na cor preta e na forma bastão. Na

sobreposição, **LaSMMed 22** está representado em laranja. Os íons de níquel estão no formato de bolas de cor verde. O restante dos átomos é demonstrado nas cores correspondentes aos elementos. Vermelho: oxigênio; Azul: nitrogênio; Amarelo: enxofre; Branco: hidrogênio. As interações por ligação de hidrogênio convencional são demonstradas como pontos verdes e não-convencionais como pontos azuis.

Os derivados indólicos selecionados (**LaSMMed 30, 33, 34, 35 e 37**) também adotaram poses semelhantes e, com isso, interações comuns com os aminoácidos do bolsão catalítico. Entre as interações em comum, destaca-se a interação por ligação de hidrogênio entre o NH do indol e o carboxilato do D494 para quase todas as substâncias, com exceção do **LaSMMed 37**, que está mais distante do resíduo; interação eletrostática  $\pi$ --cátion, entre a subunidade indólica das substâncias com a R609 e interação hidrofóbica do tipo  $\pi$ --alquila com a H594 (Figura 40).

Os derivados indólicos **LaSMMed 30, 35 e 37** apresentaram as poses mais similares, contudo, pela sobreposição das substâncias, podemos observar que **LaSMMed 35 e 37** estão melhor sobrepostos entre si do que com o **LaSMMed 30** (Figura 40). **LaSMMed 30** difere-se do **LaSMMed 37** devido a presença do cloro no anel indólico da substância **37**, enquanto que o **LaSMMed 35** é *para* substituído com um átomo de Br no lugar éster metílico no anel benzênico. Apesar da maior similaridade entre **LaSMMed 30 e LaSMMed 37**, o cloro presente na última estrutura favorece a interação do tipo metal-acceptor com o Ni901 e a interação  $\pi$ --alquila entre o cloro com o imidazol da H409, direcionando a obtenção de uma pose mais similar à estrutura do **LaSMMed 35** do que do **LaSMMed 30**. Além disso, a subunidade indólica das substâncias **LaSMMed 35 e LaSMMed 37** fazem interação eletrostática do tipo  $\pi$ --ânion com o carboxilato da D494 e interações hidrofóbicas com A440, M637 e A636. Além destas, o cloro do **LaSMMed 37** consegue realizar uma interação por ligação de halogênio do tipo CX--ânion, onde X corresponde ao halogênio, com o íon carboxilato do D633. Por sua vez, a ausência do cloro no **LaSMMed 30** permite que a substância adote uma pose que favorece a interação de hidrogênio não convencional entre o oxigênio do éster metílico com o metino ( $\text{CH}\alpha$ ) da H593 (3,8 Å de distância) e entre a carbonila da H593 com a metila do ligante, a uma distância de 3,6 Å; além de manter a interação de hidrogênio convencional entre o NH do indol com o carboxilato do D494 a uma distância de 2,7 Å

**Figura 40** – Interações dos derivados indólicos (**LaSMMed 30**, **33**, **34**, **35** e **37**) com a CEU. A última imagem corresponde a sobreposição das cinco estruturas



**Fonte:** o próprio autor

**Legenda de cores e representação:** A cadeia carbônica dos aminoácidos é demonstrada na cor cinza e na forma de linha e bastão. A cadeia carbônica dos ligantes na cor preta e na forma bastão. Os íons de níquel estão no formato de bolas de cor verde. O restante dos átomos é demonstrado nas cores correspondentes aos elementos. Vermelho: oxigênio; Azul: nitrogênio; Amarelo: enxofre; Branco: hidrogênio. As interações por ligação de hidrogênio convencional são demonstradas como pontos verdes; não-convencionais como pontos azuis, metálica em cinza e halogênio em ciano. Na sobreposição: Cinza: **LaSMMed 30**; Laranja: **LaSMMed 33**; Verde: **LaSMMed 34**; Ciano: **LaSMMed 35** e em Magenta: **LaSMMed 37**

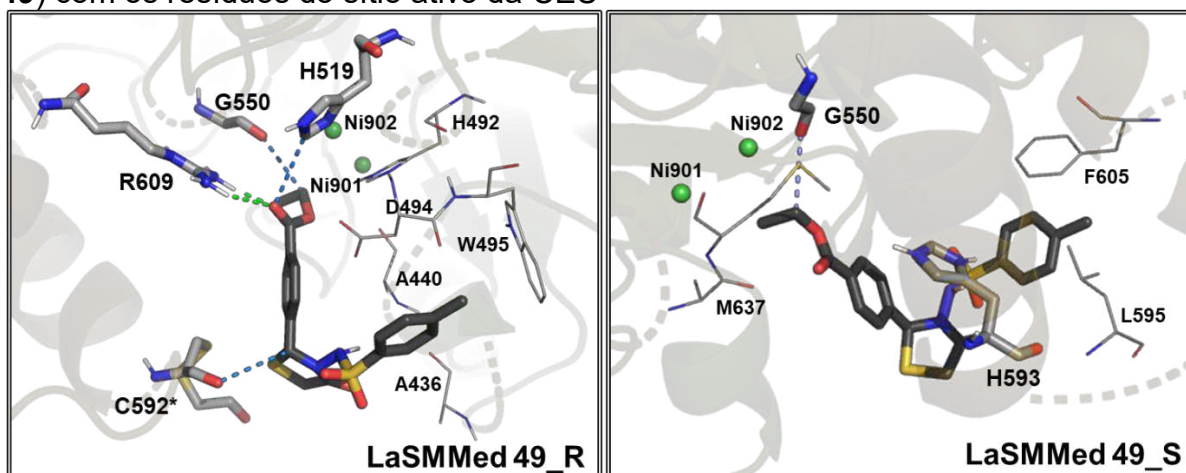
**LaSMMed 33** e **34** se posicionaram de modo que a fenila se aproximou mais da cavidade central do sítio ativo, enquanto que o indol ficou na

extremidade da proteína. Entre as interações mais importantes realizadas pelas substâncias, além da interação de hidrogênio entre o NH do indol dos ligantes com o íon carboxilato do D494, a distâncias de 2,4 e 2,3 Å, respectivamente; se destacam as ligações de hidrogênio não convencionais existentes entre os orbitais  $\pi$  da fenila do **LaSMMed 33** com o NH da H492 e as interações entre o oxigênio da metoxila do **LaSMMed 34** com o CH da H492, a uma distância de 3,4 Å e também a interação da metila com o carboxilato do D633, a uma distância de 3,7 Å (Figura 40). Além disso, ambos os compostos fazem empilhamento  $\pi$  entre os anéis do indol e o imidazol da H593.

A substância **LaSMMed 49** foi a única tiazolidinona selecionada na triagem virtual. Contudo, a substância disponível em nossa quimioteca é a mistura racêmica das configurações R e S. Assim, ambas as poses dos enantiômeros foram analisadas. O enantiômero S se destaca pelas importantes interações com a H593. A pose adotada pelo **LaSMMed 49\_S** favorece a interação do tipo dipolo-dipolo entre a nuvem eletrônica dos anéis aromáticos da substância com o anel imidazólico da H593, onde observamos um empilhamento  $\pi$  e um empilhamento T com o anel benzênico da subunidade sulfonil-hidrazona da estrutura. Além disso, o empilhamento T permite a interação dos elétrons  $\pi$  da substância com o hidrogênio que possui carga parcial positiva da H593 (NH). Ademais, observa-se interações hidrofóbicas com a L595, F605 e M637 e interação de hidrogênio não convencional do tipo CH--O entre o metileno do éster etil da tiazolidinona com a carbonila da G550, a uma distância de 3,4 Å (Figura 41). O enantiômero R apresentou uma pose diferente da observada para o enantiômero S. Em **LaSMMed 49\_R** não ocorre interações hidrofóbicas com a H593. Para esta pose, as interações mais fortes ocorrem entre a subunidade éster etila com os resíduos de H519, G550 e R609. A carbonila desta subunidade faz interação de hidrogênio convencional com os NH guanidínicos da R609, a distâncias de 2,1 e 2,8 Å, e interação não convencional com o CH da H519 (3,6 Å de distância). Ainda, uma ligação de H não convencional entre o metileno do éster do **LaSMMed 49\_R** com a carbonila da G550, a uma distância de 3,3 Å, também pode ser observada. Outra ligação de hidrogênio não convencional ocorreu entre a carbonila da C592 com o CH do anel da tiazolidinona (3,5 Å de distância). Uma interação eletrostática do tipo  $\pi$ --ânion entre os elétrons  $\pi$  da fenila com o íon carboxilato do D494 também foi observado para a enantiômero R. Por fim, as demais interações que ocorrem com os

aminoácidos destacados na Figura 41, W495, H492, A440 e A436 são do tipo  $\pi$ -alquila.

**Figura 41** – Representação gráfica da interação do derivado tiazolidinona (**LaSMMed 49**) com os resíduos do sítio ativo da CEU

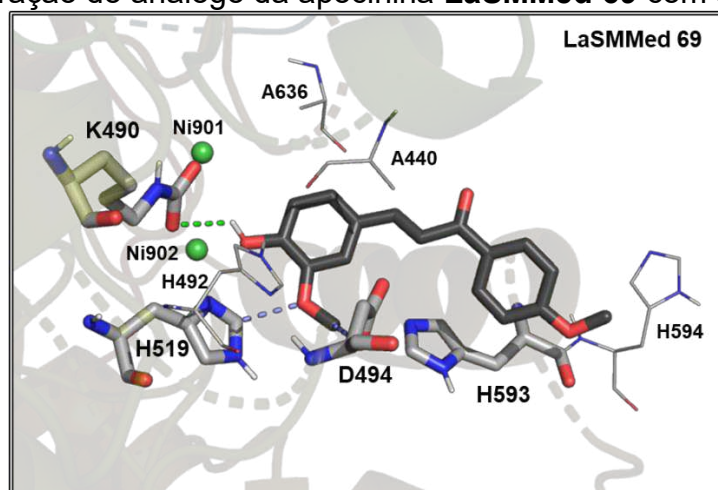


**Fonte:** o próprio autor

*Legenda de cores e representação: A cadeia carbônica dos aminoácidos é demonstrada na cor cinza e na forma de linha e bastão. A cadeia carbônica dos ligantes na cor preta e na forma bastão. Os íons de níquel estão no formato de bolas de cor verde. O restante dos átomos é demonstrado nas cores correspondentes aos elementos. Vermelho: oxigênio; Azul: nitrogênio; Amarelo: enxofre; Branco: hidrogênio. As interações por ligação de hidrogênio convencional são demonstradas como pontos verdes e não-convencionais como pontos azuis.*

O análogo da apocinina, **LaSMMed 69**, foi selecionado na triagem virtual por fazer uma interação do tipo  $\pi$ -alquila, entre a metila da metoxifenila com o imidazol da H594. Além dessa importante interação, a hidroxila do análogo faz interação por ligação de hidrogênio, a uma distância de 3,0 Å, com o carboxilato da lisina carboxilada (K490), um aminoácido envolvido na catálise enzimática da urease. Interações por ligação de hidrogênio não convencional também podem ser observadas entre o oxigênio da metoxila do fenol do **LaSMMed 69** com o CH do imidazol da H519, a uma distância de 2,6 Å; e a interação da metila, da mesma subunidade do ligante, com o íon carboxilato da D494 a uma distância de 3,7 Å entre os átomos (Figura 42). Podemos observar ainda a proximidade do metoxifenol com os íons  $\text{Ni}^{2+}$ , contudo a interação do ligante nesta pose com o Ni902 não é possível devido ao impedimento estérico. Ademais, o análogo faz interações hidrofóbicas do tipo  $\pi$ -alquila com a A440, A636 e H492 e uma interação por empilhamento  $\pi$  em T entre a metoxifenila e o imidazol da H593.

**Figura 42** – Interação do análogo da apocinina **LaSMMed 69** com a CEU



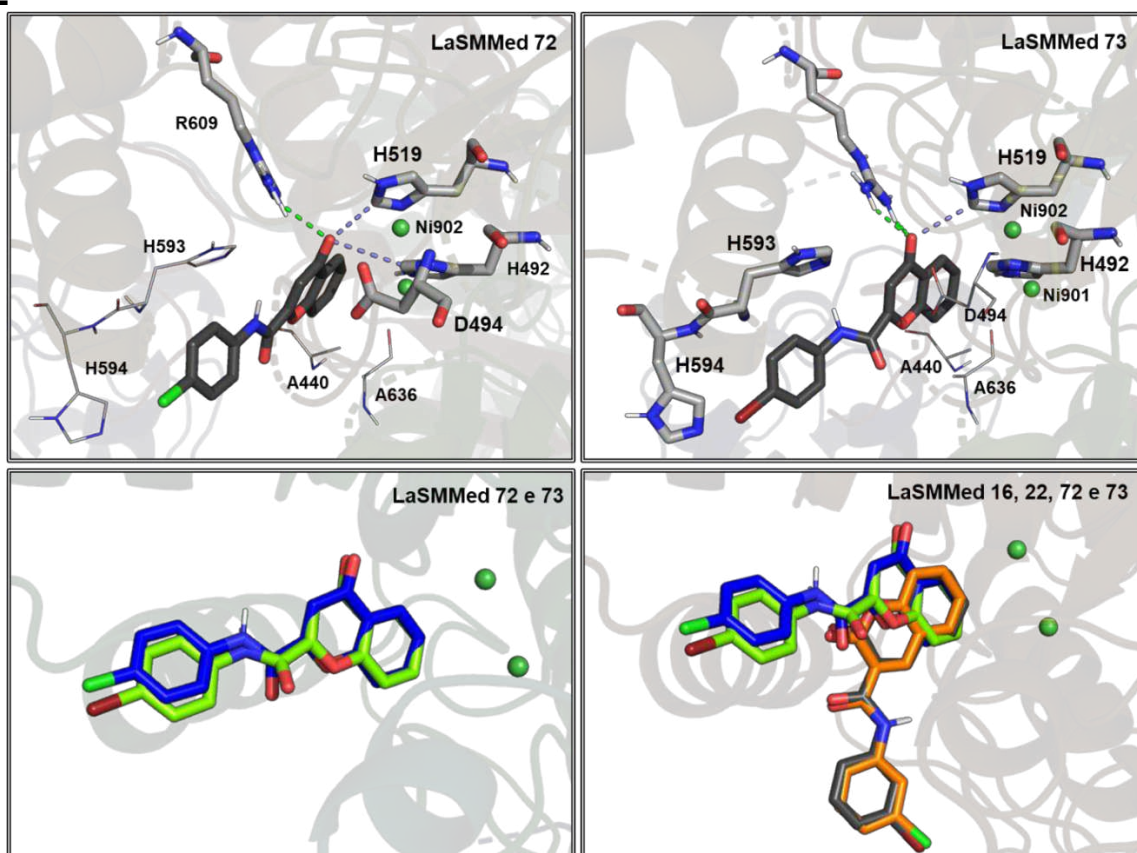
**Fonte:** o próprio autor

*Legenda de cores e representação: A cadeia carbônica dos aminoácidos é demonstrada na cor cinza e na forma de linha e bastão. A cadeia carbônica do ligante na cor preta e na forma bastão. Os íons de níquel estão no formato de bolas de cor verde. O restante dos átomos é demonstrado nas cores correspondentes aos elementos. Vermelho: oxigênio; Azul: nitrogênio; Amarelo: enxofre; Branco: hidrogênio. As interações por ligação de hidrogênio convencional são demonstradas como pontos verdes e não-convencionais como pontos azuis.*

Os derivados da benzo- $\gamma$ -pirona, selecionados na triagem virtual (**LaSMMed 72** e **73**), fizeram as interações mais fortes, por ligação de hidrogênio, entre a carbonila do anel pirona com a guanidina do R609, a distâncias de 2,8 Å para **LaSMMed 72** e 2,3 e 2,9 Å para **LaSMMed 73**. Interações por ligação de hidrogênio não convencional também foram observadas entre a carbonila dos ligantes com a H519, a distância de 3,2 Å e 3,3 Å, respectivamente, para as substâncias; e o **LaSMMed 72** também adquire conformação adequada para realizar a interação com o CH imidazólico da H492 (3,5 Å de distância), conforme demonstrado na Figura 43. O **LaSMMed 73** não faz a interação de hidrogênio com a H492, mas adquire pose adequada para fazer empilhamento  $\pi$  em T com esta histidina e empilhamento  $\pi$  entre a bromofenila com o imidazol da H594. Além disso, essa subunidade também faz interação por empilhamento  $\pi$  em T com o imidazol da H593 e também é possível que ocorra uma interação por ligação de hidrogênio não convencional entre o NH do ligante com o imidazol do aminoácido. Interação eletrostática do tipo  $\pi$ -ânion entre a pirona dos ligantes com o íon carboxilato da D494 também é observada para ambos derivados da cromona. Ademais, os ligantes **LaSMMed 72** e **73** apresentam estrutura e pose muito similares entre si, como podemos observar na sobreposição das estruturas na Figura 43. Além disso, estruturalmente, as substâncias são muito similares as cumarinas discutidas anteriormente (**LaSMMed 16** e **22**). As quatro

substâncias são análogas de aril-benzopironas substituídos com Cl e Br, que foram as subunidades que interagiram com os resíduos chaves de interesse, a I411 para **LaSMMed 16** e **22**, enquanto que as cromonas **LaSMMed 72** e **73** interagem com a H594 por interação do tipo  $\pi$ -alquila, entre o imidazol do aminoácido com o halogênio dos ligantes. A sobreposição apresentada com os quatro ligantes (Figura 43) nos mostra que é energeticamente viável que as benzopironas se aproximem mais do centro do sítio ativo da urease, próximas aos íons  $\text{Ni}^{2+}$ , possivelmente devido as histidinas presentes no sítio ativo da enzima que podem gerar as interações tanto por ligação de hidrogênio quanto por empilhamento  $\pi$ . No mais, observamos que os derivados das cumarinas adquirem uma pose que favorece a interação por ligação de hidrogênio com o R439, enquanto que as cromonas favorecem a interação de H com R609 e os empilhamentos com as H593 e H594.

**Figura 43** – Representação gráfica das possíveis interações das cromonas **LaSMMed 72** e **73** com os resíduos do sítio ativo da CEU. **LaSMMed 72** e **73** correspondem a sobreposição das estruturas entre si e com os derivados cumarínicos **LaSMMed 16** e **22**



**Fonte:** o próprio autor

**Legenda de cores e representação:** A cadeia carbônica dos aminoácidos é demonstrada na cor cinza e na forma de linha e bastão. A cadeia carbônica dos ligantes na cor preta e na forma bastão. Nas

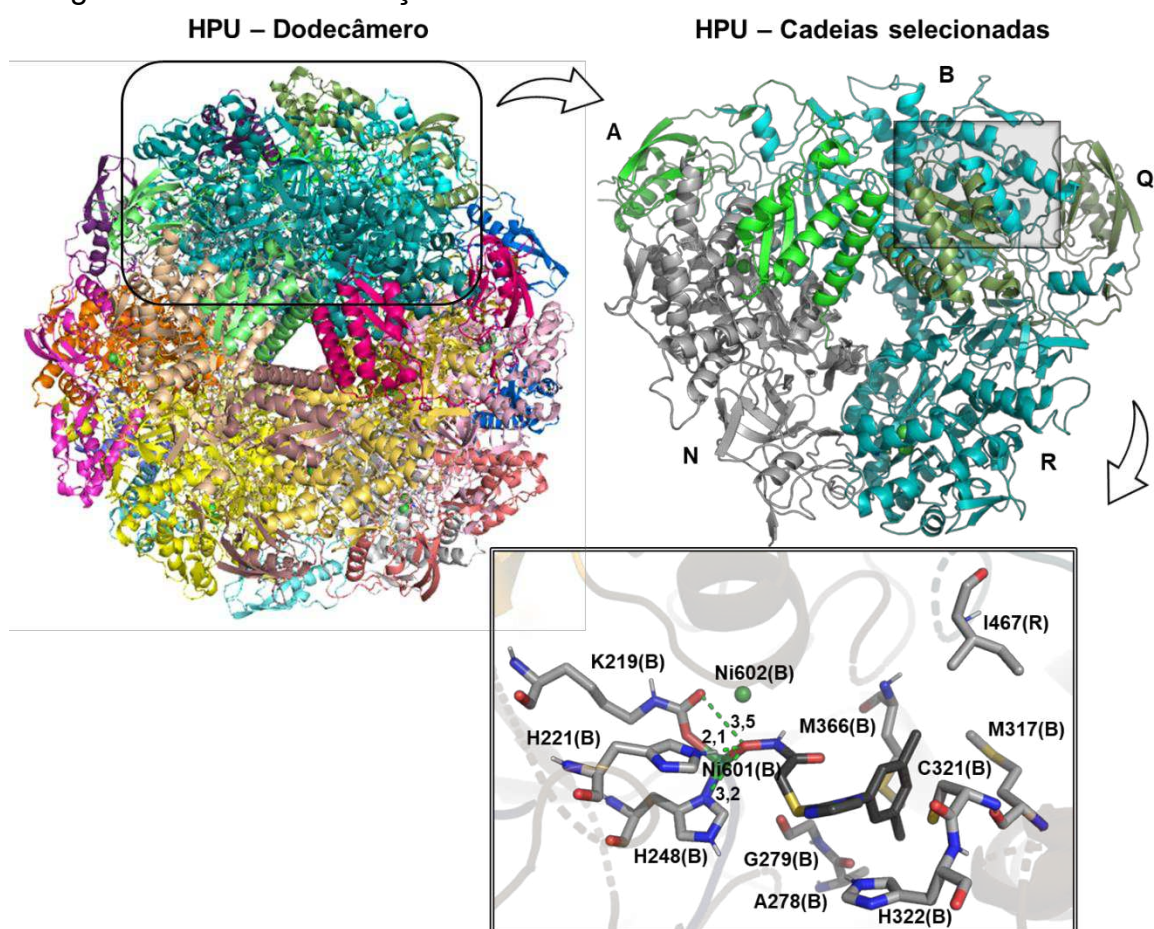
sobreposições: Azul: **LaSMMed 72**; Verde: **LaSMMed 73**; Preto: **LaSMMed 16** e Laranja: **LaSMMed 22**. Os íons de níquel estão no formato de bolas de cor verde. O restante dos átomos é demonstrado nas cores correspondentes aos elementos. Vermelho: oxigênio; Azul: nitrogênio; Amarelo: enxofre; Branco: hidrogênio. As interações por ligação de hidrogênio convencional são demonstradas como pontos verdes e não-convencionais como pontos azuis.

### 3.4 UREASE DE *HELICOBACTER PYLORI*

A estrutura tridimensional da urease de *Helicobacter pylori*, elucidada por crioscopia eletrônica, sob a forma de um dodecâmero esférico com resolução de 2,0 Å foi obtida no PDB (CUNHA *et al.*, 2021). Esta enzima é a de maior resolução entre as ureases de *H. pylori* disponíveis no banco de proteínas com um inibidor co-cristalizado em seu sítio ativo. O DJM (**51**) é um derivado do ácido acetoidroxâmico e apresenta atividade antiureolítica com IC<sub>50</sub> de 19,6 µM (CUNHA *et al.*, 2021). Co-cristalizado na cadeia B do dodecâmero, o inibidor está quelado a um dos íons Ni (601) e faz interações por ligação de hidrogênio com a K219, H221 e H248. Além disso, este inibidor faz interações hidrofóbicas com os resíduos de A278, G279, M317, C321, H322 e a I467 que está presente na cadeia R da HPU (Figura 44).

Com o intuito de diminuir a complexidade estrutural da urease de *H. pylori* para a realização dos cálculos de docagem molecular, com custo computacional reduzido, selecionou-se apenas parte de um trímero desta estrutura dodecamérica, onde encontram-se os dados de interação do DJM (cadeia B), e cadeias peptídicas próxima ao sítio ativo. Assim sendo, cinco cadeias foram selecionadas (A, B, N, Q e R) conforme demonstrado na Figura 44.

**Figura 44** – Simplificação estrutural da urease de *H. pylori* para os cálculos de docagem molecular e interação do DJM com o sítio ativo da HPU



**Fonte:** o próprio autor

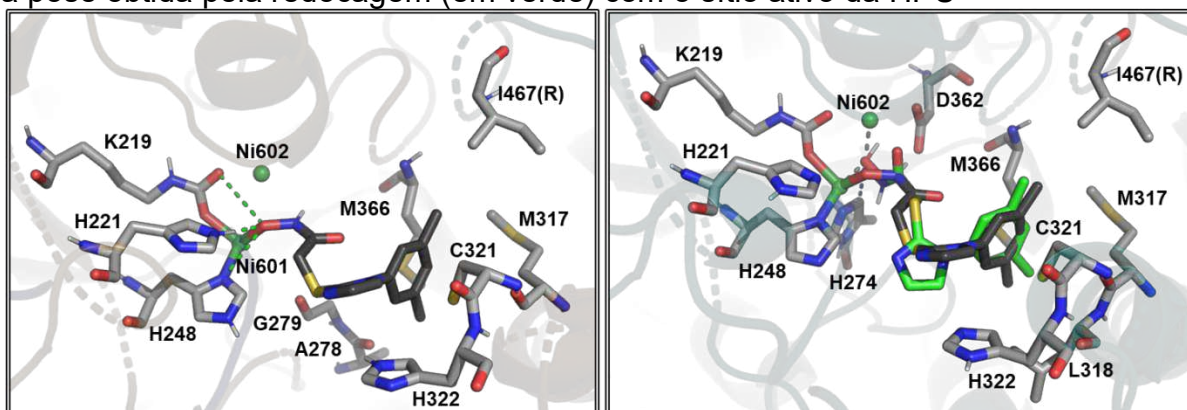
**Legenda de cores e representação:** Retângulo arredondado: cadeias selecionadas; Retângulo: sítio ativo, local do DJM. Na expansão do sítio ativo: A cadeia carbônica dos aminoácidos é demonstrada na cor cinza e na forma de bastão. A cadeia carbônica do ligante na cor preta e na forma bastão. Os íons de níquel estão no formato de bolas de cor verde. O restante dos átomos é demonstrado nas cores correspondentes aos elementos. Vermelho: oxigênio; Azul: nitrogênio; Amarelo: enxofre; Branco: hidrogênio. As interações por ligação de hidrogênio convencionais são demonstradas como pontos verdes

### 3.4.1 Validação da Docagem Molecular

A presença do inibidor DJM (**51**) ligado no sítio ativo, juntamente com a enzima nos permitem a utilização do protocolo de redocagem para validação da metodologia aplicada. Dessa forma, foi definido o ponto médio entre os íons de Ni601 e 602 e utilizou-se essas coordenadas como sendo o centro do raio da docagem no sítio ativo. Na sequência, foi realizada a docagem molecular do **51** nas quatro funções de pontuação disponíveis no GOLD, de modo que, a função que apresentasse o menor valor de RMSD em relação a pose do inibidor co-cristalizado seria a função

utilizada no restante dos cálculos. A função ASP foi a que apresentou o menor RMSD, com desvio de 1,003 Å em relação a referência (Figura 45 – em verde), portanto, considerando seu valor abaixo de 2 Å, a metodologia aplicada pode ser utilizada para os cálculos de docagem molecular das demais substâncias (WANG *et al.*, 2016).

**Figura 45** – Comparação entre as interações do DJM co-cristalizado (em preto) com a pose obtida pela redocagem (em verde) com o sítio ativo da HPU



**Fonte:** o próprio autor

*Legenda de cores e representação:* A cadeia carbônica dos aminoácidos é demonstrada na cor cinza e na forma de bastão. A cadeia carbônica do DJM co-cristalizado na cor preta e em verde para a pose obtida por redocagem, ambos na forma bastão. Os íons de níquel estão no formato de bolas de cor verde. O restante dos átomos é demonstrado nas cores correspondentes aos elementos. Vermelho: oxigênio; Azul: nitrogênio; Amarelo: enxofre; Branco: hidrogênio. As interações por ligação de hidrogênio convencional são demonstradas como pontos verdes, não-convencionais como pontos azuis e interação metálica em cinza.

Com relação as interações, poucas diferenças podem ser observadas. As principais são com relação as interações de hidrogênio entre a hidroxamida do **52** e os resíduos de aminoácido próximos. Para o DJM experimental, podemos observar que a hidroxila quela com o Ni601 e interage por ligação de hidrogênio convencional com as histidinas próximas, H221 e H248, e com o carboxilato da K219 a distâncias de 2,1, 3,2 e 3,5 Å, respectivamente. Já para o DJM calculado (em verde - Figura 45), a pose adotada pelo ligante permite que hidroxila fique entre os íons metálicos e com isso consiga interagir com ambos os Ni<sup>2+</sup>, a distâncias de 1,8 Å com Ni601 e 2,0 Å com Ni602. Além disso, a hidroxila faz interação de hidrogênio não-convencional com o CH da H274 enquanto que o NH, parcialmente positivo, faz interação eletrostática com o íon carboxilato do D362. Ademais, as interações hidrofóbicas são muito similares entre os ligantes com os resíduos do sítio ativo e a mudança mais significativa, neste aspecto, é o fato do ligante calculado interagir com a L318, mas perder as interações com A278 e G279.

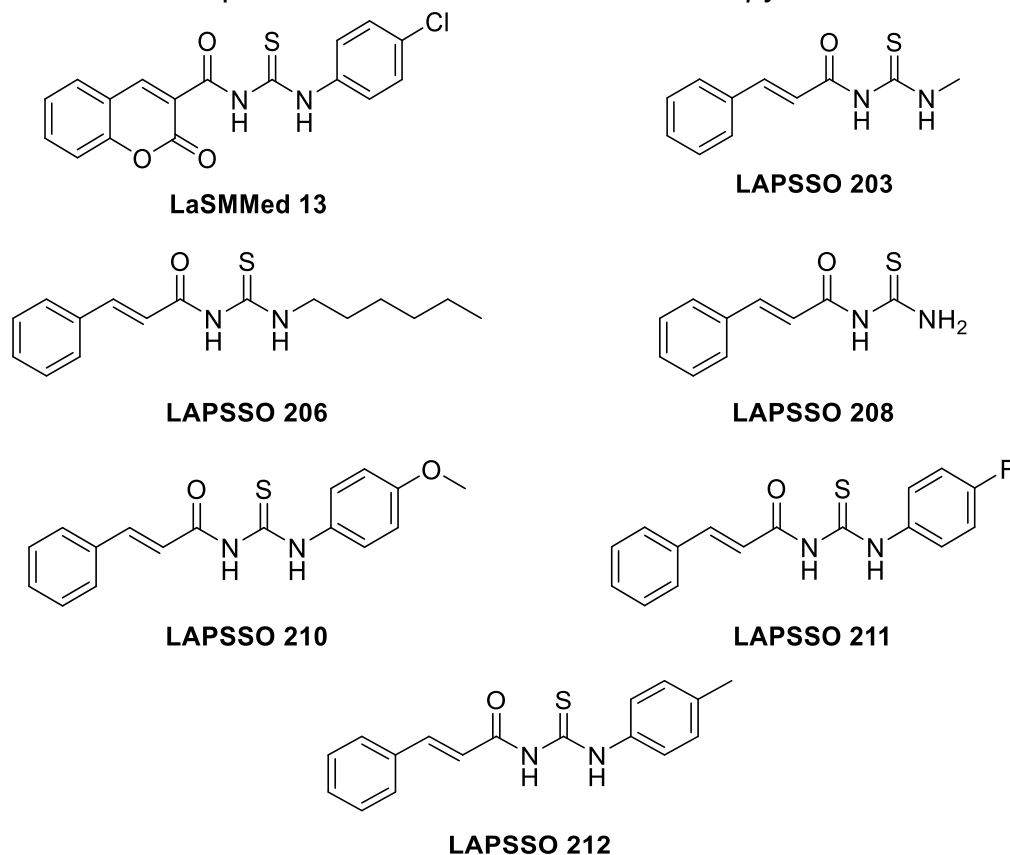
### 3.4.2 Triagem Virtual

Diferentemente do que vimos para a urease de *Canavalia ensiformis*, em que o ligante era muito pequeno em relação as estruturas do nosso estudo, o DJM é um inibidor com um volume molecular bem mais significativo que o HAE. Como reflexo disso, o critério de seleção das substâncias da quimioteca foi por meio das interações com os resíduos-chave, os mesmos que interagem com o DJM experimental, e os íons níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ).

Assim, após a análise das interações das 130 substâncias da quimioteca do LaSMMed, verificou-se quais seriam as substâncias que realizaram o maior número de interações com resíduos de aminoácido chave, especificamente K219, H221, H248, A278, G279, M317, C321, H322, M366, I467(R) e os íons Ni601 e Ni602. Desse modo, sete substâncias foram selecionadas da quimioteca do LaSMMed, sendo que todas estas fizeram de 9 a 10 interações com os 11 resíduos-chave supracitados. As substâncias selecionadas podem ser visualizadas na Figura 46, enquanto que as respectivas interações são mostradas no Quadro 4.

Todas as substâncias selecionadas têm em comum a subunidade tioureia presente em sua estrutura, contudo o **LaSMMed 13** é uma cumariltioureia, ou seja, além da tioureia, também se tem a presença da subunidade estrutural cumarina em sua estrutura. As demais substâncias selecionadas são derivadas do ácido trans-cinâmico e diferem-se estruturalmente pelos grupos inseridos na subunidade tioureia, sendo parte destes alifáticos, com variação do tamanho da cadeia (**LAPSSO 203, 206 e 208**), e parte dos compostos apresentam anéis benzênicos *para*-substituídos (**LAPSSO 210, 211 e 212**), contendo grupos doadores ou retiradores de densidade eletrônica.

**Figura 46** – Substâncias da quimioteca do LaSMMed selecionadas no processo de triagem virtual como possíveis inibidores da urease de *H. pylori*



**Fonte:** o próprio autor

De modo geral, pode-se observar que todas as substâncias selecionadas interagiram com os ambos os íons Ni<sup>2+</sup> e fizeram importantes interações de hidrogênio, com a K221, lisina modificada importante para a atividade enzimática, bem como com as H221 e H248, que se encontram próximas ao centro do sítio ativo. Além disso, foi observado que todos os compostos interagiram com alguns resíduos de aminoácidos que o DJM (**51**) não havia interagido, tais quais H136, H138, A169, H247, L318 e D362, enquanto que o inibidor co-cristalizado interagiu com o resíduo de I467(R), pertencente a cadeia R, e as substâncias da selecionadas da quimioteca do LaSMMed não fizeram esta interação.

**Quadro 4** – Interações observadas entre as substâncias selecionadas com a HPU

	DJM	LaSMMed 13	LAPSSO 203	LAPSSO 206	LAPSSO 208	LAPSSO 210	LAPSSO 211	LAPSSO 212
<b>Score</b>	38,89	37,86	32,05	39,61	28,10	39,69	37,37	37,07
<b>H136</b>								
<b>H138</b>								
<b>A169</b>								
<b>K219</b>								
<b>H221</b>								
<b>D223</b>								
<b>H248</b>								
<b>H274</b>								
<b>A278</b>								
<b>G279</b>								
<b>M317</b>								
<b>L318</b>								
<b>C321</b>								
<b>H322</b>								
<b>D362</b>								
<b>M366</b>								
<b>I467(R)</b>								
<b>Ni601</b>								
<b>Ni602</b>								
<b>NIRC</b>	11	10	9	10	9	10	9	10

Fonte: o próprio autor

\*valor obtido na redocagem do DJM (51). NIRC = número de interações com resíduos chave

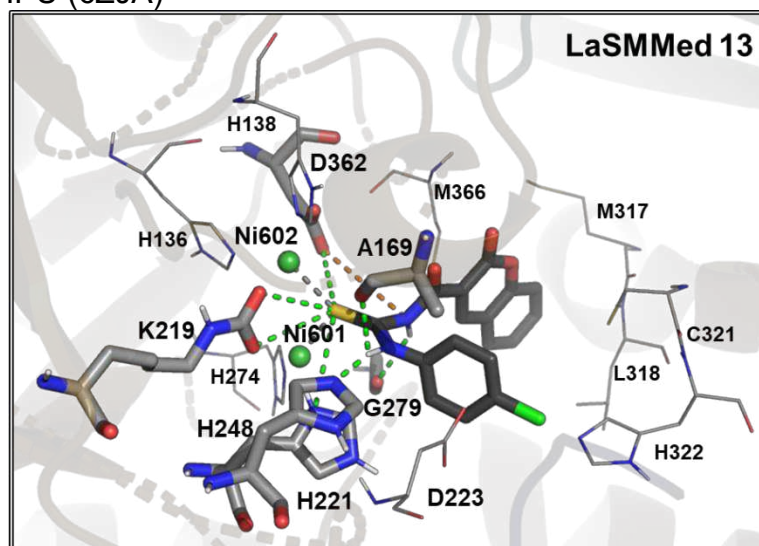
Legenda das cores de acordo com os tipos de interações:

	Interação de hidrogênio		Empilhamento $\pi$ -- $\pi$		$\pi$ – ânion
	Hidrogênio não-convencional		Empilhamento $\pi$ - $\pi$ em T		$\pi$ – cátion
	Carga atrativa (O-+N)		$\pi$ – alquila		Enxofre – X (O,N,S)
	Metal – aceptor		Alquila		Interação de halogênio
	Interação $\pi$ - hidrogênio		$\pi$ – Enxofre		$\pi$ – $\sigma$

Especificamente, a cumariltioureia (**LaSMMed 13**) realizou interações por ligação de hidrogênio convencionais entre o átomo de enxofre presente na

subunidade tioureia com os carboxilatos dos resíduos de K219 e D362, a distâncias de 3,3 – 3,6 Å, e com o NH da H221 a 3,0 Å de distância entre os átomos. Os NH da mesma subunidade (tioureia) também realizaram interações de hidrogênio com a H248, A169 e G279, a distâncias de 1,8, 2,6 e 2,7 Å, respectivamente. Além destas, a subunidade tioureia também interage por interação do tipo íon-íon (eletrostática - carga atrativa) entre o N, presente na estrutura do **LaSMMed 13**, com a carga negativa resultante do carboxilato do ácido aspártico (D362) e ainda, o átomo de enxofre realiza interação do tipo metal-aceptor com os íons Ni (601 e 602), a distâncias de 2,2 e 2,4 Å; e  $\pi$ -S com os imidazóis das H136, H138 e H274. O anel benzênico contendo um átomo de cloro na posição 4 faz interação eletrostática do tipo  $\pi$ -ânion com o carboxilato do D223, que reside acima do plano do anel. Ademais, observa-se interação  $\pi$ -alquila da fenila do ligante com a A169, assim como do átomo de cloro com a H322. O anel cumarínico presente na estrutura do ligante também faz interações hidrofóbicas do tipo  $\pi$ -alquila com a M317, L318, C321 e interação  $\pi$ -S com o átomo de enxofre da M366, que se encontra acima do plano do anel cumarínico (Figura 47).

**Figura 47** – Representação gráfica das interações da cumariltioureia (**LaSMMed 13**) com a urease HPU (6ZJA)



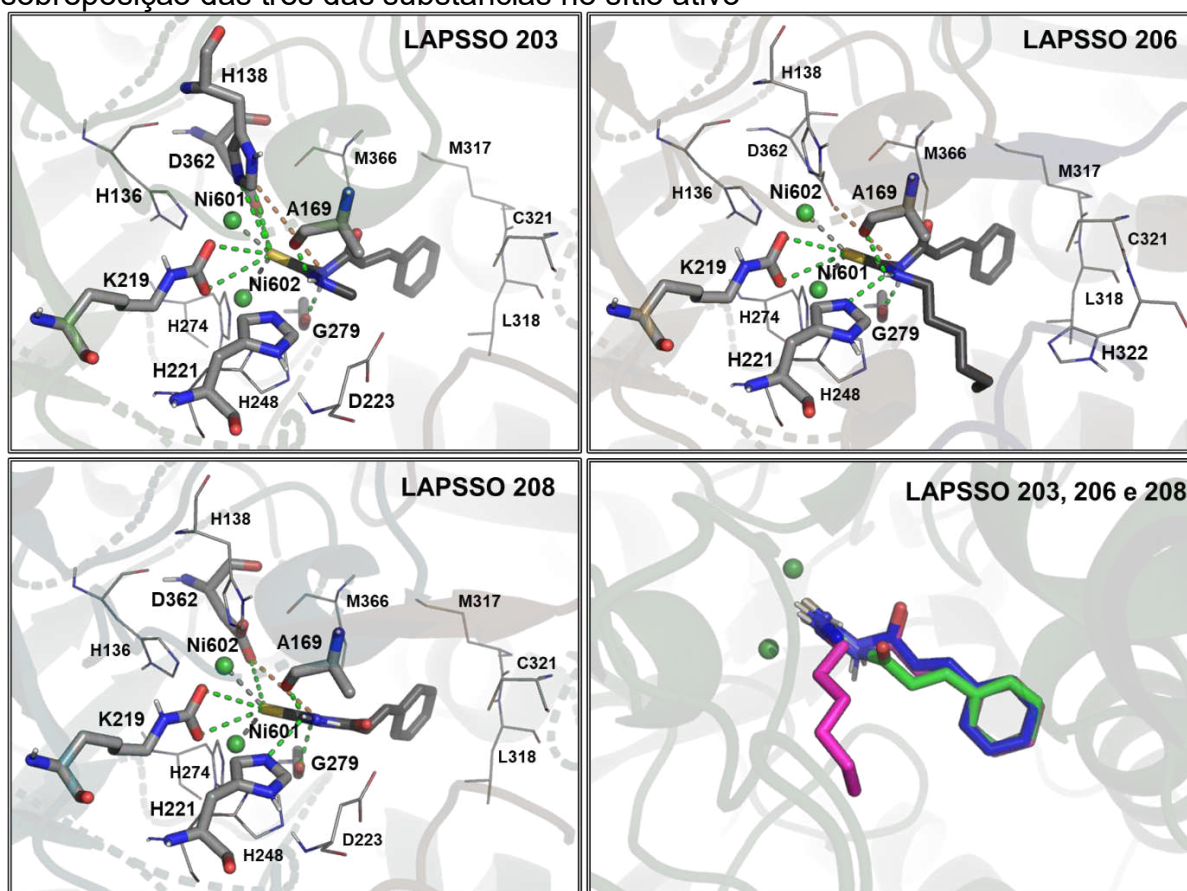
**Fonte:** o próprio autor

*Legenda de cores e representação:* A cadeia carbônica dos aminoácidos é demonstrada na cor cinza e na forma de linha e bastão. A cadeia carbônica do ligante na cor preta e na forma bastão. Os íons de níquel estão no formato de bolas de cor verde. O restante dos átomos é demonstrado nas cores correspondentes aos elementos. Vermelho: oxigênio; Azul: nitrogênio; Amarelo: enxofre; Branco: hidrogênio. As interações por ligação de hidrogênio convencionais são demonstradas como pontos verdes; não-convencionais como pontos azuis; metal-aceptor em cinza e carga-atrativa em laranja.

Os derivados do ácido *trans*-cinâmico **LAPSSO 203**, **206** e **208** com substituintes alifáticos também interagiram por ligação de hidrogênio convencional com a A169, K219, H221 e G279. Interações eletrostáticas do enxofre presente na subunidade da tioureia dos ligantes com os imidazóis das histidinas H136, H138, H221 e H248, bem como a interação do tipo metal-acceptor entre os íons níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) e o enxofre também estão presentes para todas as substâncias. O anel benzênico da subunidade oriunda do ácido *trans*-cinâmico também interage de forma semelhante com a proteína, para todos os derivados que a contém. Os orbitais  $\pi$  das estruturas fazem interações eletrostáticas com o átomo de enxofre da M366 e interação do tipo  $\pi$ --alquila com M317, L318 e C321. As pequenas diferenças observadas, em termos de interações, para **LAPSSO 203**, **206** e **208** são: substância **LAPSSO 203** aproxima-se mais da H138, permitindo assim a interação por ligação de hidrogênio (S--HN) a uma distância de 3,4 Å; a **LAPSSO 206** está mais distante do D362, acima de 4 Å de distância entre o carboxilato e o enxofre, perdendo a interação por ligação de hidrogênio, contudo, gerando a interação hidrofóbica do tipo  $\pi$ --alquila entre a H322 e o CH da hexila; com relação a **LAPSSO 208**, esta apresentou uma pose praticamente idêntica a **LAPSSO 203**, a diferença mais significativa foi a perda da interação por ligação de hidrogênio com a H138 (Figura 48).

As tioureias que apresentam subunidades aromáticas, derivadas do ácido *trans*-cinâmico, **LAPSSO 210**, **211** e **212**, fazem interações bem semelhantes as destacadas anteriormente para os derivados alifáticos. Além disso, as poses adotadas pelos três derivados aromáticos em questão são muito semelhantes, como podemos ver na sobreposição da Figura 49. Desse modo, poucas diferenças em termos de interação podem ser destacadas entre os derivados aromáticos, bem como em relação aos alifáticos. Contudo, observa-se que a presença da subunidade fenila nas substâncias parece contribuir mais para a complementariedade ligante-proteína, uma vez que possibilita interações eletrostáticas com os resíduos de D223 ( $\pi$ --ânion) e A169 ( $\pi$ --alquila).

**Figura 48** – Interações das substâncias **LAPSSO 203**, **206** e **208** com a HPU e sobreposição das três das substâncias no sítio ativo



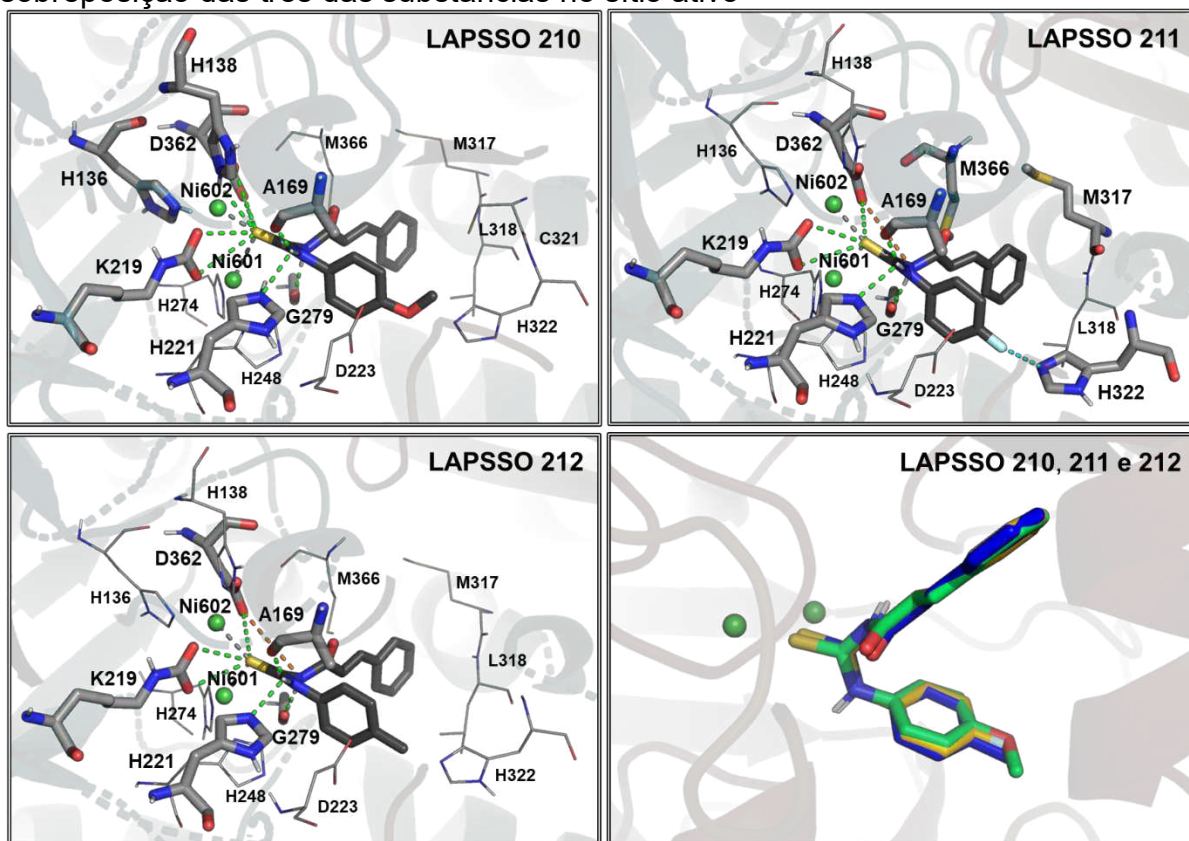
**Fonte:** o próprio autor

**Legenda de cores e representação:** A cadeia carbônica dos aminoácidos é demonstrada na cor cinza e na forma de linha e bastão. A cadeia carbônica do ligante na cor preta e na forma bastão. Os íons de níquel estão no formato de bolas de cor verde. Na sobreposição: Azul: **LAPSSO 203**; Magenta: **LAPSSO 206** e Verde: **LAPSSO 208**. O restante dos átomos é demonstrado nas cores correspondentes aos elementos. Vermelho: oxigênio; Azul: nitrogênio; Amarelo: enxofre; Branco: hidrogênio. As interações por ligação de hidrogênio convencional são demonstradas como pontos verdes; não-convencionais como pontos azuis; metal-aceptor em cinza e carga-atrativa em laranja.

Com relação as diferenças de interações entre os derivados **LAPSSO 210**, **211** e **212**, observa-se que o enxofre da tioureia do **LAPSSO 210** se aproxima mais da H138, criando uma interação por ligação de hidrogênio com o resíduo de H138 a uma distância de 2,9 Å. Por sua vez, a **LAPSSO 211** difere-se em suas interações por realizar uma interação do tipo  $\pi$ --S entre o anel benzênico da subunidade oriunda do ácido *trans*-cinâmico com o enxofre da M317, além da interação do tipo  $\pi$ --alquila com a cadeia carbônica da M366. Os outros dois derivados (**LAPSSO 210** e **211**) adotaram uma pose que permite a interação de  $\pi$ --S entre o anel benzênico com o enxofre da M366 e com a cadeia carbônica da M317 ( $\pi$ --alquila). Além disso, a presença do átomo de flúor na estrutura do **LAPSSO 211**

permite a realização de uma interação de halogênio com o N da H322, que atua como base de Lewis, enquanto que para os outros derivados ocorre uma interação  $\pi$ -alquila entre o imidazol da H322 e a metila presente nos ligantes (**LAPSSO 210** e **212**) (Figura 49).

**Figura 49** – Interações das substâncias **LAPSSO 210** – **212** com a HPU e sobreposição das três das substâncias no sítio ativo



**Fonte:** o próprio autor

**Legenda de cores e representação:** A cadeia carbônica dos aminoácidos é demonstrada na cor cinza e na forma de linha e bastão. A cadeia carbônica do ligante na cor preta e na forma bastão. Os íons de níquel estão no formato de bolas de cor verde. Na sobreposição: Verde: **LAPSSO 210**; Amarelo: **LAPSSO 211** e Azul: **LAPSSO 212** O restante dos átomos é demonstrado nas cores correspondentes aos elementos. Vermelho: oxigênio; Azul: nitrogênio; Amarelo: enxofre; Branco: hidrogênio. As interações por ligação de hidrogênio convencional são demonstradas como pontos verdes; não-convencionais como pontos azuis; metal-aceptor em cinza e carga-atrativa em laranja

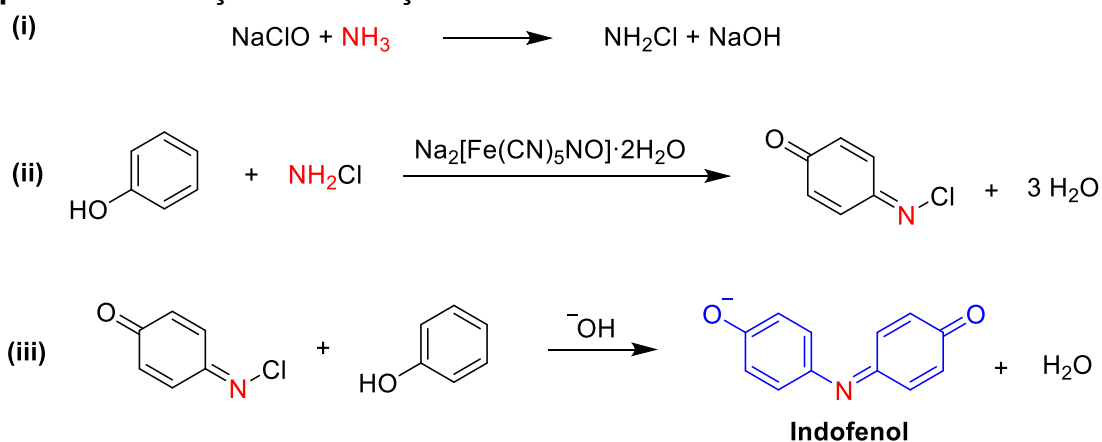
### 3.5 ENSAIO *IN VITRO* PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIUREOLÍTICA DAS SUBSTÂNCIAS NA UREASE DE *CANAVALIA ENSIFORMIS*

A atividade antiureolítica das substâncias foi avaliada por meio do teste colorimétrico da reação do indofenol. Esta reação foi primeiramente descrita por Berthelot, em 1859, e desde então pequenas modificações para aperfeiçoar o método,

bem como ajustar os parâmetros para as determinações biológicas foram realizadas ao longo dos anos, inclusive na metodologia utilizada nesse trabalho, que foi originalmente descrita por Weatherburn (1967) (HUIZENGA *et al.*, 1994; WEATHERBURN, 1967).

O princípio desta reação se concentra na mudança de coloração observada no meio reacional, de incolor para azul, que ocorre devido a reação da amônia com o fenol, em meio alcalino, e na presença de um catalisador, o nitroprussiato de sódio (Esquema 6). Primeiramente, em meio básico, **(i)** a amônia reage com o hipoclorito de sódio para formar a monocloroamina; na sequência, **(ii)** a monocloroamina reage com o fenol, na presença do nitroprussiato de sódio (catalisador), para formar a benzoquinonaclorimina que, por fim, **(iii)** reage com outra molécula de fenol para formar a substância de color azul, o indofenol (KIMBLE *et al.*, 2006).

#### Esquema 6 – Reação de formação do indofenol



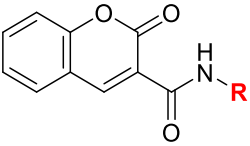
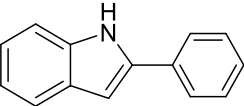
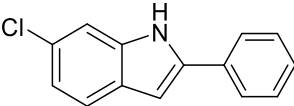
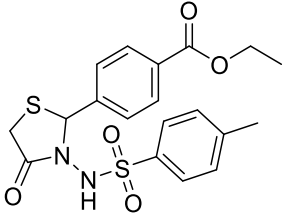
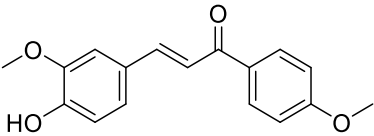
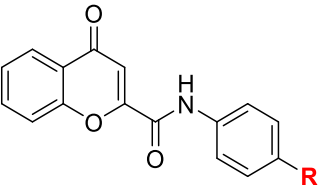
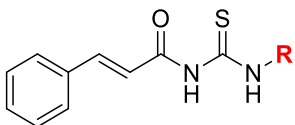
**Fonte:** adaptado de Kimble et al. (2006)

A urease é a enzima que catalisa a hidrólise da ureia e, como produto dessa reação, gera carbamato e amônia. Portanto, por meio da reação do indofenol, é possível quantificar a amônia liberada nesse processo, visto que, quanto mais amônia no meio, maior a concentração de indofenol e, conseqüentemente, maior a intensidade da coloração azul observada. Assim, por meio da análise de absorção por espectroscopia UV-visível (630 nm) é possível determinar a atividade da enzima.

Dessa forma, as substâncias selecionadas no processo de triagem virtual foram submetidas a reação do indofenol e assim, avaliou-se a capacidade das

substâncias em inibir a atividade enzimática da urease de *Canavalia ensiformis* e, portanto, reduzir a concentração de indofenol no meio reacional, diminuindo a coloração azul do poço, em relação ao controle positivo. Neste primeiro momento, a quantificação foi realizada pelo cálculo da porcentagem de inibição enzimática (%IE), com os valores dispostos na Tabela 6.

**Tabela 6** – Atividade inibitória das substâncias selecionadas na triagem virtual e tiourea (2,0 mM) frente a CEU (0,0035 mM)

			
LaSMMed 13-22	LaSMMed 30	LaSMMed 33-37	LaSMMed 49
			
LaSMMed 69	LaSMMed 72-73	LAPSSO 203-212	

Substância	R	%IE	Substância	R	%IE ± DP
LaSMMed 13	CSNH-4-CIPh	Nd	LaSMMed 69 <sup>a</sup>	-	16,97 ± 2,13
LaSMMed 16	3-BrPh	Nd	LaSMMed 72 <sup>b</sup>	Cl	4,37 ± 1,74
LaSMMed 22	3-CIPh	Nd	LAPSSO 203 <sup>c</sup>	CH <sub>3</sub>	33,53 ± 1,06
LaSMMed 30	4-COOCH <sub>3</sub>	Nd	LAPSSO 206 <sup>c</sup>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	39,34 ± 1,72
LaSMMed 33	H	Nd	LAPSSO 208 <sup>d</sup>	H	82,37 ± 0,34
LaSMMed 34	4-OCH <sub>3</sub>	Nd	LAPSSO 210	4-OCH <sub>3</sub> Ph	Nd
LaSMMed 35	4-Br	Nd	LAPSSO 211 <sup>e</sup>	4-FPh	23,98 ± 1,44
LaSMMed 37	4-COOCH <sub>3</sub>	Nd	LAPSSO 212 <sup>f</sup>	4-CH <sub>3</sub> Ph	13,04 ± 2,46
LaSMMed 49	-	Nd	Tiourea <sup>d</sup>	-	84,12 ± 0,84
LaSMMed 73	Br	Nd			

Fonte: o próprio autor

Legenda: %IE: porcentagem de inibição enzimática; DP: desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata; Nd: não determinado (insolúvel). Letras distintas indicam diferença significativa entre os valores pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ), calculado no Sisvar (FERREIRA, 2019)

De modo geral, dentre as substâncias avaliadas, o análogo da apocinina **LaSMMed 69**, a cromona (**LaSMMed 72**) e o derivado do ácido cinâmico dissubstituído **LAPSSO 212**, foram as substâncias que apresentaram as menores porcentagens de inibição, abaixo de 20% e, portanto, são as substâncias menos ativas das selecionadas na triagem. Observou-se que os derivados do ácido cinâmico

dissubstituídos com substituintes alifáticos, **LAPSSO 203** e **206** apresentaram valores de %IE moderados, entre 30 e 40%, que não os difere estatisticamente entre si, enquanto que os derivados aromáticos (**LAPSSO 211** e **212**) apresentaram inibições modestas de 24 e 13%, respectivamente. Contudo, o derivado monosubstituído na subunidade da tioureia (**LAPSSO 208**) apresentou uma ótima potência de inibição, 82%, valor estatisticamente comparável ao padrão tioureia, com aproximadamente 84% (Tabela 6) (SCOTT; KNOTT, 1974). Infelizmente, boa parte dos compostos (**LaSMMed 13 – 49, 73** e **LAPSSO 210**) não puderam ser devidamente avaliados, pois durante a ensaio biológico ocorreu a precipitação das substâncias no meio reacional, predominantemente aquoso. Isso se deve ao caráter hidrofóbico dessas substâncias.

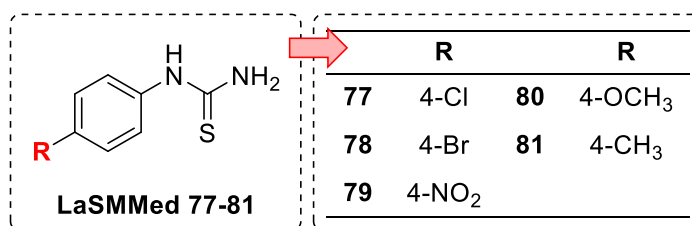
Assim, analisando os valores de %IE obtidos para as substâncias, podemos afirmar que a tioureia monosubstituídas **LAPSSO 208** foi o derivado mais promissor testado. Isso indica que a subunidade tioureia deve estar livre, para adentrar o sítio ativo da enzima e, possivelmente, interagir com os íons  $\text{Ni}^{2+}$  e resíduos de aminoácidos importantes para a atividade enzimática (Figura 48), impedindo a catálise da ureia e liberação de amônia. Dessa forma, **LAPSSO 208** pode ser considerada uma substância-protótipo para o planejamento de novos inibidores.

### 3.6 PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE ARILTIOUREIAS COMO INIBIDORAS DE UREASE

Considerando as análises e padrões observados até aqui, tais quais as informações estruturais do sítio ativo da enzima, principalmente no quesito tamanho do sítio, bem como o padrão de inibição observado nos ensaios e do potencial de inibição exibido pela tioureia monosubstituída **LAPSSO 208**, decidiu-se sintetizar uma pequena série das ariltioureias monosubstituídas (**LaSMMed 77 – 81**) e avaliá-las quanto a sua potência de inibição frente a urease de *C. ensiformis*.

#### 3.6.1 Síntese e Caracterização das Ariltioureias

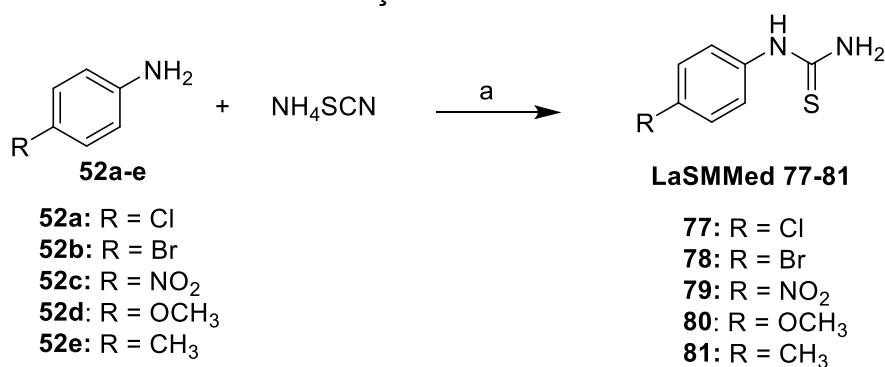
Assim, uma pequena série de ariltioureias monosubstituídas, contendo grupos com diferentes características estereo-eletrônicas na posição *para* do anel benzênico (**LaSMMed 77-81** - Figura 50), foi sintetizada.

**Figura 50** – Série de ariltioureas sintetizadas

**Fonte:** o próprio autor

**Legenda de cores:** Vermelho: Local de inserção dos diferentes substituintes

Um método comum para obtenção de tioureas primárias ocorre por meio de um rearranjo térmico do sal tiocianato, em um intermediário isotiocianato, que facilmente reage com aminas e substâncias nucleofílicas, liberando gás amônia, e formando uma tiourea primária (HERR *et al.*, 2000). Assim, as ariltioureas foram sintetizadas conforme metodologia descrita por Kataria e colaboradores (2019). Resumidamente, a anilina correspondente (**52a-e**) reagiu com ácido clorídrico concentrado por cerca de 10 min e depois, foi acrescentada ao meio reacional uma solução de NH<sub>4</sub>SCN que, sob refluxo, gerou os derivados de ariltioureas **LaSMMed 77-81**, conforme demonstrado no Esquema 7. Os produtos obtidos foram recristalizados ou lavados com metanol, em rendimentos de 38 a 48%.

**Esquema 7** – Rota sintética de obtenção da ariltioureas **LaSMMed 77-81**

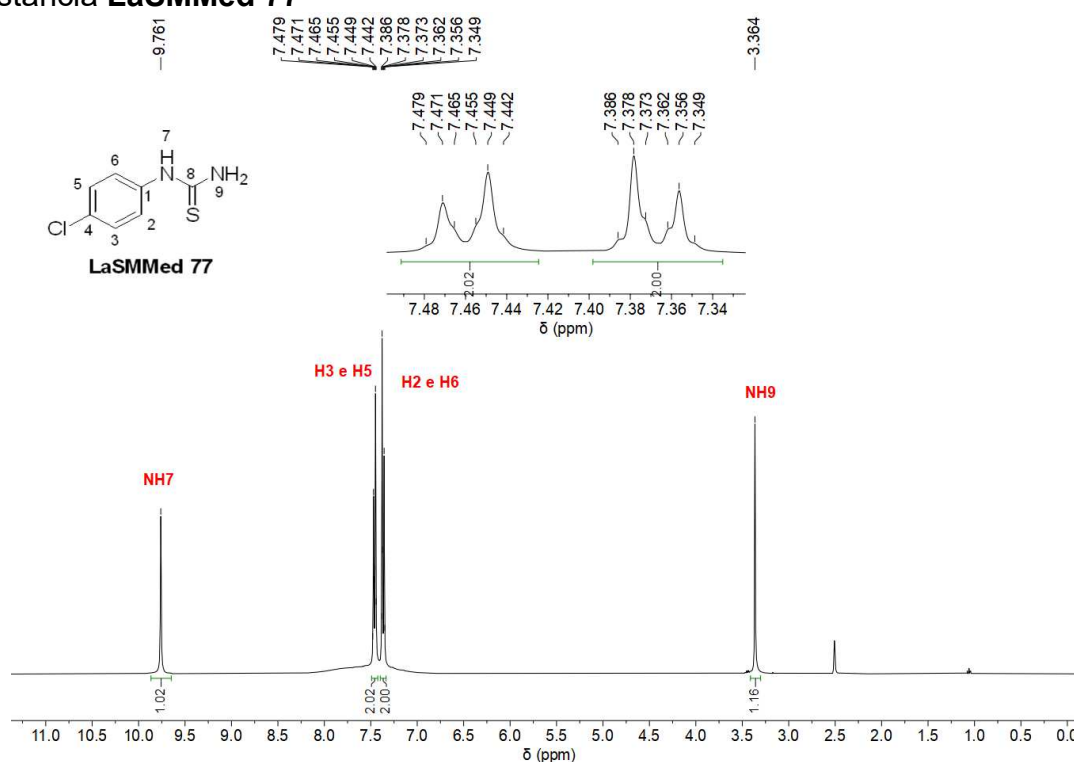
**Condições reacionais:** a) HCl, H<sub>2</sub>O, t.a - refluxo, 24h.

**Fonte:** o próprio autor

A caracterização das substâncias foi realizada por meio de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e as respectivas atribuições para os derivados são mostradas no Apêndice B, nas Figura B11-20. De modo geral, foram observados os sinais característicos de formação das substâncias **LaSMMed 77-81**, como um simpleto em 9,5 – 10,3 ppm no

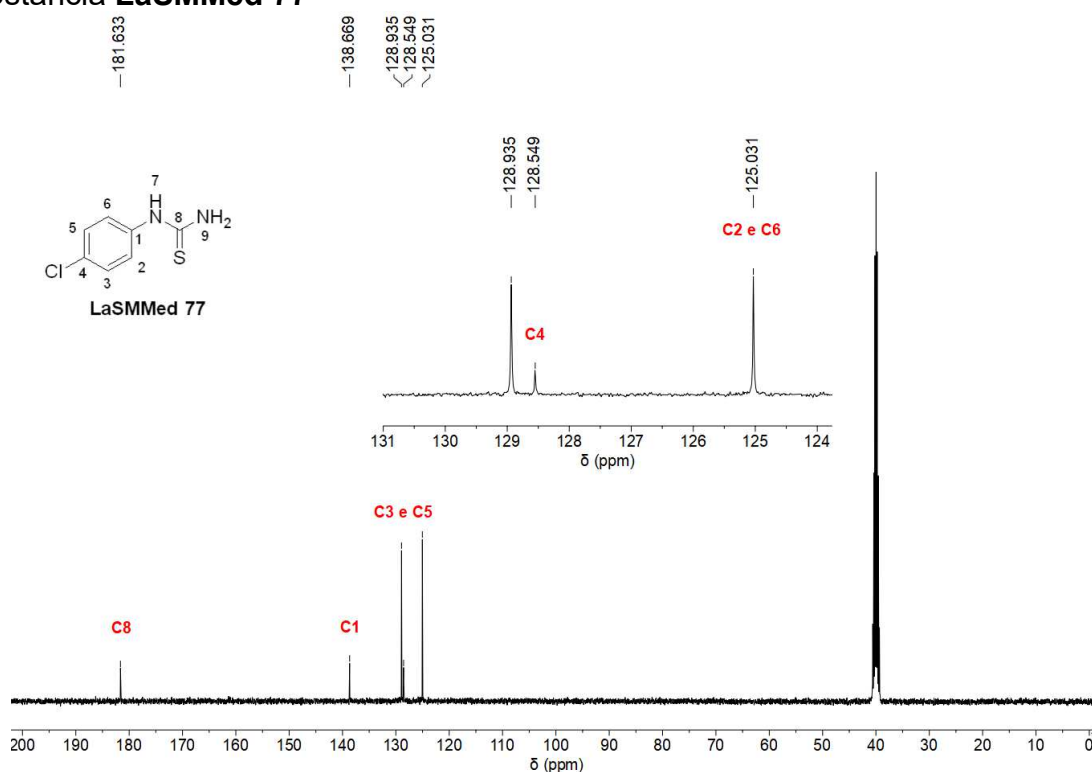
espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , característico do  $\text{NH}$  dissustituído, bem como os 4H aromáticos entre 7,0 – 7,5 ppm e um simpleto em campo alto do espectro, próximo a 3,5 ppm, característicos de hidrogênios de aminas primárias (Figura 51). No RMN de  $^{13}\text{C}$ , sinais em 180 ppm, característicos de carbonilas e tionas, são observados em todos os espectros, bem como os sinais de CH de metino aromático em 110 – 140 ppm (Figura 52).

**Figura 51** – Exemplo de espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) obtido para a substância **LaSMMed 77**



Fonte: o próprio autor

**Figura 52** – Exemplo de espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz) obtido para a substância **LaSMMed 77**



Fonte: o próprio autor

### 3.6.2 Ensaios *in vitro* na Urease de *Canavalia ensiformis*

Os resultados do ensaio de inibição enzimática nos mostram que os derivados de ariltioureas são potentes inibidores da urease, com porcentagens de inibição de quase 90% (Tabela 7).

**Tabela 7** – Atividade inibitória das ariltioureas (2,0 mM) frente a CEU (0,0035 mM)

Estrutura	Substância	R	%IE $\pm$ DP
 LaSMMed 77-81	LaSMMed 77 <sup>a</sup>	Cl	87,63 $\pm$ 1,72
	LaSMMed 78 <sup>a</sup>	Br	86,18 $\pm$ 0,75
	LaSMMed 79 <sup>a</sup>	NO <sub>2</sub>	88,30 $\pm$ 0,26
	LaSMMed 80 <sup>b</sup>	OCH <sub>3</sub>	84,56 $\pm$ 1,23
	LaSMMed 81 <sup>a</sup>	CH <sub>3</sub>	87,86 $\pm$ 0,48
	Tiourea <sup>b</sup>	-	84,12 $\pm$ 0,84

Fonte: o próprio autor

Legenda: %IE: porcentagem de inibição enzimática; DP: desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata. Letras distintas indicam diferença significativa entre os valores pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ), calculado no Sisvar (FERREIRA, 2019)

Segundo o teste estatístico de Scott-Knott, os derivados **LaSMMed**

**77-79 e LaSMMed 81**, não apresentaram diferença estatística entre si, sugerindo que a mudança do substituinte no anel benzênico não interferiu na atividade anti-ureolítica da série (SCOTT; KNOTT, 1974). Contudo, o derivado contendo um grupo doador de elétrons mais forte, como a metoxila (**LaSMMed 80**), apresentou uma diferença significativa no valor de inibição em relação aos derivados relatados anteriormente. Assim, a inserção de fortes grupos doadores de elétrons na fenila pode resultar em uma atividade inibitória menos efetiva. Todavia, cabe ressaltar que, apesar da substância **LaSMMed 80** apresentar uma %IE inferior ao grupo do derivado **LaSMMed 79**, a atividade anti-ureolítica da substância é comparável ao padrão tioureia (84%).

Por fim, observamos que as tioureias monosubstituídas **LAPSSO 208** e **LaSMMed 77-81** são as substâncias mais promissoras do nosso estudo e, portanto, o mecanismo de inibição desses compostos, bem como o potencial de inibição em diferentes concentrações devem ser avaliados.

### 3.6.3 Docagem Molecular das Ariltioureias

A fim de compreender como seria o comportamento dessas substâncias no sítio ativo enzimático, a série de ariltioureias **LaSMMed 77-81** foi analisada por docagem molecular, seguindo os mesmos protocolos de docagem aplicados e validados neste trabalho para ambas as ureases, CEU e HPU.

#### 3.6.3.1 Urease de *Canavalia ensiformis*

Foi possível observar pela sobreposição dos derivados na Figura 53 que a melhor pose apresentada para os ligantes **LaSMMed 77-81** é praticamente idêntica para os 5 derivados. Além disso, o Quadro 5 e a Figura 53 destacam que as interações mais fortes, como as interações por ligação de hidrogênio convencional, metal-aceptor e eletrostáticas como carga-atrativa e  $\pi$ -enxofre, ocorrem com praticamente os mesmos átomos e resíduos de aminoácidos. Esses resultados corroboram com os elevados %IE obtidos para esses derivados (> 84 %, Tabela 7), onde também não foi observada a influência do substituinte sobre a atividade ureolítica.

**Quadro 5** – Interações em forma de cores entre as ariltioureias com a CEU

	LaSMMed 77	LaSMMed 78	LaSMMed 79	LaSMMed 80	LaSMMed 81
<b>Pontuação</b>	26,00	25,45	28,44	28,14	25,58
<b>H407</b>					
<b>A440</b>					
<b>K490</b>					
<b>H492</b>					
<b>D494</b>					
<b>H519</b>					
<b>G550</b>					
<b>H593</b>					
<b>R609</b>					
<b>D633</b>					
<b>Ni901</b>					

Fonte: o próprio autor

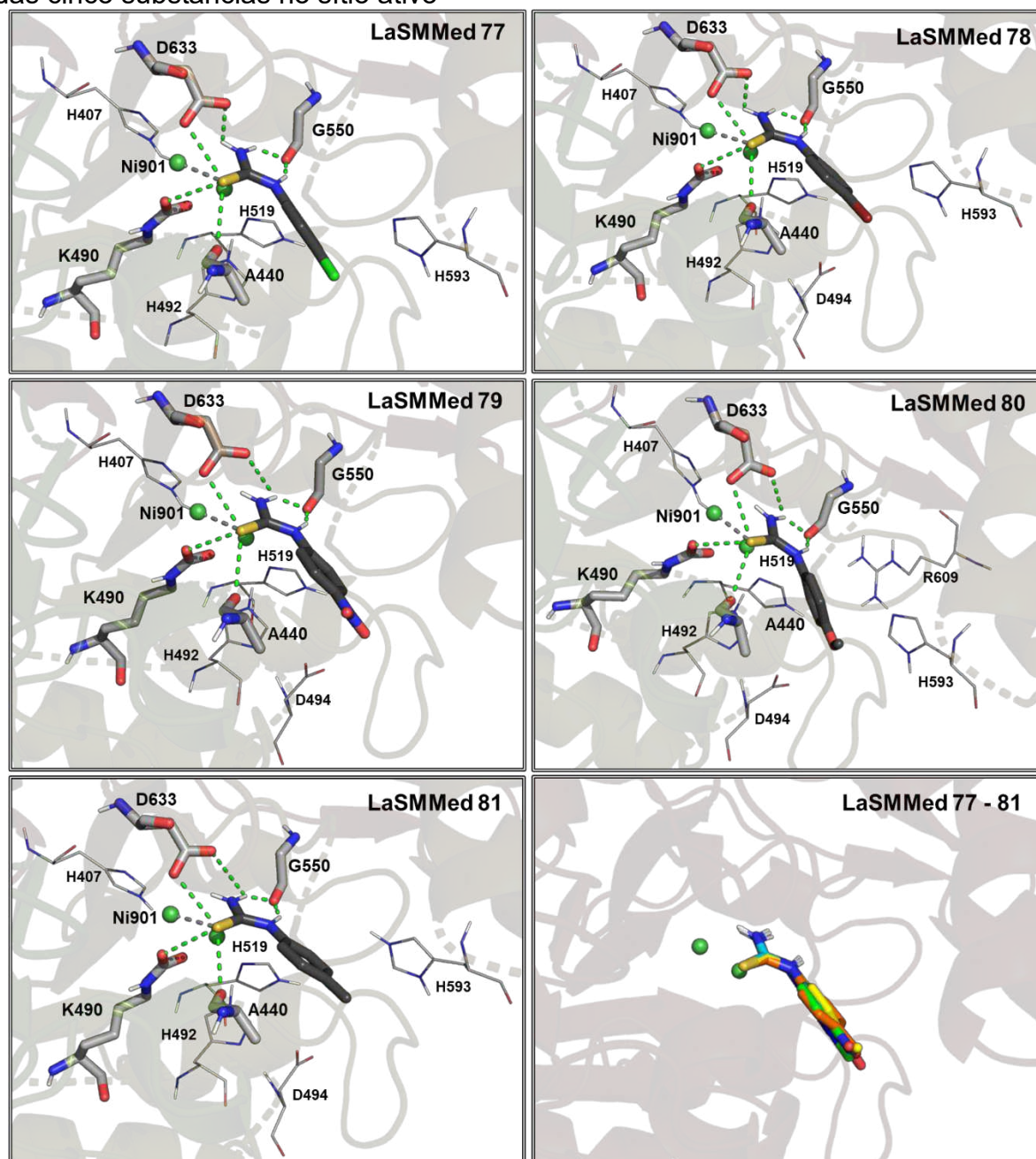
Legenda das cores de acordo com os tipos de interações:

	Interação de hidrogênio		Empilhamento $\pi$ -- $\pi$		$\pi$ – ânion
	Hidrogênio não-convencional		Empilhamento $\pi$ - $\pi$ em T		$\pi$ – cátion
	Carga atrativa (O-+N)		$\pi$ – alquila		Metal – aceptor

Todos os átomos de enxofre presentes na subunidade tioureia das substâncias **LaSMMed 77-81** interagiram por ligação metal-aceptor com o Ni601 presente no sítio ativo da enzima a uma distância de 2,5 Å. Além disso, todos os enxofres das ariltioureias podem interagir por ligação de hidrogênio convencional com A440, K490 e D633 a distâncias de 3,2 – 3,3 Å com A440, 3,3 – 3,4 Å com K490 e 3,2 – 3,3 Å com D633. NH e NH<sub>2</sub> também fazem importantes interações por ligação de hidrogênio com a carbonila da G550 que se encontra posicionada entre os NHs dos ligantes, a distâncias de 1,6 – 2,0 Å; e com o íon carboxilato do D633 a distâncias de 2,3 – 2,4 Å. As diferenças mais significativas nas interações observadas, estão no fato do **LaSMMed 80** e **81** não interagir com a H492 e A440 e **LaSMMed 80** ser o único derivado que consegue interagir eletrostaticamente com a R609 por interação  $\pi$ -cátion entre o anel benzênico do ligante com a guanidina da arginina. **LaSMMed 77** também não interage eletrostaticamente com o D494, no mais, os derivados apresentaram uma pose muito semelhante entre si, resultando em um mesmo padrão de interação

com o sítio ativo da CEU.

**Figura 53** – Interações das substâncias **LaSMMed 77 – 81** com a CEU e sobreposição das cinco substâncias no sítio ativo



**Fonte:** o próprio autor

**Legenda de cores e representação:** A cadeia carbônica dos aminoácidos é demonstrada na cor cinza e na forma de linha e bastão. A cadeia carbônica do ligante na cor preta e na forma bastão. Os íons de níquel estão no formato de bolas de cor verde. Na sobreposição: Azul: **LaSMMed 77**; Ciano: **LaSMMed 78**; Verde: **LaSMMed 79**; Amarelo: **LaSMMed 80** e Laranja: **LaSMMed 81**. O restante dos átomos é demonstrado nas cores correspondentes aos elementos. Vermelho: oxigênio; Azul: nitrogênio; Amarelo: enxofre; Branco: hidrogênio. As interações por ligação de hidrogênio convencional são demonstradas como pontos verdes; não-convencionais como pontos azuis; metal-acceptor em cinza.

### 3.6.3.2 Urease de *Helicobacter pylori*

A pose dos derivados com a HPU também não demonstrou grande diferença entre os ligantes. A substância que mais diferiu foi o **LaSMMed 77** que favoreceu a interação do enxofre com a carbonila da A365, a uma distância de 1,4 Å, enquanto que a pose adotada pelos outros derivados favorece a interação do enxofre com o íon Ni601 a distâncias de 2,0 – 2,1 Å (Figura 54). Além disso, a mudança da pose adotada pela substância **LaSMMed 77** resultou na perda das interações eletrostáticas ( $\pi$ -enxofre) com os resíduos de H136 e H138, mas resultou na interação por ligação de hidrogênio, a distância de 2,8 Å, entre o NH<sub>2</sub> do derivado com o íon carboxilato da K219, e interação do NH da tioureia com o nitrogênio do imidazol da H221 (Quadro 6). Ademais, todos os derivados interagiram por ligação de hidrogênio com a H138, A169, G279 e D362 a distâncias que variaram de 2,1 a 3,4 Å; interações eletrostáticas  $\pi$ -enxofre entre o enxofre dos derivados com o imidazol das H136, H221 e H248, e também interações de carga atrativa entre os NH dos derivados com os íons carboxilato dos resíduos K219 e D362.

No mais, nota-se que a presença do grupo metoxila no derivado **LaSMMed 80** favoreceu a interação por ligação de hidrogênio não convencional entre o hidrogênio metílico do substituinte com o carboxilato do D223 a distância de 3,5 Å (Figura 54). **LaSMMed 81** foi o único derivado que interagiu com a H274, por ligação de hidrogênio, entre o enxofre com o nitrogênio imidazólico, a uma distância de 3,3 Å.

Interações hidrofóbicas por empilhamento  $\pi$  em T com a H248 foi observada para todas as ariltioureias e interações do tipo  $\pi$ -alquila com a H322 e A169 também foram observadas para quase todos os derivados, exceto o **LaSMMed 79** que, devido a presença do grupo nitro, não interage com estes resíduos.

**Quadro 6 – Interações em forma de cores entre as ariltioureias com a HPU**

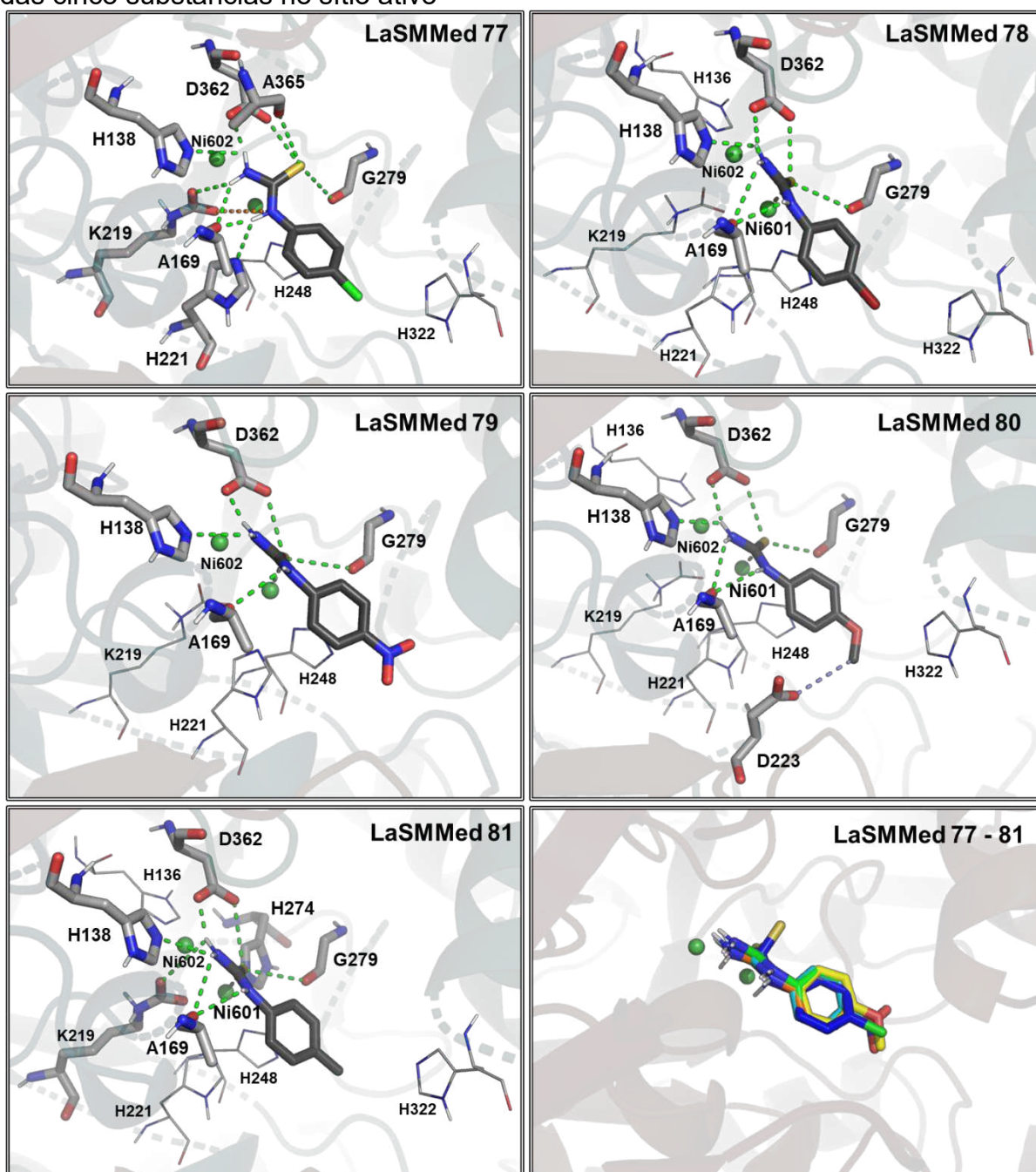
	LaSMMed 77	LaSMMed 78	LaSMMed 79	LaSMMed 80	LaSMMed 81
<b>Pontuação</b>	22,57	24,41	27,99	27,36	26,08
<b>H136</b>					
<b>H138</b>					
<b>A169</b>					
<b>K219</b>					
<b>H221</b>					
<b>D223</b>					
<b>H248</b>					
<b>H274</b>					
<b>G279</b>					
<b>H322</b>					
<b>D362</b>					
<b>A365</b>					
<b>Ni601</b>					

Fonte: o próprio autor

Legenda das cores de acordo com os tipos de interações:

	Interação de hidrogênio		Empilhamento $\pi$ -- $\pi$		$\pi$ – ânion
	Hidrogênio não-convencional		Empilhamento $\pi$ - $\pi$ em T		$\pi$ – cátion
	Carga atrativa (O-+N)		$\pi$ – alquila		Metal – aceptor

**Figura 54** – Interações das substâncias LaSMMed 77 – 81 com a HPU e sobreposição das cinco substâncias no sítio ativo



**Fonte:** o próprio autor

**Legenda de cores e representação:** A cadeia carbônica dos aminoácidos é demonstrada na cor cinza e na forma de linha e bastão. A cadeia carbônica do ligante na cor preta e na forma bastão. Os íons de níquel estão no formato de bolas de cor verde. Na sobreposição: Azul: **LaSMMed 77**; Ciano: **LaSMMed 78**; Verde: **LaSMMed 79**; Amarelo: **LaSMMed 80** e Laranja: **LaSMMed 81**. O restante dos átomos é demonstrado nas cores correspondentes aos elementos. Vermelho: oxigênio; Azul: nitrogênio; Amarelo: enxofre; Branco: hidrogênio. As interações por ligação de hidrogênio convencional são demonstradas como pontos verdes; não-convencionais como pontos azuis; metal-aceptor em cinza.

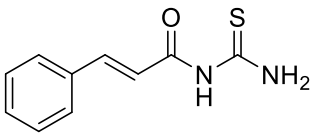
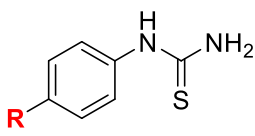
### 3.7 AVALIAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS LÍDERES EM PARÂMETROS DE POTÊNCIA COMO IC<sub>50</sub> E K<sub>i</sub>

#### 3.7.1 Determinação da Metade da Concentração Inibitória Máxima (IC<sub>50</sub>) em CEU

No processo de desenvolvimento de novos fármacos, o conceito de metade da concentração inibitória máxima (IC<sub>50</sub>) é amplamente utilizado como uma medida da potência de uma determinada substância ao inibir funções biológicas ou bioquímicas (CALDWELL *et al.*, 2012). O valor IC<sub>50</sub> indica a concentração do inibidor que é necessária para diminuir a atividade enzimática em 50%.

Assim como para a determinação da %IE, o IC<sub>50</sub> foi determinado por meio da reação do indofenol. Esta análise foi realizada para as substâncias mais potentes em nosso estudo, especificamente os derivados de tioureia monossustituídas **LAPSSO 208** e **LaSMMed 77-81**. Assim, o IC<sub>50</sub> foi determinado graficamente utilizando uma curva dose-resposta, plotando as diferentes concentrações do inibidor no eixo X (0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 1,4 e 2,0 mM), contra a correspondente inibição enzimática (%) no eixo Y. Os valores de IC<sub>50</sub> obtidos para os nossos inibidores estão dispostos na Tabela 8.

**Tabela 8** – Determinação do IC<sub>50</sub> das substâncias líderes **LAPSSO 208** e **LaSMMed 77-81** frente a CEU (0,0035 mM)

			
LAPSSO 208		LaSMMed 77-81	
Substâncias	R	IC <sub>50</sub> (mM) ± DP	
LAPSSO 208 <sup>a</sup>	-	0,413 ± 0,017	
LaSMMed 77 <sup>b</sup>	Cl	0,575 ± 0,010	
LaSMMed 78 <sup>c</sup>	Br	0,493 ± 0,007	
LaSMMed 79 <sup>d</sup>	NO <sub>2</sub>	0,464 ± 0,003	
LaSMMed 80 <sup>c</sup>	OCH <sub>3</sub>	0,510 ± 0,019	
LaSMMed 81 <sup>b</sup>	CH <sub>3</sub>	0,568 ± 0,022	
Tioureia <sup>c</sup>	-	0,504 ± 0,025	

**Fonte:** o próprio autor

**Legenda:** IC<sub>50</sub>: metade da concentração inibitória máxima; DP: desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata. Letras distintas indicam diferença significativa entre os valores pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ), calculado no Sisvar (FERREIRA, 2019)

O derivado do ácido cinâmico, **LAPSSO 208** foi a substância mais promissora em nosso estudo como inibidor de urease de *Canavalia ensiformis*. Isso indica que o espaçamento entre o anel aromático e a subunidade tioureia contribuiu positivamente para a atividade inibitória no derivado, visto que este apresentou um  $IC_{50}$  de 0,41 mM, atividade superior ao observado para o padrão, a tioureia ( $IC_{50}$  = 0,50 mM).

Entre as ariltioureias, podemos observar que um substituinte retirador de elétrons mais forte, como o nitro (**LaSMMed 79**), parece favorecer a inibição enzimática quando analisado em crescentes concentrações. Este derivado apresentou a maior potência de inibição entre as ariltioureias, com um  $IC_{50}$  de 0,46 mM, sendo mais potente que a padrão tioureia. Os derivados **LaSMMed 78** e **80** também apresentaram uma boa potência de inibição, visto que, estatisticamente, são comparáveis a tioureia. As ariltioureias com o substituinte cloro e metila, **LaSMMed 77** e **81**, respectivamente, foram os derivados que demonstraram a menor potência de inibição para a urease de *C. ensiformis*, com valores de  $IC_{50}$  correspondente a 0,57 mM.

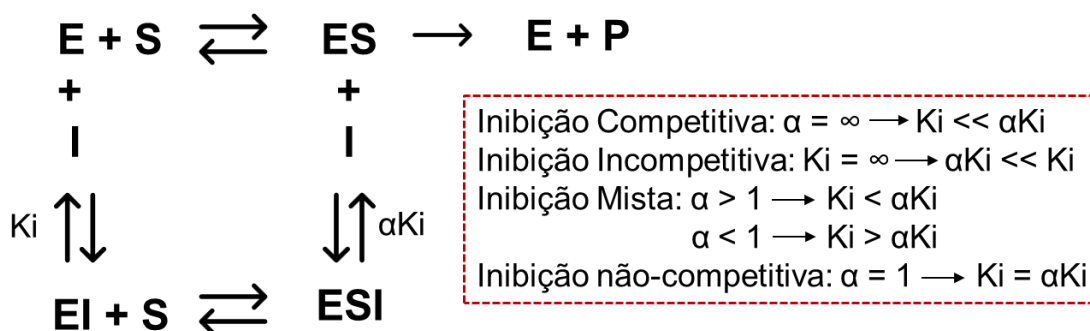
### 3.7.2 Cinética Enzimática e Determinação da Constante de Inibição ( $K_i$ )

A cinética enzimática é uma quantificação realizada com o intuito de avaliar taxas, como velocidade de reação e suas modificações devido a concentração de produtos e reagentes, e como isto impacta nos mecanismos das reações enzimáticas. O conceito principal de cinética está atrelado a complementariedade do ligante-proteína e a força de interação do complexo nesse processo (PAPAMICHAEL *et al.*, 2019).

Em um sistema de inibição enzimática, as enzimas estão sujeitas a inibições do tipo reversíveis e irreversíveis. Quando a inibição enzimática é reversível, o inibidor pode apresentar três formas de interação com a enzima, gerando três modelos cinéticos principais (Figura 55): 1) Quando o inibidor é dito competitivo, este tende a competir com o substrato pelo sítio ativo da enzima, de modo que, à medida que o inibidor ocupa o sítio ativo, impede que o substrato se ligue a enzima, obtendo-se um complexo do tipo enzima-inibidor (EI); 2) Quando o inibidor é dito incompetitivo,

irá se ligar a um sítio de ligação diferente do substrato, um sítio alostérico, de forma que este tipo de inibição ocorre na formação do complexo enzima-substrato, gerando um complexo enzima-substrato-inibidor (ESI); 3) há ainda a inibição do tipo mista, em que a substância inibidora pode se ligar tanto a enzima livre (EI), em um sítio alostérico, quanto ao complexo enzima-substrato, formando o complexo enzima-substrato-inibidor (ESI), diminuindo assim a atividade enzimática. Há ainda um caso especial de inibição mista, chamada de não-competitiva, em que a substância pode ter a mesma afinidade pela enzima livre quanto pelo complexo enzima-substrato (NELSON; COX, 2014).

**Figura 55** – Resumo gráfico dos tipos de interações enzimáticas com o substrato (S) e substâncias inibidoras (I) e definições de diferentes modalidades de inibição



**Fonte:** Adaptado de Buker *et al.* (2019)

**Legenda:** E: enzima; S: Substrato; I: inibidor; ES: complexo enzima-substrato; EI: complexo enzima-inibidor; ESI: complexo enzima-substrato-inibidor;  $K_i$ : constante de inibição;  $\alpha$ : parâmetro alfa.

Como a velocidade de reação é afetada pela quantidade de enzima disponível para reação, os diferentes modos de ligação irão impactar a velocidade máxima de reação de modos diferentes. Em 1913, Michaelis-Menten postularam que, se a velocidade inicial de uma reação enzimática versus a concentração de substrato apresenta uma dependência hiperbólica, então essa reação segue a cinética de Michaelis-Menten (NELSON; COX, 2014). Com isso, esses matemáticos propuseram que a metade da velocidade máxima ( $V_{\max}$ ) de uma reação enzimática é atingida em uma determinada concentração de substrato, valor esse denominado de constante de Michaelis ( $K_m$ ) (NELSON; COX, 2014).

Assim, relacionando os modos de inibição com a cinética de Michaelis-Menten temos que: Quando o inibidor for do tipo competitivo, o valor da  $V_{\max}$  permanece inalterada, mas para que isso ocorra, precisará de uma maior

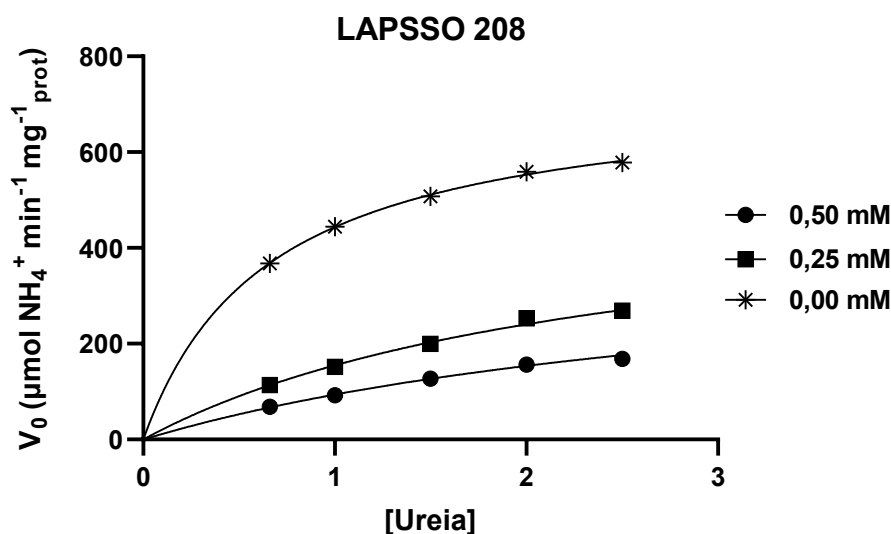
concentração de substrato, portanto, o valor de  $K_m$  irá mudar, será maior (COPELAND, 2013). Quando a inibição for do tipo incompetitiva, tanto o valor de  $V_{max}$  quanto o valor de  $K_m$  irão diminuir com o aumento da concentração do inibidor (COPELAND, 2013). Em relação as inibições do tipo mista, a reação não atingirá a  $V_{max}$ , independentemente da concentração do substrato, pois parte das enzimas sempre estarão ocupadas com o inibidor, porém o  $K_m$  irá ser modificado de acordo com o grau em que o inibidor afeta a afinidade da enzima pelo substrato (COPELAND, 2013). Essa afinidade é quantificada pelo parâmetro Alfa ( $\alpha$ ), de modo que, se  $\alpha > 1,0$  a preferência do inibidor é pela ligação com a enzima livre, gerando preferencialmente o complexo enzima-substrato, contudo, se  $\alpha < 1,0$  então o inibidor tem maior afinidade pelo complexo enzima-substrato (Figura 55). No caso especial em que  $\alpha = 1,0$ , definimos anteriormente como um inibidor do tipo não-competitivo e  $K_m$  não será afetado (COPELAND, 2013).

Além de  $K_m$ ,  $V_{max}$  e  $\alpha$ , outro importante termo que temos que identificar e quantificar nesse processo, é a constante de equilíbrio para a dissociação do complexo enzima-inibidor ( $K_i$ ). Esta constante de equilíbrio é a medida de afinidade da substância com a enzima, de modo que, quanto menor for o valor dessa constante, maior será a afinidade de ligação entre o complexo enzima-inibidor (NELSON; COX, 2014).

Assim, para facilitar a determinação destas constantes, bem como a visualização do mecanismo de inibição, a equação de Michaelis-Menten (hiperbólica) pode ser algebricamente transformada para gerar um gráfico linear de duplo-recíproco, em que o eixo Y corresponde a  $1/V_0$  e o eixo X corresponde a  $1/[S]$ . Essa linearização é conhecida como equação/gráfico de Lineweaver-Burk e será apresentada aqui em nossos resultados (NELSON; COX, 2014).

Portanto, para determinarmos o mecanismo de inibição das substâncias líderes em nosso estudo **LAPSSO 208** e **LaSMMed 77-81**, avaliamos o comportamento desses inibidores em duas concentrações, 0,25 e 0,5 mM e também na ausência de inibidores, para determinarmos a velocidade máxima de reação, sob diferentes concentrações do substrato ureia. Assim, um gráfico hiperbólico de velocidade inicial ( $V_0$ ) versus concentração de substrato (ureia) foi obtido para todas as substâncias e, para exemplificação, o gráfico do **LAPSSO 208** é demonstrado na Figura 56.

**Figura 56** - Gráfico hiperbólico do **LAPSSO 208** como exemplificação do comportamento de Michaelis-Menten na catálise enzimática da urease

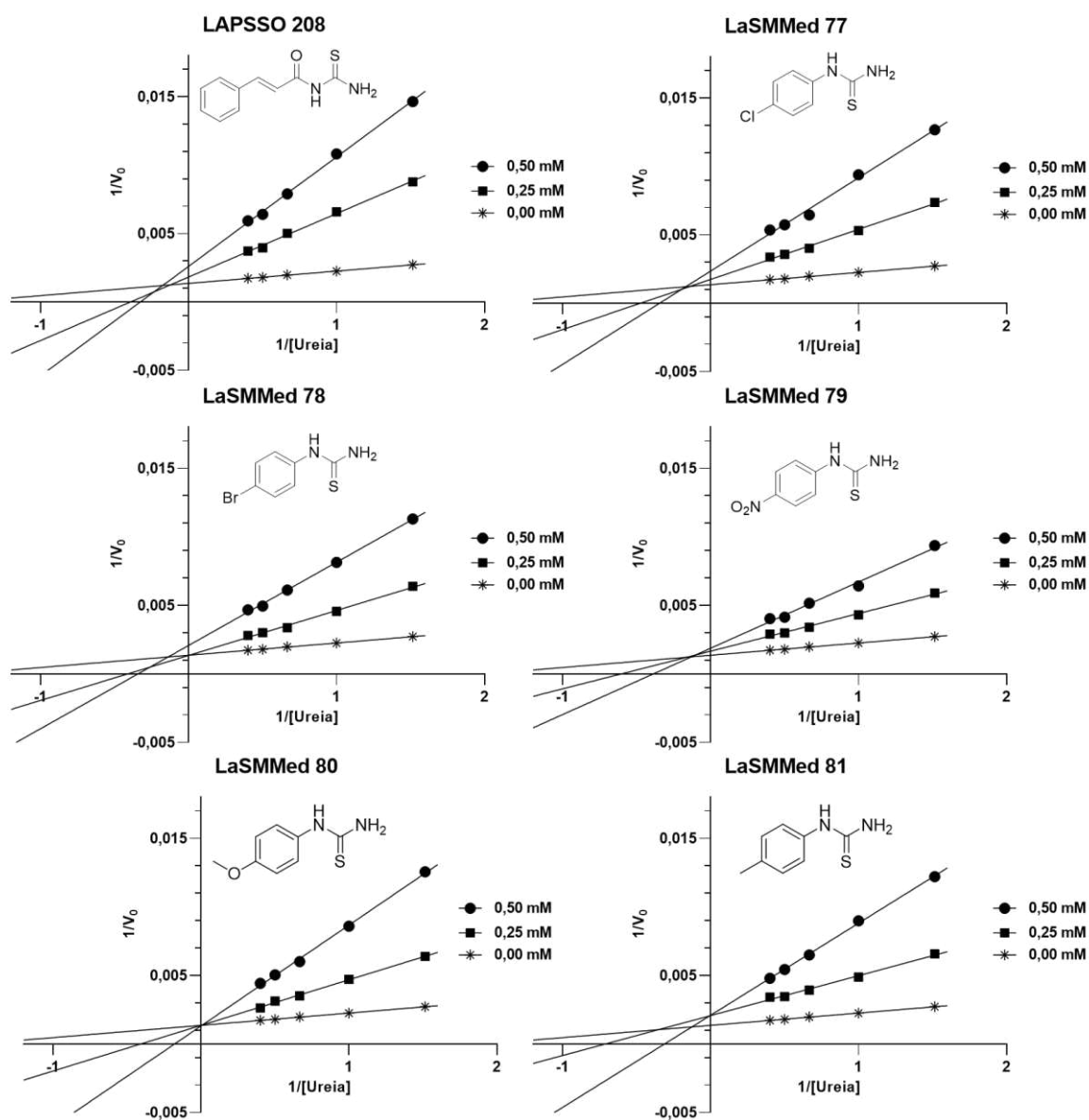


Fonte: o próprio autor

Para a determinação da cinética, foi realizado a recíproca da atividade enzimática ao longo do eixo Y e a recíproca da concentração de ureia no eixo X, gerando o gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 57). Então, o valor de  $K_i$  foi determinado por meio da inclinação da reta.

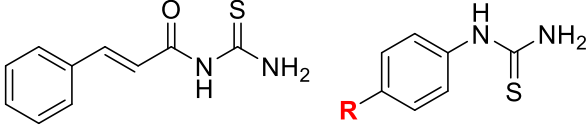
Os gráficos de Lineweaver-Burk obtidos indicam que, com exceção do **LaSMMed 80**, as substâncias apresentaram inibição do tipo mista frente à urease de *Canavalia ensiformis*, uma vez que as linhas dos inibidores interceptam a linha do controle (0,0 mM) em diferentes pontos do eixo Y no segundo quadrante do eixo X. O **LaSMMed 80** apresentou inibição do tipo competitiva, pois as linhas de inibição (0,25 e 0,50 mM) interceptam no mesmo ponto do controle no eixo Y, indicando que a  $V_{max}$  da reação não foi alterada, independente da concentração do inibidor.

**Figura 57** – Gráficos de Lineweaver-Burk para as substâncias líderes na presença a (●) 0,50 mM e (■) 0,25 mM de inibidor e na ausência (\*) deles



Fonte: o próprio autor

As substâncias apresentaram  $V_{max}$  que variaram de 732 a 741  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NH}_4^+$  por minuto por miligrama de proteína, enquanto os valores de  $K_m$  variaram de 0,65 a 0,67 mM (Tabela 9).

**Tabela 9** – Parâmetros cinéticos das substâncias líderes na CEU


	LAPSSO 208			LaSMMed 77-81		
Substâncias	R	$K_i$ (mM)	Alfa ( $\alpha$ )	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )	
LAPSSO 208	-	0,060	11,39	0,66	734,80	
LaSMMed 77	Cl	0,089	6,00	0,66	735,50	
LaSMMed 78	Br	0,11	9,75	0,67	741,30	
LaSMMed 79	NO <sub>2</sub>	0,13	6,13	0,65	733,50	
LaSMMed 80	OCH <sub>3</sub>	0,080	-	0,66	737,50	
LaSMMed 81	CH <sub>3</sub>	0,10	4,88	0,65	732,30	

Fonte: o próprio autor

Legenda:  $K_i$ : constante de inibição;  $K_m$ : constante de Michaelis;  $V_{max}$ : Velocidade máxima.

Dentre as substâncias líderes avaliadas, **LAPSSO 208** apresentou a maior afinidade pela urease, com valor de  $K_i$  de 0,06 mM, seguido por **LaSMMed 80** com  $K_i$  de 0,08 mM e **LaSMMed 77** com  $K_i$  de 0,09 mM. O parâmetro  $\alpha$  apresentou valor maior que 1 para todos os inibidores mistos (**LAPSSO 208**, **LaSMMed 77-79** e **LaSMMed 81**). Nesses casos, as linhas de interseção convergiram para a esquerda do eixo Y e acima do eixo X. Isso indica maior afinidade de ligação pela enzima livre, para formação do complexo enzima-inibidor, que pelo complexo enzima-substrato já formado. Quanto maior o valor de  $\alpha$ , maior a preferência de ligação pela enzima livre portanto, o modelo de inibição mista se aproxima mais da inibição do tipo competitiva (COPELAND, 2013). Dentre os inibidores mistos avaliados, **LAPSSO 208** foi a substância que apresentou o maior valor de  $\alpha$  (11,39) e, portanto, é a substância que tem mais afinidade pela formação do complexo enzima-inibidor.

Semelhante comportamento de afinidade foram observados por Li e colaboradores (2020), Imran et al. (2020), Rezaei et al. (2021) e Mamidala et al. (2021) (trabalhos descritos na introdução) para as substâncias mais promissoras em seus estudos. Neles, os autores descrevem que pelo menos uma de suas substâncias testadas são inibidores mistos, com maior afinidade pela enzima livre, para formação do complexo urease-inibidor que para a formação do complexo ternário urease-urea-inibidor ( $K_i' > K_i$ ).

Assim, com os resultados obtidos, em que a formação do complexo enzima-inibidor é favorecida ao invés do complexo enzima-substrato em um

mecanismo do tipo misto, este trabalho fica com a perspectiva de realizar a análise *in silico* da interação da enzima com o inibidor em um sítio alostérico.

Como visto no tópico de Mapeamento dos Sítios de Ligação das Ureases de *H. pylori* e *C. ensiformis*, a CEU possui dois sítios de ligação fortes em um local distante do sítio ativo (Figura 33). É provável que as substâncias estejam interagindo com o alvo em algum desses sítios e, assim, impedindo a formação do complexo urease-urea, diminuindo a atividade da enzima. Assim sendo, a investigação do modo de interação das substâncias **LAPSSO 208**, **LaSMMed 77-79** e **LaSMMed 81** por simulações computacionais, nesses sítios alostéricos identificados, seriam complementares e interessantes para uma melhor compreensão do mecanismo de inibição promovido por essas substâncias.

### 3.8 INIBIÇÃO ENZIMÁTICA E IC<sub>50</sub> EM EXTRATO BRUTO DE UREASE DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

Para complementar nosso estudo, buscamos avaliar como seria a atividade inibitória das substâncias selecionadas no processo de triagem virtual como inibidoras do extrato bruto da urease de *Cryptococcus neoformans* (CNU).

A extração da CNU ocorreu conforme metodologia descrita por Liu e colaboradores (2018) para a extração de urease de *H. pylori*, com modificações. De modo geral, após o crescimento das leveduras, foi realizada a concentração das proteínas por centrifugação, seguido de lavagem para retirar resquícios do meio de crescimento e então as leveduras foram ressuspensas em tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 8,0) e congeladas em ultra freezer (-80 °C). Posteriormente, foi realizada a lise das células por mistura vigorosa, com auxílio de pérolas de vidro e vórtex, e nova concentração em centrífuga para retirada dos detritos celulares. O sobrenadante foi purificado em coluna de Sephadex® G-50 para retirada de contaminantes e detritos celulares. Por fim, foi realizada a ativação da enzima por meio da adição de uma solução de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>, 100 mM) e cloreto de níquel (NiCl<sub>2</sub>, 100 µM), conforme proposto por Park e Hausinger (1995). O produto desta ativação corresponde ao extrato bruto de CNU utilizado para os ensaios enzimáticos.

Assim os testes de inibição %IE com CNU foram realizados pelo mesmo método descrito para CEU, conforme a reação do indofenol, e nas mesmas

proporções de mistura reacional, descrito na seção Ensaio enzimáticos (p. 144). Como parte das substâncias selecionadas na triagem virtual precipitaram no meio, quando realizado a %IE com CEU, o teste em CNU foi realizado apenas para as substâncias que foram solúveis anteriormente. O resultado está disposto na Tabela 10.

**Tabela 10** – Atividade inibitória das substâncias selecionadas na triagem virtual e tiourea (2,0 mM) frente ao extrato bruto de urease de *Cryptococcus neoformans*

Substância	R	%IE ± DP	Substância	R	%IE ± DP
<b>LaSMMed 69</b>	-	Na	<b>LAPSSO 212<sup>e</sup></b>	4-CH <sub>3</sub> Ph	2,61 ± 0,48
<b>LaSMMed 72</b>	-	Na	<b>LaSMMed 77<sup>c</sup></b>	Cl	92,81 ± 0,54
<b>LAPSSO 203<sup>a</sup></b>	CH <sub>3</sub>	80,77 ± 0,07	<b>LaSMMed 78<sup>c</sup></b>	Br	91,81 ± 0,18
<b>LAPSSO 206<sup>b</sup></b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	73,88 ± 0,88	<b>LaSMMed 79<sup>c</sup></b>	NO <sub>2</sub>	92,74 ± 0,18
<b>LAPSSO 208<sup>c</sup></b>	H	91,87 ± 0,49	<b>LaSMMed 80<sup>c</sup></b>	OCH <sub>3</sub>	93,24 ± 0,05
<b>LAPSSO 210</b>	4-OCH <sub>3</sub> Ph	Nd	<b>LaSMMed 81<sup>c</sup></b>	CH <sub>3</sub>	92,89 ± 0,18
<b>LAPSSO 211<sup>d</sup></b>	4-FPh	69,28 ± 1,94	<b>Tiourea<sup>c</sup></b>	-	92,19 ± 0,36

Fonte: o próprio autor

Legenda: %IE: porcentagem de inibição enzimática; DP: desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata; Na: não ativo; Nd: não determinado (insolúvel). Letras distintas indicam diferença significativa entre os valores pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ), calculado no Sisvar (FERREIRA, 2019)

Para CNU, podemos observar que o padrão de inibição das substâncias se manteve similar ao que observamos anteriormente para CEU. Os derivados de tiourea monossustituídos **LAPSSO 208** e **LaSMMed 77-81** foram os compostos mais ativos da nossa quimioteca, com uma excelente %IE, acima de 90%, comparável ao inibidor padrão, a tiourea. Os derivados do ácido cinâmico, **LAPSSO 203-211**, apresentaram uma melhora na atividade anti-ureolítica se comparados aos valores obtidos para CEU. Anteriormente a %IE foi na casa de 20-40%, enquanto para CNU as substâncias apresentaram valores na casa de 70-80%. Enquanto que para CEU, **LAPSSO 203** e **LAPSSO 206** apresentaram valores de inibição estatisticamente semelhantes em aproximadamente 35%, os mesmos derivados quando avaliados para CNU apresentam valores distintos, de 81% e 74%, respectivamente, indicando que substituintes com menor volume molecular são preferíveis para CNU. Este

mesmo indício pode ser verificado pelo fato de que as substâncias **LaSMMed 69** e **LaSMMed 72**, que são mais planares e possuem um maior volume estrutural, que haviam mostrado uma pequena atividade inibitória para CEU (17 e 4%, respectivamente), agora foram inativos para CNU. Além disso, **LAPSSO 212** também apresentou uma diminuição na inibição enzimática, de 13% em CEU para quase 3% em CNU.

Portanto, considerando os bons valores de inibição observados para as substâncias **LAPSSO 208** e **LaSMMed 77-81**, buscamos investigar a potência desses inibidores em diferentes concentrações por meio da determinação do  $IC_{50}$  (Tabela 11).

**Tabela 11** – Determinação do  $IC_{50}$  das substâncias líderes **LAPSSO 208** e **LaSMMed 77-81** frente ao extrato bruto de CNU

Substâncias	R	$IC_{50}$ (mM) $\pm$ DP
<b>LAPSSO 208</b> <sup>a</sup>	-	0,337 $\pm$ 0,006
<b>LaSMMed 77</b> <sup>a</sup>	Cl	0,342 $\pm$ 0,005
<b>LaSMMed 78</b> <sup>b</sup>	Br	0,358 $\pm$ 0,008
<b>LaSMMed 79</b> <sup>b</sup>	NO <sub>2</sub>	0,355 $\pm$ 0,003
<b>LaSMMed 80</b> <sup>a</sup>	OCH <sub>3</sub>	0,340 $\pm$ 0,006
<b>LaSMMed 81</b> <sup>c</sup>	CH <sub>3</sub>	0,378 $\pm$ 0,002
<b>Tioureia</b> <sup>d</sup>	-	0,265 $\pm$ 0,005

**Fonte:** o próprio autor

*Legenda:  $IC_{50}$ : metade da concentração inibitória máxima; DP: desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata. Letras distintas indicam diferença significativa entre os valores pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ), calculado no Sisvar (FERREIRA, 2019)*

Assim como observado para CEU, a **LAPSSO 208** foi a substância que apresentou a maior potência de inibição, com  $IC_{50}$  de 0,34 mM que, estatisticamente, não difere das ariltioureias **LaSMMed 77** e **80**. Diferentemente do que observamos para a CEU, em que um grupo retirador de elétrons forte como o nitro parecia favorecer a atividade enzimática das ariltioureias, para CNU, um grupo doador de elétrons forte como a metoxila (**LaSMMed 80**) parece favorecer mais a atividade

inibitória. O derivado metilado **LaSMMed 81** foi a substância que apresentou o menor potencial de inibição para CNU, entre as substâncias analisadas, com  $IC_{50}$  de 0,38 mM.

O resultado obtido para CNU corrobora com o padrão de inibição observado na cinética enzimática, em que as substâncias mais ativas foram **LAPSSO 208** ( $K_i = 0,06$  mM), **LaSMMed 80** ( $K_i = 0,08$  mM) e **77** ( $K_i = 0,09$  mM), respectivamente.

Outro fator interessante observado é que todas as substâncias apresentaram valores de  $IC_{50}$  entre 0,34 a 0,38 mM, enquanto o inibidor padrão apresentou  $IC_{50}$  de 0,26 mM. Isso confirma a hipótese levantada de que inibidores com um menor volume molecular sejam favorecidos no processo de inibição da urease de *Cryptococcus neoformans*.

### 3.9 ANÁLISE *IN SÍLICO* DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FARMACOCINÉTICAS DAS SUBSTÂNCIAS PROMISSORAS

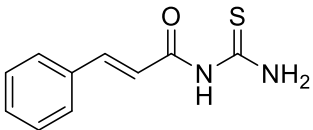
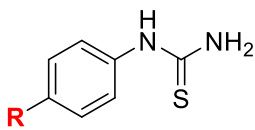
A fim de complementar este estudo, fez-se também a predição das propriedades físico-químicas relacionadas a fármaco-similaridade e farmacocinéticas das substâncias líderes, por meio da plataforma SwissADME (DAINA *et al.*, 2017). Nesta plataforma, foram realizados diversos cálculos que auxiliam no processo de análise de permeabilidade pelas membranas de novas substâncias, tais como a área de superfície polar topológica (TPSA), a quantidade de grupos doadores de ligação de hidrogênio (DLH), quantidade de grupos aceptores de ligação de hidrogênio (ALH) e número de ligações rotacionáveis (NLR), além de propriedades como coeficiente de lipofilicidade (cLogP) e solubilidade em água (LogS) (Tabela 12).

Este estudo permite a avaliação de propriedades físico-químicas que podem indicar se as substâncias bioativas apresentariam características fármaco-similares (*drug-likeness*) no que diz respeito a biodisponibilidade oral e, assim, priorizar candidatos que possuam esse perfil. Uma das maneiras mais utilizadas de verificação desses parâmetros é por meio das Regras de Lipinski, ou a regra dos 5, como também é conhecida. Essa clássica proposta sugere que, para que uma substância possua um bom perfil de solubilidade e permeabilidade das membranas, quando administrado por via oral, deve possuir características como: massa molar

(MM) menor ou igual a  $500 \text{ g mol}^{-1}$ , cLog P menor a 5, menos de 10 aceptores de ligação de hidrogênio (N+O) e menos de 5 grupos doadores de hidrogênio (NH+OH) (LIPINSKI *et al.*, 2012).

Como podemos verificar pelos dados apresentados na Tabela 12, todos os compostos possuem perfis similares a fármacos, pois apresentaram todas as características em acordo as Regras de Lipinski. Todas as substâncias apresentaram MM abaixo de  $500 \text{ g mol}^{-1}$ , entre  $166,24 - 231,11 \text{ g mol}^{-1}$ ; boa lipossolubilidade, pois quanto menor o valor de cLogP, mais hidrossolúvel é a substância e os compostos em questão apresentaram uma boa concordância de valores com cLogP entre  $0,88 - 2,14$ ; ALH também está dentro dos limites, entre  $0 - 2$ . Quanto ao número de átomos DLH não houve diferença entre as estruturas, permanecendo em consenso de 2 interações possíveis.

**Tabela 12** – Propriedades físico-químicas das substâncias selecionadas no processo de triagem virtual

							
	LAPSSO 208	LaSMMed 77-81					
Substância	R	MM ( $\text{g mol}^{-1}$ )	cLogP	ALH	DLH	NLR	TPSA (Å)
LAPSSO 208	-	206,26	1,63	1	2	4	87,21
LaSMMed 77	Cl	186,66	2,01	0	2	2	70,14
LaSMMed 78	Br	231,11	2,14	0	2	2	70,14
LaSMMed 79	NO <sub>2</sub>	197,21	0,88	2	2	3	115,96
LaSMMed 80	OCH <sub>3</sub>	182,24	1,32	1	2	3	79,37
LaSMMed 81	CH <sub>3</sub>	166,24	1,60	0	2	2	70,14

Fonte: o próprio autor

Legenda: MM: Massa molecular; cLogP: consenso do coeficiente de partição óleo/água; ALH: número de aceptores de interação de hidrogênio; DLH: Número de doadores de interação de hidrogênio; NLR: Número de ligações rotacionáveis; TPSA: área de superfície polar; LogS: coeficiente de solubilidade em água.

Além dessas características, extensões as regras de Lipinski foram desenvolvidas ao longo dos anos e, entre as mais significativas está a extensão de Veber, que sugere que uma molécula terá melhor biodisponibilidade oral se apresentar uma área superficial topológica (TPSA) não superior a  $140 \text{ Å}$ , soma de ALH e DLH menor ou igual a 12 e valor menor ou igual a 10 ligações rotacionáveis (NLR) em sua estrutura, independente da MM dos compostos (VEBER *et al.*, 2002).

O TPSA está relacionado a uma previsão de transporte da substância

e, em geral, se correlaciona muito bem com a absorção intestinal humana (BARRET, 2018). As substâncias apresentaram valor de TPSA entre 70,14 e 115,96 Å, indicando boa permeabilidade das moléculas pelas membranas plasmáticas celulares. Além disso, o número de ligações rotacionáveis, que avalia a flexibilidade dos ligantes e está relacionado ao custo entrópico para mudança de conformação, também influencia na taxa de permeação do composto pelas membranas. Os derivados de tioureia apresentam NLR entre 2 e 4, de acordo com as regras de extensão, portanto, boa permeabilidade entre as membranas celulares. Para nenhuma substância observou-se um número maior que 12 para a soma de ALH e DLH.

Outros parâmetros farmacocinéticos relacionados a absorção como a absorção no trato gastrointestinal (TGI) e substrato da glicoproteína-P (Pg-p); parâmetros de distribuição como permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) e parâmetros de metabolismo como inibição de enzimas pertencentes a superfamília do citocromo P-oxidase (CYP450) também foram preditos para as substâncias e estão dispostos na Tabela 13.

**Tabela 13** – Parâmetros preditos de farmacocinética para as substâncias líderes

Substâncias	Absorção TGI	Permeação BHE	Substrato Pg-P	Inibição CYP450				
				1A2	2C19	2C9	2D6	3A4
LAPSSO 208	Alta	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
LaSMMed 77	Alta	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não
LaSMMed 78	Alta	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não
LaSMMed 79	Alta	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
LaSMMed 80	Alta	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
LaSMMed 81	Alta	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Não

Fonte: o próprio autor

Legenda: Absorção TGI: Absorção no trato gastrointestinal; Permeação BHE: capacidade de permear a barreira hematoencefálica; Substrato Pg-P: interação com a glicoproteína P; Inibição CYP450: inibição da família citocromo P oxidase. Destaque em cinza para as substâncias que apresentaram os melhores perfis farmacocinéticos preditos.

Todas as substâncias selecionadas possuem alta probabilidade de serem absorvidas pelo trato gastrointestinal e apenas a **LAPSSO 208** e **LaSMMed 79** e **80**, não são capazes de permear a BHE. No nosso caso, isso não chega a ser um problema, visto que em casos de meningite criptocócica, o desejável é que o medicamento consiga permear o sistema nervoso central (SNC) para que o tratamento seja mais efetivo (SPADARI *et al.*, 2020). Esse fato pode ser reforçado pelo fato de que os fármacos utilizados para o tratamento sistêmico da criptococose,

fluconozol (**8**) e flucitosina (**9**), conseguem permear a BHE. Apenas a anfotericina B (**7**), devido a sua alta MM, tem uma baixa permeabilidade pelo SNC. Assim sendo, independente da predição aparentemente negativa de permeação da BHE, as substâncias ainda poderiam auxiliar no tratamento da criptococose.

Transportadores de efluxo como a glicoproteína-P, desempenham um papel fundamental na absorção e disposição do fármaco. No intestino, a glicoproteína-P atua como uma bomba de efluxo transmembrana, bombeando seus substratos de volta para o lúmen, diminuindo sua absorção, desta forma fármacos que induzem a glicoproteína-P, podem reduzir a biodisponibilidade de alguns outros fármacos (FINCH; PILLANS, 2014). Dentre as substâncias analisadas nenhuma apresentou probabilidade de ser substrato da Pg-p.

Com relação a interação das substâncias com o citocromo P450 (CYP450), observou-se que algumas das substâncias interagem com pelo menos uma isoforma desta família. A CYP450 é uma superfamília de isoenzimas responsáveis pela ativação, desativação e excreção de xenobióticos (TESTA; KRÄMER, 2007). Essas enzimas fazem a biotransformação metabólica de diversos fármacos, o que resulta muitas vezes em interações medicamentosas indesejáveis e diminuição da depuração dos fármacos. Assim, um regime terapêutico com a inclusão de indutores da CYP450, quando administrados concomitantemente com outro medicamento, resulta na redução da efetividade de um dos fármacos; quando inibidores da CYP450 geram como consequência o aumento da toxicidade do medicamento afetado pela interação e, no caso de o medicamento ser um pró-fármaco e necessitar da atividade da CYP, provavelmente sua efetividade irá diminuir (DOLIGALSKI *et al.*, 2012). A plataforma SwissADME prevê a interação dos compostos com cinco isoformas da CYP450, a CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4. **LAPSSO 208** e **LaSMMed 81** podem ser inibidoras da isoforma 1A2, enquanto que **LaSMMed 77** e **78** podem ser inibidoras desta mesma isoforma e da 2C9.

Portanto, dentre as substâncias analisadas, **LaSMMed 79** e **80** (destacadas na Tabela 13), são as substâncias que apresentam os melhores parâmetros farmacocinéticos, uma vez que possuem alta absorção no TGI, não permeiam a BHE, não atuam como substrato da Gp-P e não são inibidoras de nenhuma das isoformas da CYP450 preditas.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 PROCEDIMENTOS GERAIS

Os solventes e reagentes, para fins sintéticos, foram tratados, destilados e secos, conforme necessidades requeridas nas metodologias adotadas e de acordo com os processos descritos por Armarego e Chai (ARMAREGO; CHAI, 2003). O processo de monitoramento das reações foi realizado através da cromatografia em camada delgada (CCD), em cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F-254 com espessura de 0,25 mm com indicador para UV (254 nm), marca Merck. Os eluentes foram preparados volume a volume (v/v) e a revelação das substâncias em CCD foi realizada em lâmpada de UV (254-366 nm) ou em solução etanólica de ninhidrina a 2% (p/V) ou em vanilina sulfúrica.

### 4.2 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Bruker modelo Avance III, operando a 400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ , equipado com sondas multinucleares de 5 mm. Estes espectros foram registrados utilizando solventes deuterados como clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ , 7,26 ppm) ou dimetilsulfóxido ( $\text{DMSO-}d_6$ , 2,50 ppm). O software utilizado para o processamento dos espectros de RMN foi o MestReNova (v14.1.2). As áreas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica, e suas multiplicidades foram descritas como: simpleto (s), duplete (d), tripleto (t), quarteto (q), duplo duplete (dd), duplo duplo-duplete (ddd) e multiplete (m). As constantes de acoplamento ( $J$ ) foram relatadas em Hz.

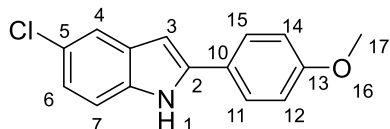
### 4.3 SÍNTESE DOS INDÓIS, ARILTIOUREIAS E DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO PRESENTES NA QUIMIOTECA DO LASMMED

#### 4.3.1 Procedimento Geral para a Síntese dos Derivados Indólicos (**LaSMMed 34-36**,

74)

A síntese dos derivados indólicos seguiu o procedimento experimental já aplicado em nosso grupo de pesquisa, com modificações (SILVA, 2020). De modo geral, em um balão de fundo redondo de 50 mL, foram adicionados o cloridrato de fenilhidrazina correspondente (3,0 mmol, 1,1 eq), a acetofenona correspondente (1,0 eq) e cerca de 10-12 mL de tolueno. A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética e refluxo (110 – 112 °C) por cerca de 3 min e, em seguida, adicionou-se o ácido p-toluenosulfônico (5,0 eq). A reação permaneceu sob constante agitação e refluxo por um período que variou de 4 a 24h, sendo acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), até o consumo total do reagente limitante. Por fim, o tolueno foi evaporado à pressão reduzida, fornecendo produtos como sólidos impuros. Esses foram devidamente purificados por recristalização em metanol, obtendo-se os indóis **LaSMMed 34-36, 74** em rendimentos que variaram de 23 a 49%.

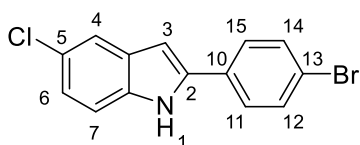
**2-(4-metoxifenil)-5-cloro-1H-indol (LaSMMed 34):** Sólido bege perolado; 38%. Pf:



LaSMMed 34

239-241 °C. **Lit:** 236-238 °C (BELLEZZA *et al.*, 2019).  
 RMN de  $^1\text{H}$  [DMSO- $d_6$ , 400 MHz]  $\delta$ : 11,64 (s, 1H), 7,77 (d,  $J = 8,8$  Hz, 2H), 7,50 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H), 7,37 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H), 7,04 (td,  $J = 8,7, 2,3$  Hz, 3H), 6,73 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H), 3,79 (s, 3H). RMN de  $^{13}\text{C}$  [DMSO- $d_6$ , 100 MHz]  $\delta$ : 159,56, 139,97, 135,84, 130,48, 127,04, 124,77, 124,24, 121,36, 119,19, 114,88, 112,97, 97,55, 55,67. **Lit:** RMN de  $^1\text{H}$  [DMSO- $d_6$ , 300 MHz]  $\delta$ : 8,33 (br, 1H), 7,86–7,80 (m, 2H), 7,51 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H), 7,39 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H), 7,05–6,99 (m, 3H), 6,74 (d,  $J = 0,7$  Hz, 1H), 3,80 (s, 3H). RMN de  $^{13}\text{C}$  [DMSO- $d_6$ , 75 MHz]  $\delta$ : 159,03, 139,65, 135,54, 130,00, 126,62, 124,48, 123,61, 120,70, 118,59, 114,35, 112,59, 96,87, 55,19. (BELLEZZA *et al.*, 2019)

**2-(4-bromofenil)-5-cloro-1H-indol (LaSMMed 35):** Cristal castanho; 23%. Pf: 206-

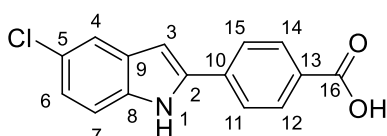


LaSMMed 35

208 °C. **Lit:** 206-207 °C (HOMES *et al.*, 2006). RMN de  $^1\text{H}$  [DMSO- $d_6$ , 400 MHz]  $\delta$ : 11,83 (s, 1H), 7,80 (d,  $J = 8,7$  Hz, 2H), 7,66 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 7,57 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H), 7,40 (d,  $J = 8,7$  Hz, 1H), 7,11 (dd,  $J = 8,7, 2,2$  Hz, 1H), 6,92 (d,

$J = 2,3$  Hz, 1H). RMN de  $^{13}\text{C}$  [DMSO- $d_6$ , 100 MHz]  $\delta$ : 138,15, 135,71, 131,96, 130,99, 129,72, 127,15, 124,11, 121,88, 120,91, 119,29, 112,93, 99,09. **Lit:** RMN de  $^1\text{H}$  [DMSO- $d_6$ , 400 MHz]  $\delta$ : 6,91 (s, 1H, H3), 7,11 (dd, 1H,  $J_{6,7} = 8,6$ ,  $J_{6,4} = 2,0$ , H6), 7,40 (d, 1H,  $J_{7,6} = 8,6$ , H7), 7,57 (d, 1H,  $J_{4,6} = 1,9$ , H4), 7,66 (d, 2H,  $J = 8,5$ , 2ArH), 7,80 (d, 2H,  $J = 8,5$ , 2ArH), 11,79 (s, 1H, NH). RMN de  $^{13}\text{C}$  [DMSO- $d_6$ , 100 MHz]  $\delta$ : 99,0, 112,8, 119,2, 120,8, 121,8, 124,1, 127,1, 129,7, 130,9, 131,9, 135,7, 138,1. (HOMES *et al.*, 2006)

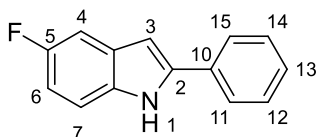
**Ácido 4-(5-cloro-1H-indol-2-il)benzóico (LaSMMed 36):** Sólido amarelo; 23%. Pf:



**LaSMMed 36**

339-340 °C. RMN de  $^1\text{H}$  [DMSO- $d_6$ , 400 MHz]  $\delta$ : 13,02 (s, 1H), 11,92 (s, 1H), 8,14 – 7,87 (m, 4H), 7,60 (s, 1H), 7,43 (d,  $J = 8,7$  Hz, 1H), 7,13 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 7,03 (s, 1H). RMN de  $^{13}\text{C}$  [DMSO- $d_6$ , 100 MHz]  $\delta$ : 166,99, 138,09, 135,94, 135,72, 130,04, 129,58, 125,05, 124,17, 122,24, 119,49, 113,04, 100,19.

**5-fluoro-2-phenyl-1H-indole (LaSMMed 74):** Sólido lilás acinzentado; 49%. Pf: 178-



**LaSMMed 74**

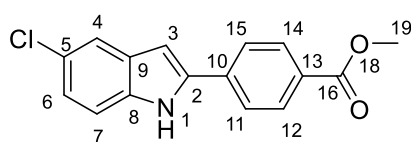
180 °C. **Lit:** 178-179 °C (SAKAI *et al.*, 2008). RMN de  $^1\text{H}$  [ $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz]  $\delta$ : 8,33 (s, 1H), 7,65 (dd,  $J = 8,4$ , 1,3 Hz, 2H), 7,45 (t,  $J = 7,7$  Hz, 2H), 7,39 – 7,26 (m, 3H), 6,94 (td,  $J = 9,0$ , 2,6 Hz, 1H), 6,79 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H). RMN de  $^{13}\text{C}$  [ $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz]  $\delta$ : 158,32 (d,  $J = 234,8$  Hz), 139,80, 133,45, 132,16, 129,8, 129,22, 128,17, 125,34, 111,61 (d,  $J = 9,9$  Hz), 110,76 (d,  $J = 26,0$  Hz), 105,52 (d,  $J = 23,8$  Hz), 100,19 (d,  $J = 4,8$  Hz). **Lit:** RMN de  $^1\text{H}$  [ $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz]  $\delta$ : 8,33 (br, 1H; NH), 7,65 (dd,  $J = 1,5$ , 3,5 Hz, 2H; ArH), 7,45 (t,  $J = 7,5$  Hz, 1H; ArH), 7,26–7,37 (m, 2H; ArH), 6,94 (dt,  $J = 2,5$ , 9,5 Hz, 1H; ArH), 6,79 (m, 1H; ArH). RMN de  $^{13}\text{C}$  [ $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz]  $\delta$ : 158,2 (d,  $J = 933,5$  Hz; CF), 139,7 (C), 133,3 (C), 132,0 (C), 129,6 (d,  $J = 42,0$  Hz; C), 129,1 (CH), 128,0 (CH), 125,2 (CH), 111,4 (d,  $J = 38,0$  Hz; C), 110,6 (d,  $J = 105,0$  Hz; CH), 105,4 (d,  $J = 93,5$  Hz; CH), 100,1 (d,  $J = 19,0$  Hz; CH). (MAIZURU *et al.*, 2011)

#### 4.3.1.1 Procedimento para a síntese do éster indólico **LaSMMed 34**

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, acondicionado em um

banho de gelo, foram adicionados 10 mL de metanol. Em seguida, sob agitação magnética, o cloreto de tionila ( $\text{SOCl}_2 - 5 \text{ eq.}$ ) foi gotejado lentamente sobre o metanol, mantendo-se a solução em banho de gelo durante toda a adição. Na sequência, a mistura reacional foi arrefecida a temperatura ambiente e, em uma única porção, fez-se a adição do ácido indólico **LaSMMed 36** (2,0 mmol, 1,0 eq.). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética constante à temperatura ambiente por cerca de 24h, até o término da reação, confirmado por CCD. Então, o solvente foi evaporado à pressão reduzida, fornecendo um sólido branco amorfo com 70% de rendimento.

**Metil 4-(5-cloro-1H-indol-2-il)benzoato (LaSMMed 37):** Sólido branco; 70%. Pf: 229-



**LaSMMed 37**

231 °C. RMN de  $^1\text{H}$  [DMSO- $d_6$ , 400 MHz]  $\delta$ : 11,94 (s, 1H), 8,02 (q,  $J = 8,6 \text{ Hz}$ , 4H), 7,61 (s, 1H), 7,44 (d,  $J = 8,7 \text{ Hz}$ , 1H), 7,14 (dd,  $J = 8,7, 2,0 \text{ Hz}$ , 1H), 7,05 (s, 1H), 3,88 (s, 3H). RMN de  $^{13}\text{C}$  [DMSO- $d_6$ , 100 MHz]  $\delta$ :

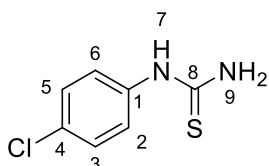
166,35, 138,34, 136,55, 136,45, 130,34, 130,01, 128,80, 125,60, 124,67, 122,81, 119,99, 113,53, 100,87, 52,61. **Lit:** (HAN *et al.*, 2018)

#### 4.3.2 Procedimento Geral para a Síntese das Ariltioureias (**LaSMMed 77-81**)

A síntese das ariltioureias (**LaSMMed 77-81**) seguiu o procedimento descrito por Kataria e colaboradores, com modificações (KATARIA; KHATKAR, 2019). Em suma, em um balão de fundo redondo de 25 mL, adicionou-se a anilina corresponde (16 mmol, 1,0 eq.), seguido da adição gota a gota de 5 mL de ácido clorídrico concentrado, sob constante agitação. A reação permaneceu a temperatura ambiente e agitação magnética por cerca de 5-10 min, até mudança do aspecto do meio reacional, quando então fez-se a adição de uma solução de tiocianato de amônio ( $\text{NH}_4\text{SCN} - 1,5 \text{ eq.}$ ), previamente dissolvido em 6 mL de água destilada. A mistura reacional foi deixada sob agitação a temperatura ambiente por mais 15 min, até mudança visual e, em seguida, a reação foi colocada sob aquecimento (70-80 °C). Após cerca de 30 min, observou-se a dissolução do sólido presente no meio e, após mais algumas horas, a mudança de coloração do meio. Por fim, a mistura reacional permaneceu sob agitação e aquecimento por 24 – 26h. A reação foi vertida em um béquer contendo gelo picado, agitada, e o precipitado formado foi filtrado a vácuo. A

purificação dos produtos ocorreu por meio de lavagem com metanol (2 x 10 mL), obtendo-se as ariltioureas **LaSMMed 77-81** em rendimentos que variaram de 38 a 48%.

**1-(4-clorofenil)tiourea (LaSMMed 77):** Cristal branco; 35%. Pf: 171-172 °C. Lit: 172 °C (HAY *et al.*, 2010) . RMN de  $^1\text{H}$  [DMSO- $d_6$ , 400 MHz]  $\delta$ : 9,76



**LaSMMed 77**

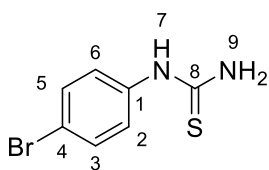
(s, 1H), 7,49 – 7,42 (m, 2H), 7,40 – 7,34 (m, 2H), 3,36 (s, 1H).

RMN de  $^{13}\text{C}$  [DMSO- $d_6$ , 100 MHz]  $\delta$ : 181,63, 138,67, 128,94,

128,55, 125,03. Lit: RMN de  $^1\text{H}$  [DMSO- $d_6$ , 300 MHz]  $\delta$ : 7,37–

7,51 (m, 6 H), 9,78 (s, 1 H). RMN de  $^{13}\text{C}$  [DMSO- $d_6$ , 75 MHz]  $\delta$ : 124,6, 128,1, 128,5, 138,2, 181,2. (KATRITZKY *et al.*, 2004)

**1-(4-Bromofenil)tiourea (LaSMMed 78):** Cristal amarelo; 50%. Pf: 172-173 °C. Lit:



**LaSMMed 78**

171 °C (GUPTA *et al.*, 2010). RMN de  $^1\text{H}$  [DMSO- $d_6$ , 400 MHz]

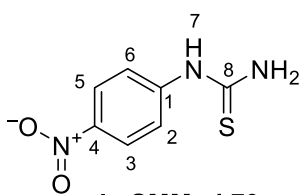
$\delta$ : 9,77 (s, 1H), 7,52 – 7,46 (m, 2H), 7,44 – 7,38 (m, 2H), 3,41 (s,

1H). RMN de  $^{13}\text{C}$  [DMSO- $d_6$ , 100 MHz]  $\delta$ : 181,58, 139,11, 131,84,

125,32, 116,66. Lit: RMN de  $^1\text{H}$  [DMSO- $d_6$ , 300 MHz]  $\delta$ : 6,05 (s,

2 H), 7,14 (d, J = 10,2, 2 H), 7,21 (d, J = 10,2, 2 H), 7,62 (s, 1 H). RMN de  $^{13}\text{C}$  [DMSO- $d_6$ , 75 MHz]  $\delta$ : 116,4, 124,7, 131,3, 138,7, 181,2. (HERR *et al.*, 2000)

**1-(4-Nitrofenil)tiourea (LaSMMed 79):** Sólido castanho; 38%. Pf: 197-198 °C. Lit:



**LaSMMed 79**

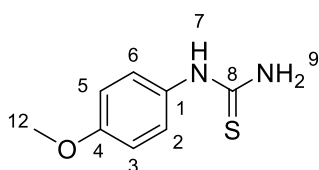
198 °C (SAHU *et al.*, 2010). RMN de  $^1\text{H}$  [DMSO- $d_6$ , 400 MHz]

$\delta$ : 10,29 (s, 1H), 8,21 – 8,15 (m, 2H), 7,88 – 7,81 (m, 2H), 3,37

(s, 2H). RMN de  $^{13}\text{C}$  [DMSO- $d_6$ , 100 MHz]  $\delta$ : 181,29, 146,07,

142,18, 124,50, 120,87.

**1-(4-metoxifenil)tiourea (LaSMMed 80):** Sólido cinza; 48%. Pf: 211-212 °C. Lit: 209-



**LaSMMed 80**

210 °C (KATRITZKY *et al.*, 2004). RMN de  $^1\text{H}$  [DMSO- $d_6$ , 400

MHz]  $\delta$ : 9,48 (s, 1H), 7,22 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 6,93 – 6,87 (m,

2H), 3,73 (s, 3H), 3,36 (s, 1H). RMN de  $^{13}\text{C}$  [DMSO- $d_6$ , 100

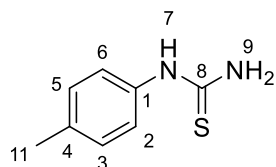
MHz]  $\delta$ : 181,12, 156,59, 131,73, 125,57, 113,99, 55,25. Lit:

RMN de  $^1\text{H}$  [DMSO- $d_6$ , 300 MHz]  $\delta$ : 3,74 (s, 3 H), 6,90 (d, J=

8,8 Hz, 2 H), 7,23 (d, J= 8,8 Hz, 2H), 7,24–7,62 (m, 2H, NH<sub>2</sub>), 9,48 (s, 1 H, NH). RMN

de  $^{13}\text{C}$  [DMSO- $d_6$ , 75 MHz]  $\delta$ : 55,2, 114,0, 125,6, 131,7, 156,6, 181,1. (KATRITZKY *et al.*, 2004)

**1-(p-tolil)tioureia (LaSMMed 81):** Sólido branco; 46%. Pf: 189-191 °C. Lit: 190 °C



**LaSMMed 81**

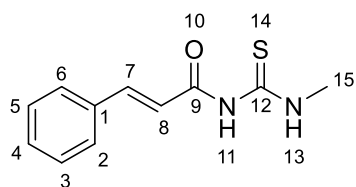
(SAHU *et al.*, 2010). RMN de  $^1\text{H}$  [DMSO- $d_6$ , 400 MHz]  $\delta$ : 9,58 (s, 1H), 7,23 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,13 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 3,35 (s, 1H), 2,26 (s, 3H). RMN de  $^{13}\text{C}$  [DMSO- $d_6$ , 100 MHz]  $\delta$ : 180,92, 136,41, 133,72, 129,20, 123,36, 20,51. Lit: RMN de  $^1\text{H}$  [DMSO- $d_6$ , 300 MHz]  $\delta$ : 2,37 (s, 3 H), 6,04 (s, 2 H), 7,12 (d, J = 10,1, 2 H), 7,24 (d, J = 10,1, 2 H), 7,81 (s, 1 H). RMN de  $^{13}\text{C}$  [DMSO- $d_6$ , 75 MHz]  $\delta$ : 20,5, 123,3, 129,2, 133,6, 136,6, 181,1. (HERR *et al.*, 2000)

#### 4.3.3 Procedimento Geral para a Síntese dos Derivados do Ácido Cinâmico (**LAPSSO 203-212**)

As substâncias derivadas do ácido cinâmico, que compõem a quimioteca do LaSMMed, foram sintetizadas por nosso grupo de pesquisa conforme metodologia descrita por Brito *et al.*, (2015), com modificações. Em um balão de fundo redondo de 500 mL, uma solução de ácido cinâmico (100 mmol), dissolvido em 250 mL de diclorometano, foram adicionados 1,0 mL de dimetilformamida e 125 mmol de  $\text{SOCl}_2$ . A mistura reacional foi mantida sob refluxo e agitação por 3 horas. Em seguida, o solvente foi evaporado a pressão reduzida, obtendo-se um como produto o cloreto de cinamoíla, um sólido alaranjado. Na sequência, 200 mL de acetona, previamente seca em peneira molecular, foi adicionada ao mesmo balão reacional de formação do cloreto, e 100 mmol de  $\text{NH}_4\text{SCN}$  (1,0 eq. em relação ao ácido cinâmico) foi adicionado ao meio reacional. A reação permaneceu sob agitação e refluxo por 15 min obtendo-se o tiocianato de cinamoíla *in situ*. Em seguida, uma alíquota do tiocianato obtido (10 mL) foi dissolvido em 10 mL de acetona seca e, sob agitação e a temperatura ambiente, foi adicionada, lentamente, a amina correspondente (10 mmol, 1,0 eq.) para a formação dos derivados **LAPSSO 203-212**. A mistura reacional foi mantida a temperatura ambiente e sob agitação por cerca de 40 minutos. Em seguida, a mistura reacional foi vertida em gelo picado e o precipitado formado foi filtrado a vácuo. Os produtos obtidos (**LAPSSO 203-212**) foram recristalizados em etanol, com

rendimentos de 12 a 30%.

**N-(metilcarbamoil)cinamamida (LAPSSO 203):** Sólido amarelo; 19%; Pf: 215-



**LAPSSO 203**

216 **Lit:** 210-211 °C (KRISTIAN *et al.*, 1979). RMN de  $^1\text{H}$

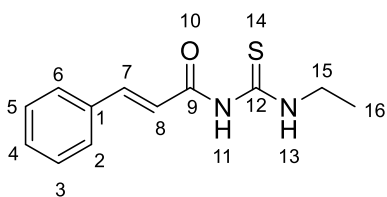
[ $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz]  $\delta$ : 10,68 (s, 1H), 9,00 (s, 1H), 7,77 (d, J = 15,7 Hz, 1H), 7,59 – 7,51 (m, 2H), 7,47 – 7,37 (m, 3H),

6,46 (d, J = 15,7 Hz, 1H), 3,24 (d, J = 4,8 Hz, 3H). **Lit:** RMN

de  $^1\text{H}$  [ $\text{CDCl}_3$ , 80 MHz]  $\delta$ : 11,12 e 10,75 (s, -NH), 7,75 e

6,95 (d, -CH=CH-, J = 16 Hz), 7,37 (m,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 3,12 (d,  $\text{CH}_3$ , J = 4 Hz) (KRISTIAN *et al.*, 1979).

**N-(etilcarbamoil)cinamamida (LAPSSO 204):** Sólido branco; 14%. Pf: 154-155



**LAPSSO 204**

°C. RMN de  $^1\text{H}$  [ $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz]  $\delta$ : 10,84 (s, 1H), 9,55

(s, 1H), 7,79 (d, J = 15,6 Hz, 1H), 7,61 – 7,54 (m, 2H),

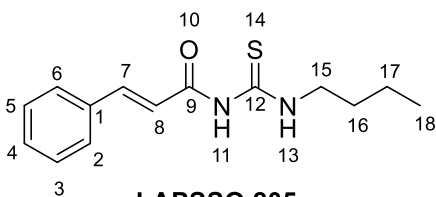
7,43 (dd, J = 5,2, 2,0 Hz, 3H), 6,62 (d, J = 15,5 Hz, 1H),

3,73 (td, J = 7,2, 5,4 Hz, 2H), 1,75 – 1,66 (m, 2H), 1,51 –

1,41 (m, 2H), 0,98 (t, J = 7,3 Hz, 3H). RMN de  $^{13}\text{C}$

[ $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz]  $\delta$ : 179,83, 165,93, 145,95, 133,85, 131,00, 129,06, 128,49, 118,62, 40,55, 13,57.

**N-(butilcarbamoil)cinamamida (LAPSSO 205):** Sólido marrom; 26%; Pf: 144-145



**LAPSSO 205**

°C **Lit:** 120 °C (HAFEZ *et al.*, 1987). RMN de  $^1\text{H}$

[ $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz]  $\delta$ : 10,77 (s, 1H), 9,58 (s, 1H), 7,77

(d, J = 15,5 Hz, 1H), 7,55 (qd, J = 5,2, 3,1 Hz, 2H),

7,41 (dd, J = 5,1, 2,0 Hz, 3H), 6,61 (d, J = 15,5 Hz,

1H), 3,74 (qd, J = 7,3, 5,4 Hz, 2H), 1,32 (t, J = 7,3 Hz,

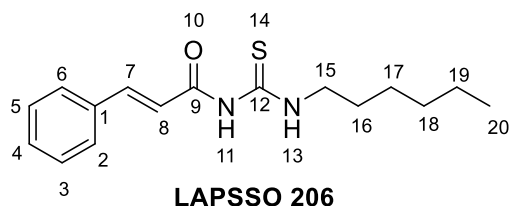
3H). RMN de  $^{13}\text{C}$  [ $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz]  $\delta$ : 179,90, 165,94, 145,97, 133,85, 131,00, 129,06,

128,49, 118,59, 45,47, 30,30, 20,17, 13,73. **Lit:** RMN de  $^1\text{H}$  [ $\text{DMSO-d}_6$ , 90 MHz]  $\delta$ : 0,9

(d, 6H, 2 $\text{CH}_3$ ), 1,5 (m, 3H, CH e  $\text{CH}_2$ ), 3,65 (m, 2H, CH); 7,15 (d, 1 H, CH), 7,4-7,95

(m, 6H,  $\text{C}_6\text{H}$  e CH), 10,9 (s, 1H, NH), 11,3 (s, 1H, NH) (HAFEZ *et al.*, 1987).

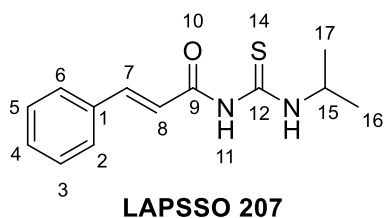
**N-(hexilcarbamoioil)cinamamida (LAPSSO 206):** Sólido amarelo claro; 12%. Pf: 77



°C. RMN de  $^1\text{H}$  [ $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz]  $\delta$ : 10,81 (t, J = 5,4 Hz, 1H), 9,49 (s, 1H), 7,77 (d, J = 15,5 Hz, 1H), 7,55 (qd, J = 5,3, 3,2 Hz, 2H), 7,41 (dd, J = 5,1, 2,0 Hz, 3H), 6,60 (d, J = 15,5 Hz, 1H),

3,69 (td, J = 7,2, 5,4 Hz, 2H), 1,70 (p, J = 7,9, 7,5 Hz, 2H), 1,46 – 1,36 (m, 2H), 1,36 – 1,26 (m, 4H), 0,95 – 0,85 (m, 3H). RMN de  $^{13}\text{C}$  [ $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz]  $\delta$ : 179,87, 165,90, 145,96, 133,85, 131,00, 129,06, 128,49, 118,60, 45,79, 31,41, 28,22, 26,64, 22,52, 14,01.

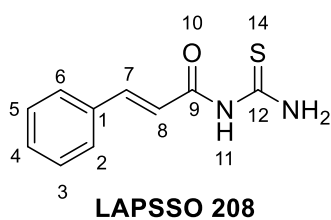
**N-(isopropilcarbamoioil)cinamamida (LAPSSO 207):** Sólido bege; 23%. Pf: 99-



100 °C. RMN de  $^1\text{H}$  [ $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz]  $\delta$ : 10,67 (d, J = 6,2 Hz, 1H), 9,13 (s, 1H), 7,76 (d, J = 15,7 Hz, 1H), 7,59 – 7,50 (m, 2H), 7,42 (dd, J = 5,2, 2,0 Hz, 3H), 6,52 (d, J = 15,7 Hz, 1H), 4,55 (ddt, J = 13,1, 8,1, 6,6 Hz, 1H), 1,33 (d, J = 6,6 Hz, 6H). RMN de  $^{13}\text{C}$  [ $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz]  $\delta$ :

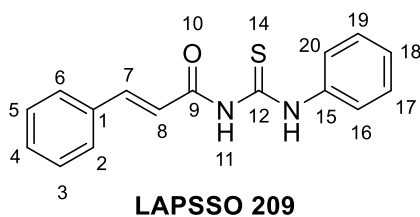
178,56, 165,66, 146,00, 133,76, 131,06, 129,08, 128,47, 118,54, 47,74, 21,75.

**N-carbamoioilcinamamida (LAPSSO 208):** Sólido branco; 24%. Pf: 217-218 °C.



RMN de  $^1\text{H}$  [ $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz]  $\delta$ : 10,04 (s, 1H), 8,73 (s, 1H), 7,81 (d, J = 15,5 Hz, 1H), 7,59 – 7,51 (m, 2H), 7,48 – 7,39 (m, 3H), 6,41 (d, J = 15,5 Hz, 1H). **Lit:** (HASSAN *et al.*, 2010)

**N-(fenilcarbamoioil)cinamamida (LAPSSO 209):** Sólido amarelo; 20%; Pf. 163-164

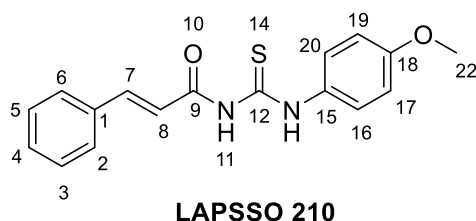


°C **Lit:** 164 °C (XIAO *et al.*, 2007). RMN de  $^1\text{H}$  [ $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz]  $\delta$ : 12,65 (s, 1H, NH), 9,46 (s, 1H, NH), 7,83 (d, J = 15,7 Hz, 1H), 7,72 – 7,66 (m, 2H), 7,54 (dt, J = 6,2, 1,8 Hz, 2H), 7,46 – 7,36 (m, 5H), 7,32 – 7,26 (m, 1H), 6,61 (d, J = 15,5 Hz, 1H). RMN de  $^{13}\text{C}$  [ $\text{CDCl}_3$ ,

100 MHz]  $\delta$ : 178,90, 166,06, 146,77, 137,73, 133,82, 131,31, 129,21, 129,02, 128,70,

127,04, 124,42, 118,44. **Lit:** RMN de  $^1\text{H}$  [DMSO- $d_6$ , 90 MHz]  $\delta$ : 6,8 (d, 1H, CH), 7–3 - 8,1 (m, 11 H, CH), 9,7 (s, 1H, NH), 12,85 (s, 1H, NH) (HAFEZ *et al.*, 1987).

**N-(4-metoxifenil)carbamoil)cinamamida (LAPSSO 210):** Sólido verde; 25%; Pf.

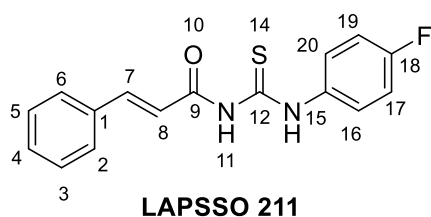


173-174 °C **Lit:** 165-167 °C (XIAO *et al.*, 2007).

RMN de  $^1\text{H}$  [ $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz]  $\delta$ : 12,47 (s, 1H), 9,50 (s, 1H), 7,82 (d,  $J = 15,7$  Hz, 1H), 7,58 – 7,50 (m, 4H), 7,46 – 7,36 (m, 3H), 6,95 – 6,88 (m, 2H), 6,62 (d,  $J = 15,5$  Hz, 1H), 3,82 (s, 3H). RMN de  $^{13}\text{C}$

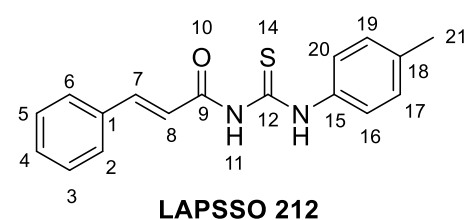
[ $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz]  $\delta$ : 179,06, 165,96, 158,29, 146,50, 133,75, 131,15, 130,58, 129,10, 128,60, 126,02, 118,43, 114,11, 55,49. **Lit:** RMN de  $^1\text{H}$  [DMSO- $d_6$ , 90 MHz]  $\delta$ : 3,85 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ); 6,75 (d, 1 H, CH); 7,0 (d, 2H, HPh); 7,35-7,8 (m, 7H, HPh); 7,9 (d, 1H, CH), 9,65 (s, 1H, NH), 12,6 (s, 1H, NH). (HAFEZ *et al.*, 1987)

**N-(4-fluorofenil)carbamoil)cinamamida (LAPSSO 211):** Sólido amarelo claro;



22%. Pf. 200-202 °C. RMN de  $^1\text{H}$  [ $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz]  $\delta$ : 12,53 (s, 1H), 9,07 (s, 1H), 7,84 (d,  $J = 15,6$  Hz, 1H), 7,68 – 7,59 (m, 2H), 7,59 – 7,52 (m, 2H), 7,49 – 7,39 (m, 3H), 7,15 – 7,04 (m, 2H), 6,52 (d,  $J = 15,7$  Hz, 1H).

**N-(p-tolilcarbamoil)cinamamida (LAPSSO 212):** Sólido amarelo; 30%. Pf. 198-



199 °C **Lit:** 183-186 °C (XIAO *et al.*, 2007). RMN de  $^1\text{H}$  [ $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz]  $\delta$ : 12,52 (s, 1H), 9,03 (s, 1H), 7,86 (d,  $J = 15,5$  Hz, 1H), 7,63 – 7,53 (m, 4H), 7,51 – 7,40 (m, 3H), 7,27 – 7,19 (m, 2H), 6,54 (d,  $J = 14,9$  Hz, 1H), 2,39 (s, 3H). RMN de  $^{13}\text{C}$  [ $\text{CDCl}_3$ ,

100 MHz]  $\delta$ : 178,78, 165,76, 146,76, 137,01, 135,22, 133,80, 131,36, 129,64, 129,26, 128,69, 124,37, 118,41, 21,27. **Lit:** (DZURILLA *et al.*, 1987)

#### 4.4 SERVIDOR FTMAP E FTSITE

O servidor de mapeamento computacional FTmap e FTsite foi acessado via <https://ftmap.bu.edu/login.php> e <https://ftsitesite.bu.edu/>. As 16 sondas utilizadas pelo FTMap consistem em etano, etanol, isopropanol, *terc*-butanol, acetonitrila, metenamina, *N,N*-dimetilformamida, éter dimetílico, benzaldeído, benzeno, cicloexano, fenol, acetamida, acetona, acetaldeído e ureia (KOZAKOV *et al.*, 2015; NGAN *et al.*, 2012).

#### 4.5 TRIAGEM VIRTUAL

##### 4.5.1 Hardware Utilizado

Os cálculos foram realizados em sistema operacional Windows 10, processador Intel® Core™ i7-8565U, CPU de 1,80 GHz, base 64 bits (x64) e 8 GB de memória RAM, marca Dell.

##### 4.5.2 Obtenção e Preparação das Estruturas Tridimensionais

As estruturas cristalográficas das ureases de *Canavalia ensiformis* e *Helicobacter pylori* foram obtidas do banco de dados de proteínas com os respectivos códigos de 4H9M e 6ZJA, e com resoluções de 1,52 Å e 2,00 Å. Ambas as estruturas possuem ligantes co-cristalizados em seu sítio ativo, sendo uma molécula de ácido acetoidroxâmico (HAE) para CEU e o inibidor 2-[[1-(3,5-dimetilfenil)-1H-imidazol-2-il]sulfanil]-N-hidroxiacetamida (DJM) para HPU.

As enzimas foram previamente trabalhadas no *software* Discovery Studio Visualizer (v.21.1.0.20298). Para CEU, as moléculas de água (HOH) e de 1,2-etanodiol (EDO) foram removidas da estrutura tridimensional. Para HPU, além das moléculas de água, algumas cadeias terciárias que não seriam utilizadas na docagem molecular, pois estão distantes do sítio ativo de interesse, também foram retiradas. Por fim, a estrutura quaternária da enzima utilizada em nosso estudo foi reduzida a cinco cadeias, A, B, Q, N e R, visando reduzir o custo computacional, tornando o cálculo mais eficiente.

### 4.5.3 Preparação dos Ligantes

As estruturas tridimensionais das moléculas foram construídas com o programa Discovery Studio Visualizer (v.19.1.0.18287), seguido de minimização preliminar da energia por mecânica molecular (MMFF, por meio do comando “*Clean Geometry*”). Em seguida, verificou-se o estado de protonação das estruturas, em pH 7,4, com o programa MarvinSketch (v.19.21.0). As informações sobre as cargas das espécies majoritárias foram utilizadas para corrigir as estruturas obtidas por meio do Discovery Studio Visualizer. Como otimização estrutural complementar dos ligantes, as estruturas foram minimizadas energeticamente pelo método semiempírico PM7, utilizando o programa MOPAC2016, por meio da interface do programa Mercury (2020.2.0). Os arquivos das estruturas otimizadas foram salvos no formato \*.mol2, para serem utilizados na docagem molecular.

Todas as substâncias presentes na Quimioteca do LaSMMed e, portanto, utilizadas no processo de triagem virtual estão demonstradas no Apêndice A.

#### 4.5.3.1 Ligantes descritos na literatura

Buscou-se 500 moléculas, com atividade antiureolítica, descritas na literatura. Estes compostos foram separados em 4 faixas de inibição: Muito Potentes com  $CI_{50} < 0,1 \mu\text{M}$ ; potentes  $0,1 \mu\text{M} \leq IC_{50} \leq 10 \mu\text{M}$ ; intermediárias  $10 \mu\text{M} \leq IC_{50} \leq 50 \mu\text{M}$  e pouco potentes com  $CI_{50} > 50 \mu\text{M}$ .

Na sequência, foram realizadas a docagem molecular dessas substâncias e a análise de suas interações. Assim, para determinar os principais resíduos de aminoácidos envolvidos em cada faixa de inibição, foi estabelecida uma pontuação para o fato de a substância interagir (1) ou não (0) com um respectivo resíduo de aminoácido ou cofator. Posteriormente, calculou-se a porcentagem de interação das substâncias com os resíduos-chave, conforme as faixas pré-determinadas anteriormente. O cálculo da porcentagem de interação se deu conforme a equação 1 abaixo:

$$\text{Interação (\%)} = \frac{(n^{\circ} \text{ Int. Resíduo})}{(n^{\circ} \text{ total de moléculas})} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde se avaliou o número total de interações que as substâncias tiveram com o cada

resíduo de aminoácido-chave (nº int. resíduo), em relação ao número de substâncias avaliadas (nº total de moléculas) em cada faixa de inibição.

#### 4.5.4 Docagem Molecular

##### 4.5.4.1 *Canavalia ensiformis*

O estudo de modelagem molecular foi realizado com o uso do programa GOLD Suite (v.2020.1.0 e estudos mais recentes com a v.2022.2.0). A estrutura cristalográfica da urease foi preparada para o cálculo na interface do *software* pela remoção do ligante co-cristalizado e adição dos átomos de hidrogênio (6396 átomos).

O centro do raio do sítio ativo foi definido como sendo o ponto médio entre os átomos de níquel [Ni(901) e Ni(902)],  $X = 18,7825$ ,  $Y = -57,8095$  e  $Z = -24,1515$ ; enquanto que o raio escolhido para a análise dos ligantes foi de 15 Å, totalizando um diâmetro de encaixe de 30 Å em relação ao ponto selecionado. A docagem molecular foi realizada no modo rígido para a proteína e flexível para os ligantes, com 50 poses de docagem para ácido acetoidroxâmico, e com as quatro funções de pontuação disponíveis no programa GOLD (GoldScore, ChemScore, CHEMPLP e ASP), utilizando as demais configurações definidas por padrão do programa nos cálculos.

Avaliou-se também a possibilidade de permutação dos quatro tautômeros das histidinas presentes no sítio ativo da enzima (H407, H492, H519 e H545), conforme as possibilidades apresentadas na Tabela 1 (Resultados e discussão). As configurações que apresentaram o menor valor de RMSD em relação ao ácido acetoidroxâmico co-cristalizado foram selecionadas para a realização da triagem virtual.

Assim, a metodologia aplicada foi validada por *redocagem*, utilizando a função de pontuação ASP, 50 poses de docagem, raio de 15 Å e como centro o ponto médio entre os íons Ni. Após a validação por *redocagem*, os mesmos parâmetros foram aplicados para os ligantes da literatura e na triagem virtual da quimioteca do LaSMMed.

Os complexos ligante-proteína foram analisados, na região do sítio

ativo, por meio das interações envolvidas, com o programa Discovery Studio Visualizer (v.19.1.0.18287). Adicionalmente, as figuras foram geradas com o programa Pymol (1.7.4.5 Edu).

#### 4.5.4.2 *Helicobacter pylori*

A estrutura tridimensional da urease, obtida por microscópio eletrônico foi preparada para o cálculo na interface do programa GOLD Suite (v. 2021.3.0) pela remoção do ligante co-cristalizado e adição dos átomos de hidrogênio (16.666 átomos).

O centro do raio do sítio ativo foi definido como sendo o ponto médio entre os átomos de níquel [Ni(601) e Ni(602)],  $X = 225,1450$ ,  $Y = 246,0130$  e  $Z = 196,5110$ ; e raio de 15 Å. A docagem molecular do ligante foi realizada no modo flexível e proteína em modo rígido, com 50 poses de docagem para o DJM, com as quatro funções de pontuação disponíveis no programa GOLD: GoldScore, ChemScore, CHEMPLP e ASP, utilizando as demais configurações definidas por padrão do programa nos cálculos.

Por fim, a metodologia de docagem aplicada para os ligantes foi validada por redocagem e, assim como para a CEU, utilizando a função de pontuação ASP, 50 poses de docagem, raio de 15 Å e como centro o ponto médio entre os íons Ni. As interações geradas foram analisadas com o Discovery Studio Visualizer (v.21.1.0.20298) e as figuras foram geradas com o Pymol (v2.0.4).

## 4.6 PREPARO E OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE UREASE DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

### 4.6.1 Microrganismo e Condições de Cultura

As leveduras de *Cryptococcus neoformans* ATCC 34872 (sorotipo A) utilizadas em nosso estudo são pertencentes à coleção microbiana do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil, que atua sob responsabilidade da profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta e colaboradores. Ao longo dos anos os colaboradores Gabriella Maria

Andriani, Laís Fernanda de Almeida Spoladori e Paulo Borges foram responsáveis pela semeadura e cultivo do microrganismo.

As leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose (SD) a 37 °C por 48 horas. Para os experimentos, as colônias crescidas foram transferidas em 30 falcons contendo 5 mL de caldo SD suplementado com 2% de ureia e incubadas nas mesmas condições.

#### 4.6.2 Obtenção do Extrato Bruto de Urease

A extração da proteína foi realizada de acordo com (LIU *et al.*, 2018), com modificações. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas (Centurion Scientific K3 series) a 6.000 rpm por 5 min e concentradas em um único tubo falcon. Na sequência, o precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e centrifugado (6.000 rpm por 5 min). As leveduras foram ressuspensas em cerca de 12 - 15 mL de tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 8,0) e o tubo foi armazenado a -80 °C por pelo menos 24 h.

A suspensão foi descongelada a temperatura ambiente e cerca de 20 esferas de vidro estéreis foram adicionadas ao tubo. As células foram lisadas por mistura vigorosa em um Vortex Genie® (Scientific Industries Inc, EUA) por um total de 10 ciclos cada um, consistindo em misturar por 1 min, seguido de descanso a temperatura ambiente por 30 s. Posteriormente, os detritos celulares foram removidos por centrifugação (6.000 rpm, 10 min, 25 °C) e o conteúdo de proteína do sobrenadante resultante foi armazenado.

O sobrenadante foi então purificado em uma coluna com cerca de 2 mL do gel Sephadex® G-50 para a remoção de possíveis contaminantes. Em seguida, foi realizada a ativação da enzima por meio da adição de 2 mL de uma solução de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>, 100 mM) e 1 mL de uma solução de cloreto de níquel (NiCl<sub>2</sub>, 100 µM), conforme proposto por (PARK; HAUSINGER, 1995). Após adição das soluções, o extrato foi mantido sob agitação a temperatura ambiente, *overnight*, e na sequência foram realizados os ensaios enzimáticos com o extrato, conforme a Reação do Indofenol descrita na sequência.

## 4.7 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

### 4.7.1 Inibição Enzimática e Determinação do IC<sub>50</sub> com Urease de *Canavalia ensiformis*

A atividade inibitória *in vitro* da urease de *Canavalia ensiformis* foi realizada conforme a Reação do Indofenol, ou Reação de Berthlot, como também é conhecida (WEATHERBURN, 1967). A urease foi adquirida comercialmente na Merck (Sigma-Aldrich), *Jack bean*, tipo III, (CAS 9002-13-5) e a metodologia utilizada foi adaptada de Khan et al., (2017).

Os ensaios foram realizados em triplicata e em placa de 96 poços conforme: adição de 100 µL de ureia (10 mM), 55,0 µL da solução tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,4) suplementado com EDTA (1 mM), e adição de 10 µL da substância-teste a 2,00 mM para os ensaios de porcentagem de inibição, previamente dissolvidos em metanol. Por fim, fez-se o acréscimo de 25,0 µL de solução enzimática de urease (0,0035 mM) e, então, a mistura reacional foi submetida a incubação a 45 – 50 °C por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado a cada um dos poços 40,0 µL de reagente de fenol (1% de fenol e 0,05% de nitroprussiato de sódio) e 40,0 µL de reagente alcalino (1,0% NaOH e 0,1% hipoclorito de sódio) (KHAN *et al.*, 2017). A reação permaneceu em repouso por 15 minutos e, então, fez-se a leitura da absorbância da mistura reacional, registrada a 630 nm, com um leitor de microplacas UV-visível marca Loccus modelo LMR-96i.

A porcentagem de inibição (%IE) foi determinada pela equação:

$$\%IE = 100 - \left( \frac{Abs_{amostra}}{Abs_{controle}} \times 100 \right) \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde Abs<sub>amostra</sub> a é a absorbância observada para as amostras, e Abs<sub>controle</sub> é a absorbância observada para o controle positivo. O padrão de inibidor utilizado foi a tioureia (2,00 mM).

Para a determinação da metade da concentração inibitória máxima (IC<sub>50</sub>), as substâncias **LAPSSO 208**, **LaSMMed 77-81** e o controle tioureia foram testados em diferentes concentrações (0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 1,4 e 2,0 mM), utilizando o mesmo protocolo descrito acima. O ensaio foi realizado em triplicata e os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados no GraphPad Prism 8.0.2, por meio de curva de dose-resposta,

onde o eixo X corresponde as diferentes concentrações dos inibidores e no eixo Y a atividade inibitória enzimática correspondente.

#### 4.7.2 Inibição Enzimática e Determinação do IC<sub>50</sub> com Extrato Bruto de Urease de *Cryptococcus neoformans*

O ensaio enzimático com o extrato bruto de urease de *Cryptococcus neoformans* seguiu o mesmo procedimento descrito para a urease de *Canavalia ensiformis*, contudo, ao invés da utilização da enzima comercial foi utilizada o lisado de CNU, conforme descrito no tópico 4.6.2, e o tampão fosfato de sódio utilizado foi de 100 mM a pH 8,0 e sem suplementação de EDTA.

A determinação da %IE e do IC<sub>50</sub> seguiu o mesmo procedimento descrito no tópico acima e nas mesmas concentrações dos reagentes e inibidores.

#### 4.7.3 Cinética Enzimática

O estudo da cinética enzimática foi realizado conforme trabalhos anteriores do grupo (CAMARGO *et al.*, 2022). A mesma mistura reacional aplicada para a determinação da atividade inibitória e IC<sub>50</sub> foi adotado para a determinação da cinética enzimática em urease de *Canavalia ensiformis*. Contudo, foi utilizado apenas duas concentrações da substância teste (0,50 e 0,25 mM), e cinco diferentes concentrações de substrato ureia (0,66, 1,00, 1,50, 2,00 e 2,50 mM) para cada amostra. A absorbância final da mistura de reação, foi registrada a 630 nm, com um leitor de microplacas UV-visível Locus modelo LMR-96i. As plotagens de Michaelis-Menten (regressão não linear) e Lineweaver-Burk (regressão linear), bem como a determinação das constantes de inibição ( $K_i$ ),  $K_m$ ,  $\alpha$  e  $V_{max}$  foram feitas por meio do software GraphPad Prism (versão 8.0.2). A cinética foi estudada tomando-se recíproca de atividade enzimática ao longo do eixo y e recíproca da concentração de substrato ao longo do eixo x. A tendência das linhas para diferentes concentrações de inibidores (0,50 e 0,25 mM) forneceu informações sobre o mecanismo de inibição. A atividade enzimática foi calculada através de uma curva de calibração de cloreto de amônio, determinada em trabalhos anteriores (CARVALHO, 2021), de modo que uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de amônia por minuto de reação ( $U = 1 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ min}^{-1} \mu\text{mol de}$

enzima<sup>-1</sup>). Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa SISVAR (versão 5.8) (FERREIRA, 2014). Letras distintas indicam uma diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).

#### 4.9 PREDIÇÃO *IN SILICO* DE PROPRIEDADES DE FÁRMACO-SIMILARIDADE E PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS

O estudo *in silico* foi realizado para as substâncias mais promissoras, os derivados de tioureia, **LAPSSO 208** e (**LaSMMed 77-81**). Parâmetros farmacocinéticos teóricos, como absorção intestinal, atuação como substrato da glicoproteína-P e como inibidor de enzimas da família do citocromo P450 (CYP450), bem como relacionados a distribuição, como a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) e parâmetros de similaridade a fármacos foram avaliados. Todas as predições foram realizadas por meio da plataforma *online* SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) (DAINA *et al.*, 2017).

## 5 CONCLUSÃO

Por meio de uma triagem virtual de 130 substâncias, que compõem a quimioteca do LaSMMed, 18 substâncias, tais quais: uma cumariltioureia (**LaSMMed 13**), duas cumarilamidas (**LaSMMed 16 e 22**), cinco indóis (**LaSMMed 30, 33, 34, 35 e 37**), uma tiazolidinona (**LaSMMed 49**), um derivado de apocinina (**LaSMMed 69**), duas cromonamidas (**LaSMMed 72 e 73**) e seis derivados de cinamoiltioureias (**LAPSSO 203, 206, 208 e 210 - 212**), foram selecionadas para os ensaios *in vitro* na urease de *C. ensiformis*. Como resultado, os ensaios *in vitro* preliminares demonstraram que a tioureia monosubstituída, **LAPSSO 208**, foi a substância mais promissora entre as selecionadas na triagem virtual, com porcentagem de inibição acima de 80%, comparável ao padrão. Com isso, foi realizada a síntese e caracterização de uma pequena série de ariltioureias monosubstituídas (**LaSMMed 77 - 81**), tais quais apresentaram porcentagem de inibição contra CEU também acima de 80%.

Novos ensaios *in vitro* foram realizados, tanto em CEU, para a determinação do IC<sub>50</sub> e cinética enzimática, quanto em CNU (extrato bruto de urease de *Cryptococcus neoformans*) com a determinação da porcentagem de inibição e IC<sub>50</sub>. Assim como para CEU, os derivados que contém uma tioureia monosubstituída (**LAPSSO 208 e LaSMMed 77-81**) foram as substâncias mais promissoras de nosso estudo para CNU, com porcentagem de inibição acima de 90%. Com relação ao IC<sub>50</sub>, **LAPSSO 208** foi a substância com maior atividade anti-ureolítica para a CEU, com IC<sub>50</sub> de 0,41 mM (mais ativo que padrão), enquanto que para a CNU **LAPSSO 208, LaSMMed 77 e 80** foram as substâncias que apresentaram a melhor potência de inibição, com IC<sub>50</sub> de aproximadamente 0,34 mM, que não os difere estatisticamente. Por fim, o estudo de cinética enzimática revelou que a **LAPSSO 208** é a substância mais potente de nosso estudo, ao apresentar maior afinidade pela urease ( $K_i = 0,06$  mM) e mecanismo de inibição misto, com maior afinidade pela ligação a enzima livre que ao complexo enzima-substrato. **LAPSSO 208** é, portanto, a substância *hit* desse estudo.

Complementarmente, a avaliação das propriedades *in silico* de semelhança a fármacos e propriedades farmacocinéticas demonstrou que todas as substâncias selecionadas são semelhantes a fármacos, pois não violaram as Regras

de Lipinski e extensões, e a **LaSMMed 79** e **80** são as substâncias que apresentam o melhor perfil farmacocinético.

Como perspectivas, pretende-se realizar a docagem molecular das substâncias que apresentaram mecanismo de inibição misto, **LAPSSO 208** e **LaSMMed 77-79** e **81**, no sítio alostérico da CEU, previamente identificados pelo FTSite e FTMap. Ademais, pretende-se avaliar por meio de ensaios fenotípicos *in vitro*, a atividade antimicrobiana das substâncias promissoras frente aos microorganismos ureolíticos (*Cryptococcus neoformans* e *Helicobacter pylori*), bem como realizar ensaios para avaliação da citotoxicidade em células de mamíferos. Por fim, a partir das evidências reunidas nesse trabalho, pretende-se utilizar as descobertas e as substâncias líderes como inibidores modelo de urease para a realização de modificações estruturais, com o intuito de melhorar a potência e as propriedades farmacocinéticas dessas moléculas.

## REFERÊNCIAS

- ABBASI, M.; RAZA, H.; REHMAN, A.; SIDDIQUI, S.; NAZIR, M.; MUMTAZ, A.; SHAH, S.; SEO, S.-Y.; HASSAN, M. Synthesis, Antioxidant and In-Silico Studies of Potent Urease Inhibitors: N-(4-[(4-Methoxyphenethyl)-(substituted)amino]sulfonyl}phenyl)acetamides. **Drug Research**, [s. l.], v. 69, n. 02, p. 111–120, 2019. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/a-0654-5074>.
- AHARI-MOSTAFAVI, M. M.; SHARIFI, A.; MIRZAEI, M.; AMANLOU, M. Novel and versatile methodology for synthesis of  $\beta$ -aryl- $\beta$ -mercapto ketone derivatives as potential urease inhibitors. **Journal of the Iranian Chemical Society**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 1113–1119, 2014. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s13738-013-0379-1>.
- AKHTAR, T.; KHAN, M. A.; IQBAL, J.; JONES, P. G.; HAMEED, S. A Facile One-Pot Synthesis of 2-Arylamino-5-Aryloxyalkyl-1,3,4-Oxadiazoles and Their Urease Inhibition Studies. **Chemical Biology & Drug Design**, [s. l.], v. 84, n. 1, p. 92–98, 2014. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cbdd.12297>.
- AKYÜZ, G.; MENTEŞE, E.; EMIRIK, M.; BALTAŞ, N. Synthesis and molecular docking study of some novel 2,3-disubstituted quinazolin-4(3H)-one derivatives as potent inhibitors of urease. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], v. 80, n. June, p. 121–128, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045206818303638>.
- ALEXANDER, S. M.; RETNAKUMAR, R. J.; CHOUHAN, D.; DEVI, T. N. B.; DHARMASEELAN, S.; DEVADAS, K.; THAPA, N.; TAMANG, J. P.; LAMTHA, S. C.; CHATTOPADHYAY, S. Helicobacter pylori in Human Stomach: The Inconsistencies in Clinical Outcomes and the Probable Causes. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, n. August, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.713955/full>.
- AQLAN, F. M.; AL-BOGAMI, A. S.; ALQAHTANI, N. F.; WANI, M. Y.; KHAN, S. A. Thiazolidinone: A structural motif of great synthetic and biological importance. **Journal of Molecular Structure**, [s. l.], v. 1250, p. 131771, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131771>.
- ARMAREGO, W. L. E.; CHAI, C. L. L. **Purification of Laboratory Chemicals**. 5. ed. [S. l.]: Elsevier Science, 2003. 2003.
- ASGARI, M. S.; AZIZIAN, H.; NAZARI, M.; MOHAMMADI, M.; MEHDI, K.; SAGHI, A.; AMANLOU, M.; MAHDAVI, M. New 1, 2, 3 - triazole – ( thio ) barbituric acid hybrids as urease inhibitors : Design , synthesis , in vitro urease inhibition , docking study , and molecular dynamic simulation. [s. l.], n. February, p. 1–14, 2020.
- ASHANI, R. S.; AZIZIAN, H.; ALAVIJEH, N. S.; FATHI VAHSARI, V.; MAHERNIA, S.; SHEYSI, N.; BIGLAR, M.; AMANLOU, M.; BALALAIE, S. Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Docking of Deferasirox and Substituted 1,2,4-Triazole Derivatives as Novel Potent Urease Inhibitors: Proposing Repositioning Candidate. **Chemistry & Biodiversity**, [s. l.], v. 17, n. 5, 2020. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.201900710>.

ASLAM, M. A. S.; MAHMOOD, S.; SHAHID, M.; SAEED, A.; IQBAL, J. Synthesis, biological assay in vitro and molecular docking studies of new Schiff base derivatives as potential urease inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 46, n. 11, p. 5473–5479, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.09.009>.

ATHAR ABBASI, M.; RAZA, H.; AZIZ-UR-REHMAN; ZAHRA SIDDIQUI, S.; ADNAN ALI SHAH, S.; HASSAN, M.; SEO, S.-Y. Synthesis of novel N-(1,3-thiazol-2-yl)benzamide clubbed oxadiazole scaffolds: Urease inhibition, Lipinski rule and molecular docking analyses. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], v. 83, n. June 2018, p. 63–75, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.10.018>.

AYGUL, I.; KARAHALIL, F. Y.; DANIS, O.; OGAN, A.; KOLAYLI, S. Investigation of the Inhibitory Effects of Human Carbonic Anhydrase I and Jack Bean Urease by Coumarin Derivates. **Current Enzyme Inhibition**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 226–232, 2018. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/165076/article>.

AZIZIAN, H.; ESMAILNEJAD, A.; FATHI VAVERSARI, V.; MAHERNIA, S.; AMANLOU, M.; BALALAE, S. Pantoprazole Derivatives: Synthesis, Urease Inhibition Assay and In Silico Molecular Modeling Studies. **ChemistrySelect**, [s. l.], v. 5, n. 15, p. 4580–4587, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/slct.202000578>.

BABAZADEH, E.; FAHIMEH, R.; HOMA, A.; MOHAMMAD, A.; MONTAZER, N.; ASADI, M. Design, synthesis, and evaluation of metronidazole-1,2,3-triazole derivatives as potent urease inhibitors. **Chemical Papers**, [s. l.], 2021.

BADDLEY, J. W.; FORREST, G. N. Cryptococcosis in solid organ transplantation—Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. **Clinical Transplantation**, [s. l.], v. 33, n. 9, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ctr.13543>.

BALASUBRAMANIAN, A.; PONNURAJ, K. Crystal Structure of the First Plant Urease from Jack Bean: 83 Years of Journey from Its First Crystal to Molecular Structure. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 400, n. 3, p. 274–283, 2010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283610004882>.

BARRET, R. Importance and Evaluation of the Polar Surface Area (PSA and TPSA). *In*: THERAPEUTICAL CHEMISTRY. [S. l.]: Elsevier, 2018. p. 89–95. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781785482885500056>.

BASSANETTI, I.; CARCELLI, M.; BUSCHINI, A.; MONTALBANO, S.; LEONARDI, G.; PELAGATTI, P.; TOSI, G.; MASSI, P.; FIORENTINI, L.; ROGOLINO, D. Investigation of antibacterial activity of new classes of essential oils derivatives. **Food Control**, [s. l.], v. 73, p. 606–612, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.010>.

BELLEZZA, D.; NOVERGES, B.; FASANO, F.; SARMIENTO, J. T.; MEDIO-SIMÓN, M.; ASENSIO, G. Palladium-Catalyzed C-C Ring Closure in  $\alpha$ -Chloromethylamines:

Synthesis of 1 H -Indoles. **European Journal of Organic Chemistry**, [s. l.], v. 2019, n. 6, p. 1229–1235, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejoc.201801607>.

BENINI, S.; RYPNIEWSKI, W. R.; WILSON, K. S.; MILETTI, S.; CIURLI, S.; MANGANI, S. A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels. **Structure**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 205–216, 1999. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969212699800264>.

BERLICKI, Ł.; BOCHNO, M.; GRABOWIECKA, A.; BIAŁAS, A.; KOSIKOWSKA, P.; KAFARSKI, P. N-substituted aminomethanephosphonic and aminomethane-P-methylphosphinic acids as inhibitors of ureases. **Amino Acids**, [s. l.], v. 42, n. 5, p. 1937–1945, 2012. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00726-011-0920-4>.

BIASI-GARBIN, R. P.; FABRIS, M.; MORGUETTE, A. E. B.; ANDRIANI, G. M.; CABRAL, W. R. C.; PEREIRA, P. M. L.; BRITO, T. O.; MACEDO, F.; DA SILVA LIMA, C. H.; LANCHEROS, C. A. C.; NAKAMURA, C. V.; PINGE-FILHO, P.; TAVARES, E. R.; YAMAUCHI, L. M.; BISPO, M. L. F.; YAMADA-OGATTA, S. F. In Vitro Antimicrobial Screening of Benzoylthioureas: Synthesis, Antibacterial Activity toward *Streptococcus agalactiae* and Molecular Docking Study. **ChemistrySelect**, [s. l.], v. 7, n. 34, 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/slct.202202117>.

BKHAITAN, M. M.; ALARJAH, M.; MIRZA, A. Z.; ABDALLA, A. N.; EL-SAID, H. M.; FAIDAH, H. S. Preparation and biological evaluation of metronidazole derivatives with monoterpenes and eugenol. **Chemical Biology & Drug Design**, [s. l.], v. 92, n. 6, p. 1954–1962, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cbdd.13366>.

BOSHTAM, M.; KOUHPAYEH, S.; AMINI, F.; AZIZI, Y.; NAJAFLU, M.; SHARIATI, L.; KHANAHMAD, H. Anti-inflammatory effects of apocynin: a narrative review of the evidence. **All Life**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 997–1010, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/26895293.2021.1990136>.

BRENKE, R.; KOZAKOV, D.; CHUANG, G.-Y.; BEGLOV, D.; HALL, D.; LANDON, M. R.; MATTOS, C.; VAJDA, S. Fragment-based identification of druggable 'hot spots' of proteins using Fourier domain correlation techniques. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 621–627, 2009. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btp036>.

BRITO, T. O.; ABREU, L. O.; GOMES, K. M.; LOURENÇO, M. C. S.; PEREIRA, P. M. L.; YAMADA-OGATTA, S. F.; DE FÁTIMA, Â.; TISHER, C. A.; JR, F. M.; BISPO, M. L. F. Benzoylthioureas: Design, Synthesis and Antimycobacterial Evaluation. **Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 93–103, 2020. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/168177/article>.

BRITO, T. O.; SOUZA, A. X.; MOTA, Y. C. C.; MORAIS, V. S. S.; DE SOUZA, L. T.; DE FÁTIMA, Â.; MACEDO, F.; MODOLO, L. V. Design, syntheses and evaluation of benzoylthioureas as urease inhibitors of agricultural interest. **RSC Advances**, [s. l.], v.

5, n. 55, p. 44507–44515, 2015. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA07886E>.

BUKER, S. M.; BORIACK-SJODIN, P. A.; COPELAND, R. A. Enzyme–Inhibitor Interactions and a Simple, Rapid Method for Determining Inhibition Modality. **SLAS Discovery**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 515–522, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/2472555219829898>.

CALDWELL, G. W.; YAN, Z.; LANG, W.; MASUCCI, J. A. The IC50 Concept Revisited. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 1282–1290, 2012. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-0266&volume=12&issue=11&spage=1282>.

CAMARGO, P. G.; BORTOLETI, B. T. da S.; FABRIS, M.; GONÇALVES, M. D.; TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; COSTA, I. N.; CONCHON-COSTA, I.; LIMA, C. H. da S.; PAVANELLI, W. R.; BISPO, M. de L. F.; MACEDO JR, F. Thiohydantoinas as anti-leishmanial agents: n vitro biological evaluation and multi-target investigation by molecular docking studies. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [s. l.], v. 40, n. 7, p. 3213–3222, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1845979>.

CAMARGO, P. G.; FABRIS, M.; NAKAMAE, M. Y. T.; DE FREITAS OLIVEIRA, B. G.; DA SILVA LIMA, C. H.; DE FÁTIMA, Â.; DE LIMA FERREIRA BISPO, M.; MACEDO, F. Thiohydantoinas and hydantoinas derived from amino acids as potent urease inhibitors: Inhibitory activity and ligand-target interactions. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 365, n. June, p. 110045, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279722002502>.

CAMARGO, P. G.; FABRIS, M.; SILVA, T. U.; SILVA LIMA, C. H.; PAULA MACHADO, S.; TONIN, L. T. D.; LIMA FERREIRA BISPO, M.; MACEDO, F. Thiohydantoinas as Potential Antioxidant Agents: In vitro and in silico evaluation. **ChemistrySelect**, [s. l.], v. 6, n. 38, p. 10429–10435, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/slct.202102840>.

CAMARGO, P. G.; FABRIS, M.; TATSUTA NAKAMAE, M. Y.; GERMANO DE FREITAS OLIVEIRA, B.; HENRIQUE DA SILVA LIMA, C.; DE FÁTIMA, Â.; DE LIMA FERREIRA BISPO, M.; MACEDO, F. Thiohydantoinas and hydantoinas derived from amino acids as potent urease inhibitors: Inhibitory activity and ligand-target interactions. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], p. 110045, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279722002502>.

CARVALHO, P. G. C. **Hidantoínas e Tiohidantoínas: Síntese, Avaliação Antiureolítica e Estudo de Interações por Ressonância Magnética Nuclear e Docking Molecular**. 2021. 131 f. - Universidade Estadual de Londrina, [s. l.], 2021.

CAVALCANTE, K. K. L. **Síntese de híbridos apocinina-protocatecolato de heptila e avaliação in silico de potenciais inibidores de NOX-2**. 2020. 65 f. - Universidade Estadual de Londrina, Londrina 2020.

CHANG, Y. C.; KHANAL LAMICHHANE, A.; BRADLEY, J.; RODGERS, L.; NGAMSKULRUNGROJ, P.; KWON-CHUNG, K. J. Differences between *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in the Molecular Mechanisms Governing Utilization of D-Amino Acids as the Sole Nitrogen Source. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. e0131865, 2015. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0131865>.

CHANNAR, P. A.; SAEED, A.; AFZAL, S.; HUSSAIN, D.; KALESSE, M.; SHEHZADI, S. A.; IQBAL, J. Hydrazine clubbed 1,3-thiazoles as potent urease inhibitors: design, synthesis and molecular docking studies. **Molecular Diversity**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 1–13, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11030-020-10057-7>.

CHANNAR, P.; SAEED, A.; ALBERICIO, F.; LARIK, F.; ABBAS, Q.; HASSAN, M.; RAZA, H.; SEO, S.-Y. Sulfonamide-Linked Ciprofloxacin, Sulfadiazine and Amantadine Derivatives as a Novel Class of Inhibitors of Jack Bean Urease; Synthesis, Kinetic Mechanism and Molecular Docking. **Molecules**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 1352, 2017. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/22/8/1352>.

CHEY, W. D.; LEONTIADIS, G. I.; HOWDEN, C. W.; MOSS, S. F. ACG Clinical Guideline: Treatment of *Helicobacter pylori* Infection. **American Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 112, n. 2, p. 212–239, 2017. Disponível em: <https://journals.lww.com/00000434-201702000-00012>.

CHO, J.; PRASHAR, A.; JONES, N. L.; MOSS, S. F. *Helicobacter pylori* Infection. **Gastroenterology Clinics of North America**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 261–282, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889855321000133>.

COLE, J. C.; MURRAY, C. W.; NISSINK, J. W. M.; TAYLOR, R. D.; TAYLOR, R. Comparing protein-ligand docking programs is difficult. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 325–332, 2005. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prot.20497>.

COPELAND, R. A. **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery**. [S. l.]: Wiley, 2013. 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118540398>.

CREENCIA, E. C.; TSUKAMOTO, M.; HORAGUCHI, T. One-pot-one-step, microwave-assisted Fischer indole synthesis. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 1095–1102, 2011. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jhet.689>.

CUI, Q.-H.; LI, W.-B.; WANG, Z.-Y.; XU, K.-Y.; WANG, S.; SHI, J.-T.; ZHANG, L.-W.; CHEN, S.-W. Design, synthesis and biological evaluation of coumarin derivatives as potential BRD4 inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], v. 128, n. July, p. 106117, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.106117>.

CUNHA, E. S.; CHEN, X.; SANZ-GAITERO, M.; MILLS, D. J.; LUECKE, H. Cryo-EM structure of *Helicobacter pylori* urease with an inhibitor in the active site at 2.0 Å resolution. **Nature Communications**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 230, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-20485-6>.

CUNHA, S.; IUNES, C. E. M.; OLIVEIRA, C. C.; SANTANA, L. L. B. de. Síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos e sua aplicação na síntese total da aiapina, cumarina e umbeliferona. **Química Nova**, [s. l.], v. 38, n. 8, p. 1125–1131, 2015. Disponível em: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0100-4042.20150096>.

DA COSTA, C. F.; PINHEIRO, A. C.; DE ALMEIDA, M. V.; LOURENÇO, M. C. S.; DE SOUZA, M. V. N. Synthesis and Antitubercular Activity of Novel Amino Acid Derivatives. **Chemical Biology & Drug Design**, [s. l.], v. 79, n. 2, p. 216–222, 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1747-0285.2011.01269.x>.

DA SILVA, W.; DE LIMA FERREIRA BISPO, M.; ORSATO, A. Indole: a Versatile and Promising Heterocycle for the Discovery of Novel Antibacterial and Antifungal Agents. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 612–636, 2022. Disponível em: [http://rvq.sbq.org.br/audiencia\\_pdf.asp?aid2=1442&nomeArquivo=v14n4a05.pdf](http://rvq.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=1442&nomeArquivo=v14n4a05.pdf).

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 42717, 2017. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep42717>.

DAMICO, D. F. **Síntese de Tiazolidinonas contendo o grupo sulfonamida com potencial atividade anti-tuberculose**. 2019. 82 f. - Universidade Estadual de Londrina, Londrina 2019.

DE CARVALHO, P. G. C.; RIBEIRO, J. M.; GARBIN, R. P. B.; NAKAZATO, G.; YAMADA OGATTA, S. F.; DE FÁTIMA, Â.; DE LIMA FERREIRA BISPO, M.; MACEDO, F. Synthesis and Antimicrobial Activity of Thiohydantoin Obtained from L-Amino Acids. **Letters in Drug Design & Discovery**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 94–102, 2019. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/168309/article>.

DE MARTEL, C.; GEORGES, D.; BRAY, F.; FERLAY, J.; CLIFFORD, G. M. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. **The Lancet Global Health**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. e180–e190, 2020. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30488-7](http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30488-7).

DHANYA, S.; PRASOBH, G. R.; SHEEJA, R. A. G.; ATHIRA, A. S.; AJILA, E. Thiazolidinone as a lead compound in drug discovery- a review. **Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 293–298, 2021.

DIACONU, S.; PREDESCU, A.; MOLDOVEANU, A.; POP, C. S.; FIERBINȚEANU-BRATICEVICI, C. Helicobacter pylori infection: old and new. **Journal of medicine and life**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 112–117, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28616085%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5467250>.

DIXON, N. E.; GAZZOLA, C.; BLAKELEY, R. L.; ZERNER, B. Jack Bean Urease (EC 3.5.1.5). A Metalloenzyme. A Simple Biological Role for Nickel?. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 97, n. 14, p. 4131–4133, 1975.

DOLIGALSKI, C. T.; TONG LOGAN, A.; SILVERMAN, A. Drug interactions: a primer for the gastroenterologist. **Gastroenterology & hepatology**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 376–

83, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22933873>.

DOMÍNGUEZ, M. J.; SANMARTÍN, C.; FONT, M.; PALOP, J. A.; SAN FRANCISCO, S.; URRUTIA, O.; HOUDUSSE, F.; GARCÍA-MINA, J. M. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Phosphoramidate Derivatives as Urease Inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 56, n. 10, p. 3721–3731, 2008. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf072901y>.

DZURILLA, M.; KUTSCHY, P.; KOŠČÍK, D. A new method for preparation of 1-(4-substituted phenyl)-6-phenyl-2-thiouracils via cyclization of N-(4-substituted phenyl)-N'-3-phenylpropenoylthioureas and Dimroth rearrangement of 2-(4-substituted phenylimino)-6-phenyl-5,6-dihydro-4H-1,3-thiazin-4-ones. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, [s. l.], v. 52, n. 9, p. 2260–2265, 1987. Disponível em: <http://cccc.uochb.cas.cz/52/9/2260/>.

FABRIS, M. **Síntese e avaliação antibacteriana de derivados cumarínicos funcionalizados**. 2019. 133 f. - Universidade Estadual de Londrina, Londrina 2019.

FAN, T.; GUO, X.; ZENG, Q.; WEI, W.; YOU, X.; PANG, J.; WANG, Y.; SONG, D. Synthesis and Structure–Activity Relationship of Palmatine Derivatives as a Novel Class of Antibacterial Agents against *Helicobacter pylori*. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 1352, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/6/1352>.

FAN, Tianyun; HU, X.; TANG, S.; LIU, X.; WANG, Y.; DENG, H.; YOU, X.; JIANG, J.; LI, Y.; SONG, D. Discovery and Development of 8-Substituted Cycloberberine Derivatives as Novel Antibacterial Agents against MRSA. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 484–489, 2018. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsmchemlett.8b00094>.

FAN, Tian–Yun; WANG, Y.; TANG, S.; HU, X.; ZEN, Q.; PANG, J.; YANG, Y.; YOU, X.; SONG, D. Synthesis and antibacterial evaluation of 13-substituted cycloberberine derivatives as a novel class of anti-MRSA agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 157, p. 877–886, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.050>.

FAN, M.; YANG, W.; HE, M.; LI, Y.; PENG, Z.; WANG, G. Occurrence, synthesis and biological activity of 2-(2-phenylethyl)chromones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 237, n. July 2021, p. 114397, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114397>.

FATTAH, T. A.; SAEED, A.; CHANNAR, P. A.; ASHRAF, Z.; ABBAS, Q.; HASSAN, M.; LARIK, F. A. Synthesis, enzyme inhibitory kinetics, and computational studies of novel 1-(2-(4-isobutylphenyl) propanoyl)-3-arylthioureas as Jack bean urease inhibitors. **Chemical Biology & Drug Design**, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 434–447, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cbdd.13090>.

FEARON, W. R. Urease. Part I. The Chemical Changes Involved in the Zymolysis of Urea. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 84–93, 1923.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **REVISTA BRASILEIRA DE BIOMETRIA**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 529–535, 2019.

Disponível em: <https://biometria.ufla.br/index.php/BBJ/article/view/450>.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 109–112, 2014.

FINCH, A.; PILLANS, P. P-glycoprotein and its role in drug-drug interactions. **Australian Prescriber**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 137–139, 2014. Disponível em: <https://www.nps.org.au/australian-prescriber/magazine/37/4/137/9>.

FOTI, C.; PIPERNO, A.; SCALA, A.; GIUFFRÈ, O. Oxazolidinone Antibiotics: Chemical, Biological and Analytical Aspects. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 14, p. 4280, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/14/4280>.

FRIEDMAN, M. Chemistry and Multibeneficial Bioactivities of Carvacrol (4-Isopropyl-2-methylphenol), a Component of Essential Oils Produced by Aromatic Plants and Spices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 62, n. 31, p. 7652–7670, 2014. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf5023862>.

FU, M. S.; COELHO, C.; DE LEON-RODRIGUEZ, C. M.; ROSSI, D. C. P.; CAMACHO, E.; JUNG, E. H.; KULKARNI, M.; CASADEVALL, A. Cryptococcus neoformans urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. e1007144, 2018. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1007144>.

FUNG, H. B.; DOAN, T.-L. Tinidazole: A nitroimidazole antiprotozoal agent. **Clinical Therapeutics**, [s. l.], v. 27, n. 12, p. 1859–1884, 2005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149291805003243>.

GHANEM, H.; SIVASUBRAMANIAN, G. Cryptococcus neoformans Meningoencephalitis in an Immunocompetent Patient after COVID-19 Infection. **Case Reports in Infectious Diseases**, [s. l.], v. 2021, p. 1–3, 2021. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/cruid/2021/5597473/>.

GHOLIVAND, K.; POOYAN, M.; MOHAMMADPANA, F.; PIRASTEFAR, F.; JUNK, P. C.; WANG, J.; EBRAHIMI VALMOOZI, A. A.; MANI-VARNOSFADERANI, A. Synthesis, crystal structure and biological evaluation of new phosphoramidate derivatives as urease inhibitors using docking, QSAR and kinetic studies. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], v. 86, n. November 2018, p. 482–493, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.01.064>.

GRIFFITH, D. P.; GIBSON, J. R.; CLINTON, C. W.; MUSER, D. M. Acetohydroxamic Acid: Clinical Studies of a Urease Inhibitor in Patients With Staghorn Renal Calculi. **Journal of Urology**, [s. l.], v. 119, n. 1, p. 9–15, 1978. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)57366-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5347(17)57366-8).

GUPTA, M. K.; PANDEYA, S. N.; ZAIAD, G. M.; GANGWAR, V. S. Synthesis and anticonvulsant activity of halo-substituted aryl urea and thioureas. **Journal of India Chemical Society**, [s. l.], v. 87, p. 1411–1424, 2010.

GUSHIKEN, A. C.; SAHARIA, K. K.; BADDLEY, J. W. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 493–514, 2021.

HA, N. C.; OH, S. T.; SUNG, J. Y.; CHA, K. A.; LEE, M. H.; OH, B. H. Supramolecular assembly and acid resistance of Helicobacter pylori urease. **Nature Structural Biology**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 505–509, 2001.

HAFEEZ, M.; QURESHI, Z. A.; KHATTAK, A. L.; SAEED, F.; ASGHAR, A.; AZAM, K.; KHAN, M. A. Helicobacter Pylori Eradication Therapy: Still a Challenge. **Cureus**, [s. l.], v. 13, n. 5, 2021. Disponível em: <https://www.cureus.com/articles/48354-helicobacter-pylori-eradication-therapy-still-a-challenge>.

HAFEZ, E. A. A.; ELMOGHAYAR, M. R. H.; RAMIZ, M. M. M. A New, Convenient Synthesis of 1,6-Diaryl-2-thioxoperhydro-4-pyrimidinones: Reaction of 3-Phenyl-2-propenoyl Isothiocyanate With Aromatic and Heteroaromatic Amines. **Liebigs Annalen der Chemie**, [s. l.], v. 1987, n. 1, p. 65–67, 1987. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jlac.198719870111>.

HAN, Q.; GUO, X.; TANG, Z.; SU, L.; YAO, Z.; ZHANG, X.; LIN, S.; XIANG, S.; HUANG, Q. Rhodium-Catalyzed Regioselective Ortho C–H Olefination of 2-Arylindoles via NH-Indole-Directed C–H Bond Cleavage. **Advanced Synthesis & Catalysis**, [s. l.], v. 360, n. 5, p. 972–984, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adsc.201701381>.

HANIF, M.; SHOAB, K.; SALEEM, M.; HASAN RAMA, N.; ZAIB, S.; IQBAL, J. Synthesis, Urease Inhibition, Antioxidant, Antibacterial, and Molecular Docking Studies of 1,3,4-Oxadiazole Derivatives. **ISRN Pharmacology**, [s. l.], v. 2012, p. 1–9, 2012. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/928901/>.

HASSAN, I. N.; YAMIN, B. M.; KASSIM, M. B. Cinnamoylthiourea. **Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online**, [s. l.], v. 66, n. 11, p. o2796–o2796, 2010. Disponível em: <https://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S1600536810040018>.

HAY, M. P.; TURCOTTE, S.; FLANAGAN, J. U.; BONNET, M.; CHAN, D. A.; SUTPHIN, P. D.; NGUYEN, P.; GIACCIA, A. J.; DENNY, W. A. 4-Pyridylanilinothiazoles That Selectively Target von Hippel–Lindau Deficient Renal Cell Carcinoma Cells by Inducing Autophagic Cell Death. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 787–797, 2010. Disponível em: <https://medium.com/@arifwicaksanaa/pengertian-use-case-a7e576e1b6bf>.

HENRIQUE, I. K. S. **Síntese e avaliação antimicrobacteriana de oxazolidinonas planejadas por simplificação molecular**. 2020. 34 f. - Universidade Estadual de Londrina, [s. l.], 2020.

HERR, R. J.; KUHNER, J. L.; MECKLER, H.; OPALKA, C. J. A Convenient Method for the Preparation of Primary and Symmetrical N,N'-Disubstituted Thioureas. **Synthesis**, [s. l.], v. 2000, n. 11, p. 1569–1574, 2000. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2000-7607>.

HEVENER, K. E.; ZHAO, W.; BALL, D. M.; BABAOGU, K.; QI, J.; WHITE, S. W.; LEE, R. E. Validation of Molecular Docking Programs for Virtual Screening against Dihydropteroate Synthase. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], v.

49, n. 2, p. 444–460, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>.

HOMES, T. P.; MATTNER, F.; KELLER, P. A.; KATSIFIS, A. Synthesis and in vitro binding of N,N-dialkyl-2-phenylindol-3-yl-glyoxylamides for the peripheral benzodiazepine binding sites. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 3938–3946, 2006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089606000770>.

HOOI, J. K. Y.; LAI, W. Y.; NG, W. K.; SUEN, M. M. Y.; UNDERWOOD, F. E.; TANYINGOH, D.; MALFERTHEINER, P.; GRAHAM, D. Y.; WONG, V. W. S.; WU, J. C. Y.; CHAN, F. K. L.; SUNG, J. J. Y.; KAPLAN, G. G.; NG, S. C. Global Prevalence of Helicobacter pylori Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 153, n. 2, p. 420–429, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.022>.

HUANG, X.; LIU, Y.; LIN, Z.; WU, B.; NONG, G.; CHEN, Y.; LU, Y.; JI, X.; ZHOU, X.; SUO, B.; CHEN, Q.; WEI, J. Minimum inhibitory concentrations of commonly used antibiotics against Helicobacter Pylori: A multicenter study in South China. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. e0256225, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0256225>.

HUIZENGA, J. R.; TANGERMAN, A.; GIPS, C. H. Determination of Ammonia in Biological Fluids. **Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 529–543, 1994. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/000456329403100602>.

IARC MONOGRAPHS. **Biological agents: A review of human carcinogens**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2012. 2012.v. 100B.

IMRAN, M.; WAQAR, S.; OGATA, K.; AHMED, M.; NOREEN, Z.; JAVED, S.; BIBI, N.; BOKHARI, H.; AMJAD, A.; MUDDASSAR, M. Identification of novel bacterial urease inhibitors through molecular shape and structure based virtual screening approaches. **RSC Advances**, [s. l.], v. 10, n. 27, p. 16061–16070, 2020. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=D0RA02363A>.

ISAAC, SANGEETHA; AFRAZ PASHA, M.; ISAAC, SHALOM; LAL, A.; KYEINIMAKO, E. PULMONARY CRYPTOCOCCOSIS COMPLICATING POST-COVID-19 PULMONARY FIBROSIS. **Chest**, [s. l.], v. 160, n. 4, p. A467, 2021. Disponível em: <https://academic.oup.com/mmy/article/57/2/133/5133472>.

JABRI, E.; CARR, M.; HAUSINGER, R.; KARPLUS, P. The crystal structure of urease from Klebsiella aerogenes. **Science**, [s. l.], v. 268, n. 5213, p. 998–1004, 1995. Disponível em: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.7754395>.

JIANG, J.; KANG, H.; SONG, X.; HUANG, S.; LI, S.; XU, J. A Model of Interaction between Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) Oxidase and Apocynin Analogues by Docking Method. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 807–817, 2013. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/14/1/807>.

JONES, G.; JINDAL, A.; GHANI, U.; KOTELNIKOV, S.; EGBERT, M.; HASHEMI, N.; VAJDA, S.; PADHORN, D.; KOZAKOV, D. Elucidation of protein function using computational docking and hotspot analysis by ClusPro and FTMap. **Acta Crystallographica Section D Structural Biology**, [s. l.], v. 78, n. 6, p. 690–697, 2022. Disponível em: <https://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S2059798322002741>.

JOSE, E.; JISHA, M. S.; R, R. J.; MOL, A. A Brief Review on Biological Activities of Thiazolidinone Derivatives. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 472–484, 2021. Disponível em: [www.ijppr.humanjournals.com](http://www.ijppr.humanjournals.com).

KANWAL; KHAN, M.; ARSHIA; KHAN, K. M.; PARVEEN, S.; SHAIKH, M.; FATIMA, N.; CHOUDHARY, M. I. Syntheses, in vitro urease inhibitory activities of urea and thiourea derivatives of tryptamine, their molecular docking and cytotoxic studies. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], v. 83, n. October 2018, p. 595–610, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.10.070>.

KAO, C.-Y.; SHEU, B.-S.; WU, J.-J. Helicobacter pylori infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. **Biomedical Journal**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 14–23, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bj.2015.06.002>.

KAPPAUN, K.; PIOVESAN, A. R.; CARLINI, C. R.; LIGABUE-BRAUN, R. Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – A review. **Journal of Advanced Research**, [s. l.], v. 13, p. 3–17, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.05.010>.

KATARIA, R.; KHATKAR, A. In-silico Designing, ADMET Analysis, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Derivatives of Diosmin Against Urease Protein and Helicobacter pylori Bacterium. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 19, n. 29, p. 2658–2675, 2019. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/176700/article>.

KATARIA, R.; KHATKAR, A. Molecular docking, synthesis, kinetics study, structure–activity relationship and ADMET analysis of morin analogous as Helicobacter pylori urease inhibitors. **BMC Chemistry**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 45, 2019. Disponível em: <https://bmcchem.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13065-019-0562-2>.

KATRITZKY, A.; KIRICHENKO, N.; ROGOVOY, B.; KISTER, J.; TAO, H. Synthesis of Mono- and N,N - Disubstituted Thioureas and N -Acylothioureas. **Synthesis**, [s. l.], v. 2004, n. 11, p. 1799–1805, 2004. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2004-829127>.

KAUSHIK, Nagendra; KAUSHIK, Neha; ATTRI, P.; KUMAR, N.; KIM, C.; VERMA, A.; CHOI, E. Biomedical Importance of Indoles. **Molecules**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 6620–6662, 2013. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/18/6/6620>.

KAY, H. D. The Reversibility of the Action of Urease of Soy Bean. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 277–285, 1923.

KHAN, W.; ABBASI, M. A.; REHMAN, A.; SIDDIQUI, S. Z.; NAZIR, M.; ALI SHAH, S. A.; RAZA, H.; HASSAN, M.; SHAHID, M.; SEO, S. Y. Convergent synthesis, free

radical scavenging, Lineweaver-Burk plot exploration, hemolysis and in silico study of novel indole-phenyltriazole hybrid bearing acetamides as potent urease inhibitors. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, [s. l.], v. 57, n. 7, p. 2955–2968, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jhet.4006>.

KHAN, A.; HASHIM, J.; ARSHAD, N.; KHAN, I.; SIDDIQUI, N.; WADOOD, A.; ALI, M.; ARSHAD, F.; KHAN, K. M.; CHOUDHARY, M. I. Dihydropyrimidine based hydrazine dihydrochloride derivatives as potent urease inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], v. 64, p. 85–96, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.12.007>.

KHAN, I.; KHAN, A.; AHSAN HALIM, S.; SAEED, A.; MEHSUD, S.; CSUK, R.; AL-HARRASI, A.; IBRAR, A. Exploring biological efficacy of coumarin clubbed thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazoles as efficient inhibitors of urease: A biochemical and in silico approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 142, p. 345–354, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.105>.

KHAN, J. A.; WAHAB, A.; JAVAID, S.; AL-GHAMDI, M.; HUWAIT, E.; SHAIKH, M.; SHAFQAT, A.; CHOUDHARY, M. I. Studies on new urease inhibitors by using biochemical, STD-NMR spectroscopy, and molecular docking methods. **Medicinal Chemistry Research**, [s. l.], v. 26, n. 10, p. 2452–2467, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00044-017-1945-3>.

KHATIB, M. Y.; AHMED, A. A.; SHAAT, S. B.; MOHAMED, A. S.; NASHWAN, A. J. Cryptococemia in a patient with COVID-19: A case report. **Clinical Case Reports**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 853–855, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ccr3.3668>.

KHOMAMI, A.; RAHIMI, M.; TABEL, A.; SANIEE, P.; MAHBOUBI, A.; FOROUMADI, A.; KOOPAEI, N. N.; ALMASIRAD, A. Synthesis and Docking Study of Novel 4-Thiazolidinone Derivatives as Anti-Gram-positive and Anti-H. pylori Agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 239–249, 2019. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/166379/article>.

KIMBLE, K. W.; WALKER, J. P.; FINEGOLD, D. N.; ASHER, S. A. Progress toward the development of a point-of-care photonic crystal ammonia sensor. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 385, n. 4, p. 678–685, 2006. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-006-0453-y>.

KIRSCH, G.; ABDELWAHAB, A.; CHAIMBAULT, P. Natural and Synthetic Coumarins with Effects on Inflammation. **Molecules**, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 1322, 2016. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/10/1322>.

KOBASHI, K.; HASE, J.; UEHARA, K. Specific inhibition of urease by hydroxamic acids. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s. l.], v. 65, n. 2, p. 380–383, 1962. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006300262910673>.

KOZAKOV, D.; GROVE, L. E.; HALL, D. R.; BOHNUUD, T.; MOTTARELLA, S. E.; LUO, L.; XIA, B.; BEGLOV, D.; VAJDA, S. The FTMap family of web servers for determining and characterizing ligand-binding hot spots of proteins. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 733–755, 2015. Disponível em:

<http://www.nature.com/articles/nprot.2015.043>.

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

KRISTIAN, P.; KUTSCHY, P.; DZURILLA, M. Synthesis of 2,2,4-trisubstituted 2H-1,3-oxazetes from acyl isothiocyanates. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 1324–1333, 1979. Disponível em: <http://cccc.uochb.cas.cz/44/4/1324/>.

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

KUMAR, S.; RITIKA. A brief review of the biological potential of indole derivatives. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 121, 2020. Disponível em: <https://fjps.springeropen.com/articles/10.1186/s43094-020-00141-y>.

KUSTERS, J. G.; VAN VLIET, A. H. M.; KUIPERS, E. J. Pathogenesis of Helicobacter pylori Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 449–490, 2006. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00054-05>.

LARIK, F. A.; FAISAL, M.; SAEED, A.; CHANNAR, P. A.; KORABECNY, J.; JABEEN, F.; MAHAR, I. A.; KAZI, M. A.; ABBAS, Q.; MURTAZA, G.; KHAN, G. S.; HASSAN, M.; SEO, S.-Y. Investigation on the effect of alkyl chain linked mono-thioureas as Jack bean urease inhibitors, SAR, pharmacokinetics ADMET parameters and molecular docking studies. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], v. 86, n. February, p. 473–481, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.02.011>.

LEELANANDA, S. P.; LINDERT, S. Computational methods in drug discovery. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, [s. l.], v. 12, p. 2694–2718, 2016. Disponível em: <https://www.beilstein-journals.org/bjoc/articles/12/267>.

LI, W.-Y.; NI, W.-W.; YE, Y.-X.; FANG, H.-L.; PAN, X.-M.; HE, J.-L.; ZHOU, T.-L.; YI, J.; LIU, S.-S.; ZHOU, M.; XIAO, Z.-P.; ZHU, H.-L. N-monoarylaceto-thioureas as potent urease inhibitors: synthesis, SAR, and biological evaluation. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 404–413, 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14756366.2019.1706503>.

LI, Y.; ZOU, M.; YIN, J.; LIU, Z.; LU, B. Microbiological, Epidemiological, and Clinical Characteristics of Patients With Cryptococcal Meningitis at a Tertiary Hospital in China: A 6-Year Retrospective Analysis. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, n. July, p. 1–14, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.01837/full>.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 64, n. SUPPL., p. 4–17, 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X12002797>.

LIPPARD, S. At last--the crystal structure of urease. **Science**, [s. l.], v. 268, n. 5213, p. 996–997, 1995. Disponível em: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.7754394>.

LIU, Q.; SHI, W.-K.; REN, S.-Z.; NI, W.-W.; LI, W.-Y.; CHEN, H.-M.; LIU, P.; YUAN, J.; HE, X.-S.; LIU, J.-J.; CAO, P.; YANG, P.-Z.; XIAO, Z.-P.; ZHU, H.-L. Arylamino containing hydroxamic acids as potent urease inhibitors for the treatment of *Helicobacter pylori* infection. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 156, p. 126–136, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.06.065>.

MAGHSOUDI, S.; TAGHAVI SHAHRAKI, B.; RAMEH, F.; NAZARABI, M.; FATAHI, Y.; AKHAVAN, O.; RABIEE, M.; MOSTAFAVI, E.; LIMA, E. C.; SAEB, M. R.; RABIEE, N. A review on computer-aided chemogenomics and drug repositioning for rational COVID-19 drug discovery. **Chemical Biology & Drug Design**, [s. l.], v. 100, n. 5, p. 699–721, 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cbdd.14136>.

MAHMOOD, S.; NAZIR, Y.; SAEED, A.; ABBAS, Q.; ASHRAF, Z. Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Docking Studies of Novel Coumarinylthiazolyl Iminothiazolidinone Hybrids as Potent Urease Inhibitors. **ChemistrySelect**, [s. l.], v. 5, n. 18, p. 5387–5390, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/slct.202000429>.

MAIA, E. H. B.; ASSIS, L. C.; DE OLIVEIRA, T. A.; DA SILVA, A. M.; TARANTO, A. G. Structure-Based Virtual Screening: From Classical to Artificial Intelligence. **Frontiers in Chemistry**, [s. l.], v. 8, n. April, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2020.00343/full>.

MAIZURU, N.; INAMI, T.; KURAHASHI, T.; MATSUBARA, S. Nickel-Catalyzed Cycloaddition of Anthranilic Acid Derivatives to Alkynes. **Organic Letters**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 1206–1209, 2011. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ol200090g>.

MAMIDALA, R.; BHIMATHATI, S. R. S.; VEMA, A. Discovery of Novel Dihydropyrimidine and hydroxamic acid hybrids as potent *Helicobacter pylori* Urease inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], v. 114, n. January, p. 105010, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105010>.

MAO, W.-J.; LV, P.-C.; SHI, L.; LI, H.-Q.; ZHU, H.-L. Synthesis, molecular docking and biological evaluation of metronidazole derivatives as potent *Helicobacter pylori* urease inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 17, n. 21, p. 7531–7536, 2009.

MENTEŞE, E.; AKYÜZ, G.; YILMAZ, F.; BALTAŞ, N.; EMIRIK, M. Synthesis of some novel quinazolin-4(3 H)-one hybrid molecules as potent urease inhibitors. **Archiv der Pharmazie**, [s. l.], v. 351, n. 12, p. 1800182, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ardp.201800182>.

MENTEŞE, E.; BEKTAŞ, H.; SOKMEN, B. B.; EMIRIK, M.; ÇAKIR, D.; KAHVECİ, B. Synthesis and molecular docking study of some 5,6-dichloro-2-cyclopropyl-1 H - benzimidazole derivatives bearing triazole, oxadiazole, and imine functionalities as potent inhibitors of urease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s. l.], v. 27,

n. 13, p. 3014–3018, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X17304997>.

MENTEŞE, E.; EMIRIK, M.; SÖKMEN, B. B. Design, molecular docking and synthesis of novel 5,6-dichloro-2-methyl-1H-benzimidazole derivatives as potential urease enzyme inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], v. 86, p. 151–158, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045206818312768>.

MOBLEY, H. L. T.; ISLAND, M. D.; HAUSINGER, R. P. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiological Reviews**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 451–480, 1995.

MOENG, L. R.; MILBURN, J.; JARVIS, J. N.; LAWRENCE, D. S. HIV-associated Cryptococcal Meningitis: a Review of Novel Short-Course and Oral Therapies. **Current Treatment Options in Infectious Diseases**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 422–437, 2020. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s40506-020-00239-0>.

MOGHIMI, S.; MARYAM, F. G.; PILALI, H.; HASSANZADEH, M.; MAHERNIA, S.; MAHDAVI, M.; FIROOZPOUR, L.; AMANLOU, M.; FOROUMADI, A. Synthesis , evaluation , and molecular docking studies of aryl urea-triazole-based derivatives as anti-urease agents. [s. l.], n. May, p. 2–9, 2018.

MOHAMMED, T. M.; K. SNIGDHA; ABDULLAH, A. M.; SOBAHI, T. R.; ASAD, M. Green synthesis of chromonyl chalcone and pyrazoline as potential antimicrobial agents – DFT, molecular docking and antimicrobial studies. **Journal of Molecular Structure**, [s. l.], v. 1271, p. 133993, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022286022016453>.

NAIN-PEREZ, A.; BARBOSA, L. C. A.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, D.; MOTA, Y. C. C.; SILVA, T. F.; RAMALHO, T. C.; MODOLO, L. V. Antiureolytic Activity of Substituted 2,5-Diaminobenzoquinones. **Chemistry & Biodiversity**, [s. l.], v. 16, n. 12, p. 2–9, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.201900503>.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6 edição. Porto Alegre: Artimed, 2014. 2014.

NGAN, C.-H.; HALL, D. R.; ZERBE, B.; GROVE, L. E.; KOZAKOV, D.; VAJDA, S. FTSite: high accuracy detection of ligand binding sites on unbound protein structures. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 286–287, 2012. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btr651>.

NORDLANDER, E.; CARLSSON, H. Computational modeling of the mechanism of urease. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, [s. l.], v. 2010, n. February, 2010.

NUHA, D.; EVREN, A. E.; KAPUSIZ, Ö.; GÜL, Ü. D.; GUNDOGDU-KARABURUN, N.; KARABURUN, A. Ç.; BERBER, H. Design, synthesis, and antimicrobial activity of novel coumarin derivatives: An in-silico and in-vitro study. **Journal of Molecular Structure**, [s. l.], v. 1272, p. 134166, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.134166>.

OLIVEIRA, F. A. A. de. **Síntese e avaliação antibacteriana de derivados do**

**carvacrol**. 2020. 127 f. - Universidade Estadual de Londrina, Londrina 2020.

OLSZEWSKI, M. A.; NOVERR, M. C.; CHEN, G.-H.; TOEWS, G. B.; COX, G. M.; PERFECT, J. R.; HUFFNAGLE, G. B. Urease Expression by *Cryptococcus neoformans* Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. **The American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 164, n. 5, p. 1761–1771, 2004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010637340>.

PAPADOPOULOS, J. S.; AGARWALA, R. COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 23, n. 9, p. 1073–1079, 2007. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btm076>.

PAPAMICHAEL, E. M.; STAMATIS, H.; STERGIU, P.-Y.; FOUKIS, A.; GKINI, O. A. Enzyme Kinetics and Modeling of Enzymatic Systems. *In*: ADVANCES IN ENZYME TECHNOLOGY. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 71–104. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00003-0>.

PARK, L.-S.; HAUSINGER, R. P. Requirement of carbon dioxide for in vitro assembly of the urease nickel metalcenter. **Science**, [s. l.], v. 267, n. 5201, p. 1156–1158, 1995. Disponível em: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.7855593>.

PEREIRA, P. M. L.; CAMARGO, P. G.; FERNANDES, B. T.; FLORES-JUNIOR, L. A. P.; DIAS, L. R. S.; LIMA, C. H. S.; PINGE-FILHO, P.; LIONI, L. M. Y.; YAMADA-OGATTA, S. F.; BISPO, M. L. F.; MACEDO JR, F. In vitro evaluation of antitrypanosomal activity and molecular docking of benzoylthioureas. **Parasitology International**, [s. l.], v. 80, n. November 2020, p. 102225, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102225>.

PERFECT, J. R.; DISMUKES, W. E.; DROMER, F.; GOLDMAN, D. L.; GRAYBILL, J. R.; HAMILL, R. J.; HARRISON, T. S.; LARSEN, R. A.; LORTHOLARY, O.; NGUYEN, M.-H.; PAPPAS, P. G.; POWDERLY, W. G.; SINGH, N.; SOBEL, J. D.; SORRELL, T. C. Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 291–322, 2010. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article/50/3/291/392360>.

POLACCO, J. C.; HOLLAND, M. A. Roles of Urease in Plant Cells. **International Review of Cytology**, [s. l.], v. 145, n. C, p. 65–103, 1993.

PRIETO-MARTÍNEZ, F. D.; ARCINIEGA, M.; MEDINA-FRANCO, J. L. Molecular docking: current advances and challenges. **TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**, [s. l.], v. 21, p. 65–87, 2018. Disponível em: <http://tip.zaragoza.unam.mx/index.php/tip/article/view/143>.

QIN, Y.; CABRAL, J. M. S. Review Properties and Applications of Urease. **Biocatalysis and Biotransformation**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1–14, 2002. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10242420210154>.

RAFIQ, M.; SALEEM, M.; JABEEN, F.; HANIF, M.; SEO, S.-Y.; KANG, S. K.; LEE, K. H. Facile synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of novel substituted azole derivatives. **Journal of Molecular Structure**, [s. l.], v. 1138, p. 177–191, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022286017302740>.

RAUF, A.; SHAHZAD, S.; BAJDA, M.; YAR, M.; AHMED, F.; HUSSAIN, N.; AKHTAR, M. N.; KHAN, A.; JONCZYK, J. Design and synthesis of new barbituric- and thiobarbituric acid derivatives as potent urease inhibitors: Structure activity relationship and molecular modeling studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 23, n. 17, p. 6049–6058, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089615004484>.

REZAEI, E. B.; ABEDINIFAR, F.; AZIZIAN, H.; MONTAZER, M. N.; ASADI, M.; HOSSEINI, S.; SEPEHRI, S.; MOHAMMADI-KHANAPOSHTANI, M.; BIGLAR, M.; LARIJANI, B.; AMANLOU, M.; MAHDAVI, M. Design, synthesis, and evaluation of metronidazole-1,2,3-triazole derivatives as potent urease inhibitors. **Chemical Papers**, [s. l.], v. 75, n. 8, p. 4217–4226, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11696-021-01653-4>.

RIAZ, N.; IFTIKHAR, M.; SALEEM, M.; AZIZ-UR-REHMAN; AHMED, I.; ASHRAF, M.; SHAHNAWAZ; REHMAN, J.; AL-RASHIDA, M. A novel method for the synthesis of 1,2,4-triazole-derived heterocyclic compounds: enzyme inhibition and molecular docking studies. **Journal of the Iranian Chemical Society**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 1183–1200, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13738-019-01848-3>.

RICHTER, M. F.; DROWN, B. S.; RILEY, A. P.; GARCIA, A.; SHIRAI, T.; SVEC, R. L.; HERGENROTHER, P. J. Predictive compound accumulation rules yield a broad-spectrum antibiotic. **Nature**, [s. l.], v. 545, n. 7654, p. 299–304, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature22308>.

RIDDLES, P. W.; WHAN, V.; BLAKELEY, R. L.; ZERNER, B. Cloning and sequencing of a jack bean urease-encoding cDNA. **Gene**, [s. l.], v. 108, n. 2, p. 265–267, 1991.

SAEED, A.; LARIK, F. A.; CHANNAR, P. A.; MEHFOOZ, H.; ASHRAF, M. H.; ABBAS, Q.; HASSAN, M.; SEO, S.-Y. An expedient synthesis of N-(1-(5-mercapto-4-((substituted benzylidene)amino)-4 H-1,2,4-triazol-3-yl)-2-phenylethyl)benzamides as jack bean urease inhibitors and free radical scavengers: Kinetic mechanism and molecular docking studies. **Chemical Biology & Drug Design**, [s. l.], v. 90, n. 5, p. 764–777, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cbdd.12998>.

SAEED, A.; MAHESAR, P. A.; CHANNAR, P. A.; LARIK, F. A.; ABBAS, Q.; HASSAN, M.; RAZA, H.; SEO, S.-Y. Hybrid Pharmacophoric Approach in the Design and Synthesis of Coumarin Linked Pyrazolinyl as Urease Inhibitors, Kinetic Mechanism and Molecular Docking. **Chemistry & Biodiversity**, [s. l.], v. 14, n. 8, p. e1700035, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.201700035>.

SAEED, A.; MAHMOOD, S.; RAFIQ, M.; ASHRAF, Z.; JABEEN, F.; SEO, S.-Y. Iminothiazoline-Sulfonamide Hybrids as Jack Bean Urease Inhibitors; Synthesis,

Kinetic Mechanism and Computational Molecular Modeling. **Chemical Biology & Drug Design**, [s. l.], v. 87, n. 3, p. 434–443, 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cbdd.12675>.

SAEED, A.; REHMAN, S.; CHANNAR, P. A.; LARIK, F. A.; ABBAS, Q.; HASSAN, M.; RAZA, H.; FLÖRKE, U.; SEO, S.-Y. Long chain 1-acyl-3-arylthioureas as jack bean urease inhibitors, synthesis, kinetic mechanism and molecular docking studies. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, [s. l.], v. 77, p. 54–63, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876107017302286>.

SAHU, S.; SAHOO, P. R.; PATEL, S.; MISHRA, B. K. Oxidation of Arylthiourea by Cetyltrimethylammonium Dichromate. **Synthetic Communications**, [s. l.], v. 40, n. 21, p. 3268–3273, 2010. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00397910903398684>.

SAKAI, N.; ANNAKA, K.; FUJITA, A.; SATO, A.; KONAKAHARA, T. InBr<sup>3</sup>-Promoted Divergent Approach to Polysubstituted Indoles and Quinolines from 2-Ethynylanilines: Switch from an Intramolecular Cyclization to an Intermolecular Dimerization by a Type of Terminal Substituent Group. **The Journal of Organic Chemistry**, [s. l.], v. 73, n. 11, p. 4160–4165, 2008. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jo800464u>.

SALCEDO, J. A.; AL-KAWAS, F. Treatment of Helicobacter pylori Infection. **Archives of Internal Medicine**, [s. l.], v. 158, n. 8, p. 842, 1998. Disponível em: <http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archinte.158.8.842>.

SALEM, M. A.; HELAL, M. H.; GOUDA, M. A.; AMMAR, Y. A.; EL-GABY, M. S. A.; ABBAS, S. Y. An overview on synthetic strategies to coumarins. **Synthetic Communications**, [s. l.], v. 48, n. 13, p. 1534–1550, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00397911.2018.1455873>.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A Cluster Analysis Method for Grouping Means in the Analysis of Variance. **Biometrics**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 507, 1974. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/2529204?origin=crossref>.

SETIANINGRUM, F.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; DENNING, D. W. Pulmonary cryptococcosis: A review of pathobiology and clinical aspects. **Medical Mycology**, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 133–150, 2019. Disponível em: <https://academic.oup.com/mmy/article/57/2/133/5133472>.

SHAH, M. I. A.; KHAN, R.; ARFAN, M.; WADOOD, A.; GHUFRAN, M. Synthesis, in vitro urease inhibitory activity and molecular docking of 3,5-disubstituted thiadiazine-2-thiones. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, [s. l.], v. 56, n. 11, p. 3073–3080, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jhet.3705>.

SHARMA, A.; KUNWAR, S.; VAISHALI; AGARWAL, V.; SINGH, C.; SHARMA, M. D.; CHAUHAN, N. Molecular Docking: An Explanatory Approach in Structure-Based Drug Designing and Discovery. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 6–12, 2021. Disponível em: <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijpps/article/view/40830>.

SILVA, F. C. Q. da. **Síntese de derivados contendo o núcleo cumarínico e**

**avaliação do seu potencial antituberculose.** 2018. 33 f. - Universidade Estadual de Londrina, Londrina 2018.

SILVA, W. da. **Síntese de derivados indólicos com potencial atividade antimicobacteriana.** 2020. 89 f. - Universidade Estadual de Londrina, Londrina 2020.

SILVERIO, C. C. **Síntese de oxazolidinonas com potencial atividade contra a tuberculose.** 2019. 81 f. - Universidade Estadual de Londrina, Londrina 2019.

SINGH, A.; PANTING, R. J.; VARMA, A.; SAIJO, T.; WALDRON, K. J.; JONG, A.; NGAMSKULRUNGROJ, P.; CHANG, Y. C.; RUTHERFORD, J. C.; KWON-CHUNG, K. J. Factors Required for Activation of Urease as a Virulence Determinant in *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 1–11, 2013. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.00220-13>.

SLIWOSKI, G.; KOTHIWALE, S.; MEILER, J.; LOWE, E. W. Computational Methods in Drug Discovery. **Pharmacological Reviews**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 334–395, 2014. Disponível em: <http://pharmrev.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/pr.112.007336>.

SOHRABI, M.; NAZARI MONTAZER, M.; FARID, S. M.; TANIDEH, N.; DIANATPOUR, M.; MOAZZAM, A.; ZOMORODIAN, K.; YAZDANPANAH, S.; ASADI, M.; HOSSEINI, S.; BIGLAR, M.; LARIJANI, B.; AMANLOU, M.; BARAZANDEH TEHRANI, M.; IRAJI, A.; MAHDAVI, M. Design and synthesis of novel nitrothiazolacetamide conjugated to different thioquinazolinone derivatives as anti-urease agents. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 2003, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05736-4>.

SONG, L.; ZHANG, H.-J.; DENG, A.-J.; LI, J.; LI, X.; LI, Z.-H.; ZHANG, Z.-H.; WU, L.-Q.; WANG, S.-Q.; QIN, H.-L. Syntheses and structure-activity relationships on antibacterial and anti-ulcerative colitis properties of quaternary 13-substituted palmatines and 8-oxo-13-substituted dihydropalmatines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 26, n. 9, p. 2586–2598, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.04.025>.

SPADARI, C. de C.; WIRTH, F.; LOPES, L. B.; ISHIDA, K. New Approaches for Cryptococcosis Treatment. **Microorganisms**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 613, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/4/613>.

STEFANSKA, J.; PAWLICZAK, R. Apocynin: Molecular aptitudes. **Mediators of Inflammation**, [s. l.], v. 2008, 2008.

STOTHARD, P. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript Programs for Analyzing and Formatting Protein and DNA Sequences. **BioTechniques**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 1102–1104, 2000. Disponível em: <https://www.future-science.com/doi/10.2144/00286ir01>.

SUMNER, J. B. THE ISOLATION AND CRYSTALLIZATION OF THE ENZYME UREASE. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 435–441, 1926. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925818845604>.

SUN, J.; MU, J.; WANG, S.; JIA, C.; LI, D.; HUA, H.; CAO, H. Design and synthesis of

chromone-nitrogen mustard derivatives and evaluation of anti-breast cancer activity. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 437–450, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14756366.2021.2018685>.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21660>.

SURABHI, S.; SINGH, B. Computer Aided Drug Design: An Overview. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 504–509, 2018. Disponível em: <http://jddtonline.info/index.php/jddt/article/view/1894>.

SUYOGA, V. D. M.; SHANTHARAM, C. S.; SUHAS, R.; SRIDHARA, M. B.; CHANNE, G. D. Synthesis and urease inhibition studies of ureas and thioureas derived from amino acids conjugated heterocycle. **International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 54–58, 2013. Disponível em: [http://www.ijcps.com/sub\\_pages/vol4issue3.html](http://www.ijcps.com/sub_pages/vol4issue3.html).

TAHA, M.; RAHIM, F.; KHAN, A. A.; ANOUAR, E. H.; AHMED, N.; SHAH, S. A. A.; IBRAHIM, M.; ZAKARI, Z. A. Synthesis of diindolylmethane (DIM) bearing thiadiazole derivatives as a potent urease inhibitor. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 7969, 2020. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-020-64729-3>.

TAWA, G. J.; BABER, J. C.; HUMBLET, C. Computation of 3D queries for ROCS based virtual screens. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, [s. l.], v. 23, n. 12, p. 853–868, 2009. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10822-009-9302-3>.

TESTA, B.; KRÄMER, S. D. The Biochemistry of Drug Metabolism - An Introduction. **Chemistry & Biodiversity**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 257–405, 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.200790032>.

TOPLIS, B.; BOSCH, C.; SCHWARTZ, I. S.; KENYON, C.; BOEKHOUT, T.; PERFECT, J. R.; BOTHA, A. The virulence factor urease and its unexplored role in the metabolism of *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Research**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 1–14, 2020. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsyr/article/doi/10.1093/femsyr/foaa031/5850754>.

TOPLIS, B.; BOSCH, C.; STANDER, M.; TAYLOR, M.; PERFECT, J. R.; BOTHA, A. A link between urease and polyamine metabolism in *Cryptococcus neoformans*. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 158, n. July, p. 105076, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105076>.

TRAVER, E. C.; MALAVÉ SÁNCHEZ, M. Pulmonary aspergillosis and cryptococcosis as a complication of COVID-19. **Medical Mycology Case Reports**, [s. l.], v. 35, n. January, p. 22–25, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211753922000033>.

TRIPATHI, M. K.; SHARMA, P.; TRIPATHI, A.; TRIPATHI, P. N.; SRIVASTAVA, P.;

SETH, A.; SHRIVASTAVA, S. K. Computational exploration and experimental validation to identify a dual inhibitor of cholinesterase and amyloid-beta for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, [s. l.], v. 34, n. 9, p. 983–1002, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10822-020-00318-w>.

TSAY, F.; HSU, P. H. pylori infection and extra-gastrointestinal diseases. **Journal of Biomedical Science**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 65, 2018. Disponível em: <https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-018-0469-6>.

VANJARE, B. D.; MAHAJAN, P. G.; DIGE, N. C.; RAZA, H.; HASSAN, M.; SEO, S.-Y.; LEE, K. H. Synthesis of novel xanthene based analogues: Their optical properties, jack bean urease inhibition and molecular modelling studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 241, p. 118667, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118667>.

VEBER, D. F.; JOHNSON, S. R.; CHENG, H.-Y.; SMITH, B. R.; WARD, K. W.; KOPPLE, K. D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 2002. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm020017n>.

WANG, X.; SONG, K.; LI, L.; CHEN, L. Structure-Based Drug Design Strategies and Challenges. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 18, n. 12, p. 998–1006, 2018. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/164647/article>.

WANG, Z.; SUN, H.; YAO, X.; LI, D.; XU, L.; LI, Y.; TIAN, S.; HOU, T. Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein–ligand complexes: the prediction accuracy of sampling power and scoring power. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [s. l.], v. 18, n. 18, p. 12964–12975, 2016. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6CP01555G>.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 39, n. 8, p. 971–974, 1967. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60252a045>.

WIGGERS, H. J.; ROCHA, J. R.; CHELESKI, J.; MONTANARI, C. A. Integration of ligand- and target-based virtual screening for the discovery of cruzain inhibitors. **Molecular Informatics**, [s. l.], v. 30, n. 6–7, p. 565–578, 2011.

WIRTH, F.; DE AZEVEDO, M. I.; PILLA, C.; AQUINO, V. R.; NETO, G. W.; GOLDANI, L. Z. Relationship between intracranial pressure and antifungal agents levels in the CSF of patients with cryptococcal meningitis. **Medical Mycology**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. 257–262, 2018. Disponível em: <https://academic.oup.com/mmy/article/56/3/257/4060561>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on the diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children: supplement to the 2016 consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2018. 2018.

XIAO, M. L.; CHEN, F. H.; CHEN, Z. J.; GUO, B. S.; LV, X. H.; TANG, W. M. Facile synthesis of thiourea derivatives in ionic liquid. **Chinese Chemical Letters**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 258–260, 2007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S100184170700037X>.

XIAO, Z.-P.; PENG, Z.-Y.; DONG, J.-J.; DENG, R.-C.; WANG, X.-D.; OUYANG, H.; YANG, P.; HE, J.; WANG, Y.-F.; ZHU, M.; PENG, X.-C.; PENG, W.-X.; ZHU, H.-L. Synthesis, molecular docking and kinetic properties of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -phenylpropionyl-hydroxamic acids as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 68, p. 212–221, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.07.047>.

XIAO, Z.-P.; PENG, Z.-Y.; DONG, J.-J.; HE, J.; OUYANG, H.; FENG, Y.-T.; LU, C.-L.; LIN, W.-Q.; WANG, J.-X.; XIANG, Y.-P.; ZHU, H.-L. Synthesis, structure–activity relationship analysis and kinetics study of reductive derivatives of flavonoids as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 63, p. 685–695, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.03.016>.

YADAVA, U. Search algorithms and scoring methods in protein-ligand docking. **Endocrinology&Metabolism International Journal**, [s. l.], v. 6, n. 6, 2018. Disponível em: <https://medcraveonline.com/EMIJ/search-algorithms-and-scoring-methods-in-protein-ligand-docking.html>.

YAMAMOTO, Y.; HAKKI, A.; FRIEDMAN, H.; OKUBO, S.; SHIMAMURA, T.; HOFFMAN, P. S.; ROSSIGNOL, J.-F. Nitazoxanide, a Nitrothiazolide Antiparasitic Drug, Is an Anti-*Helicobacter pylori* Agent with Anti-Vacuolating Toxin Activity. **Chemotherapy**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 303–312, 1999. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/7200>.

YANG, Y.-S.; SU, M.-M.; ZHANG, X.-P.; LIU, Q.-X.; HE, Z.-X.; XU, C.; ZHU, H.-L. Developing potential *Helicobacter pylori* urease inhibitors from novel oxoindoline derivatives: Synthesis, biological evaluation and in silico study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s. l.], v. 28, n. 19, p. 3182–3186, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X18307029>.

YUAN, C.; ADELOYE, D.; LUK, T. T.; HUANG, L.; HE, Y.; XU, Y.; YE, X.; YI, Q.; SONG, P.; RUDAN, I. The global prevalence of and factors associated with *Helicobacter pylori* infection in children: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Child & Adolescent Health**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 185–194, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352464221004004>.

ZARAGOZA, O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 490–501, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1614383>.

ZHANG, M. Weighted clustering ensemble: A review. **Pattern Recognition**, [s. l.], v. 124, p. 108428, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003132032100604X>.

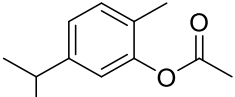
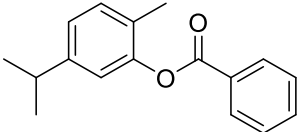
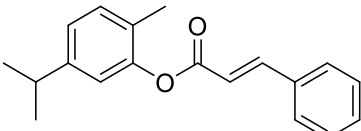
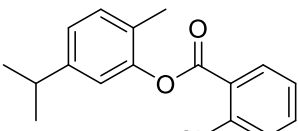
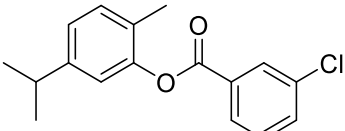
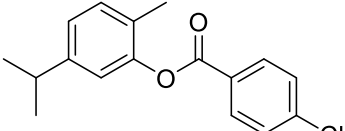
ZHAO, Q.; XIN, L.; LIU, Y.; LIANG, C.; LI, J.; JIAN, Y.; LI, H.; SHI, Z.; LIU, H.; CAO, W. Current Landscape and Future Perspective of Oxazolidinone Scaffolds Containing Antibacterial Drugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 64, n. 15, p. 10557–10580, 2021. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.1c00480>.

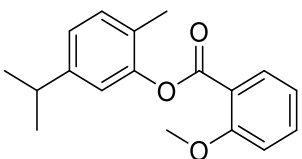
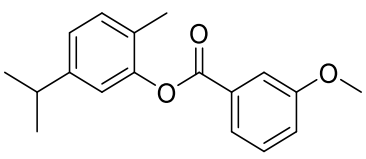
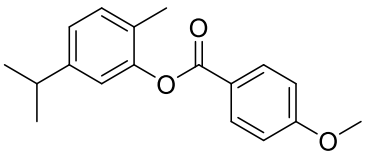
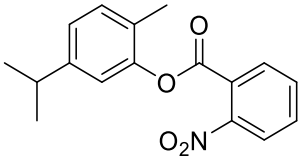
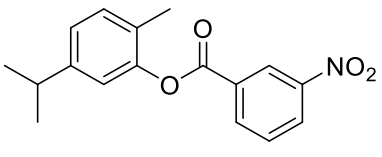
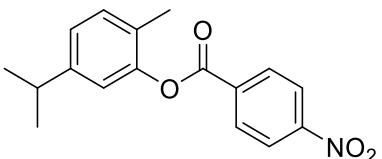
**APÊNDICES**

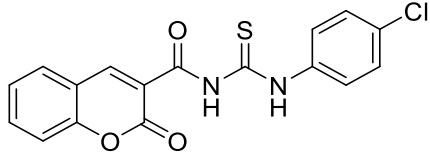
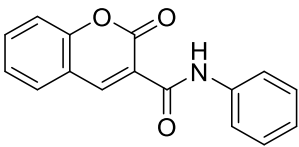
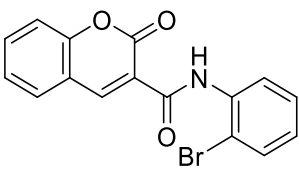
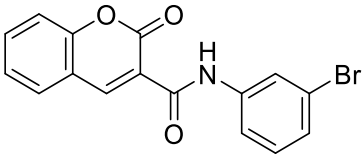
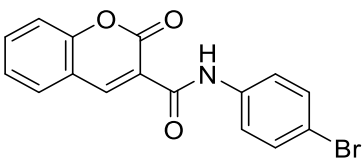
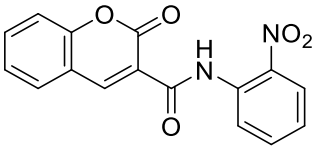
<b>APÊNDICE A</b>	<b>173</b>
ESTRUTURAS 2D DAS SUBSTÂNCIAS QUIMIOTECA DO LASMMED TRIADAS VIRTUALMENTE	173
<b>APÊNDICE B</b>	<b>194</b>
ESPECTROS DAS SUBSTÂNCIAS DA QUIMIOTECA DO LASMMED NÃO PUBLICADOS	194
<b>APÊNDICE C</b>	<b>213</b>
REDOCAGEM DO HAE, CONSIDERANDO A POSSIBILIDADE DE PERMUTAÇÃO DOS TAUTÔMEROS DAS HISTIDINAS	213
<b>APÊNDICE D</b>	<b>219</b>
ESTRUTURAS 2D DAS SUBSTÂNCIAS DA LITERATURA TRIADAS VIRTUALMENTE	219
<b>APÊNDICE E</b>	<b>275</b>
INTERAÇÕES OBSERVADAS NA DOCAGEM MOLECULAR DAS SUBSTÂNCIAS DA QUIMIOTECA DO LASMMED COM A UREASE DE <i>CANAVALIA ENSIFORMIS</i>	275
<b>APÊNDICE F</b>	<b>290</b>
INTERAÇÕES OBSERVADAS NA DOCAGEM MOLECULAR DAS SUBSTÂNCIAS DA QUIMIOTECA DO LASMMED NA UREASE DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	290
<b>APÊNDICE G</b>	<b>305</b>
INTERAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS DA LITERATURA COM A UREASE DE <i>CANAVALIA ENSIFORMIS</i>	305
<b>APÊNDICE H</b>	<b>383</b>
SEMELHANÇA ENTRE AS UREASES	383
<b>APÊNDICE I</b>	<b>384</b>
ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO	384

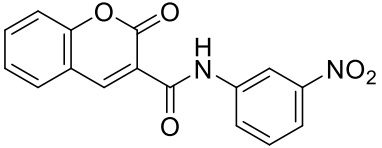
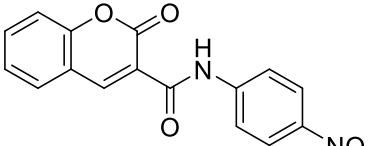
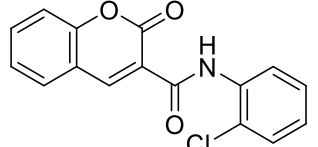
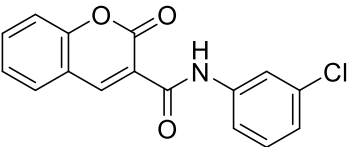
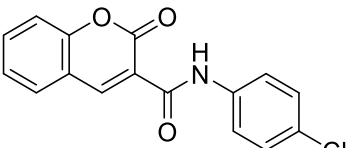
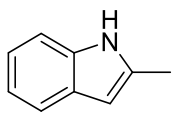
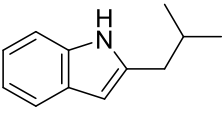
## APÊNDICE A

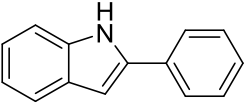
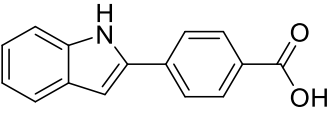
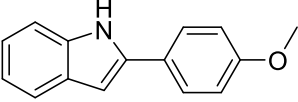
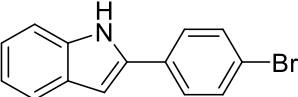
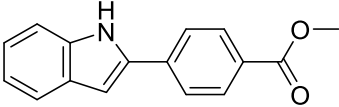
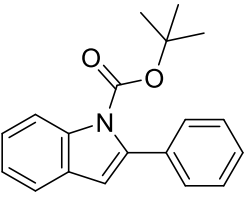
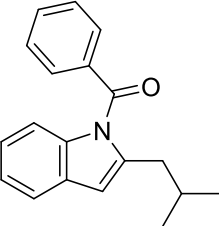
Estruturas 2D das substâncias quimioteca do LaSMMed triadas virtualmente

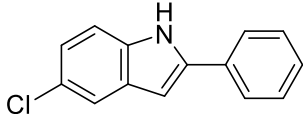
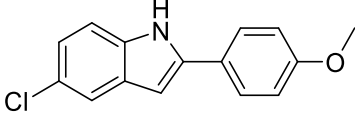
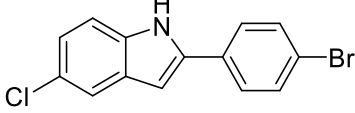
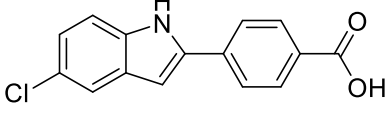
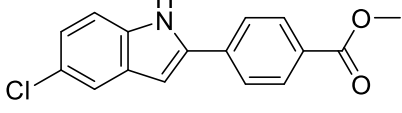
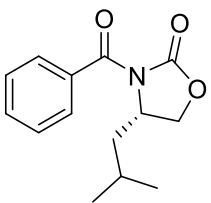
Substância (estrutura 2D/ nome)	Classe química
 LaSMMed01	Carvacrol
 LaSMMed02	Carvacrol
 LaSMMed03	Carvacrol
 LaSMMed04	Carvacrol
 LaSMMed05	Carvacrol
 LaSMMed06	Carvacrol

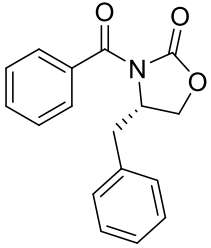
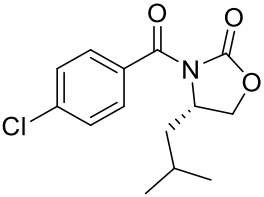
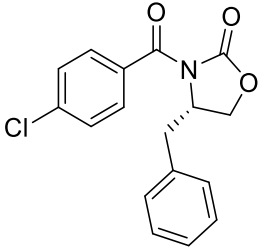
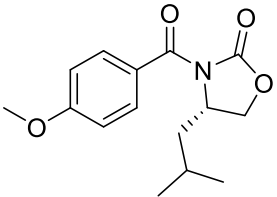
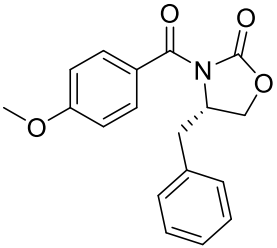
 <p>LaSMMed07</p>	Carvacrol
 <p>LaSMMed08</p>	Carvacrol
 <p>LaSMMed09</p>	Carvacrol
 <p>LaSMMed10</p>	Carvacrol
 <p>LaSMMed11</p>	Carvacrol
 <p>LaSMMed12</p>	Carvacrol

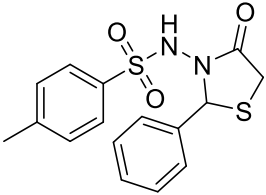
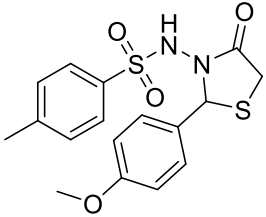
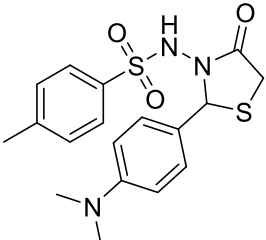
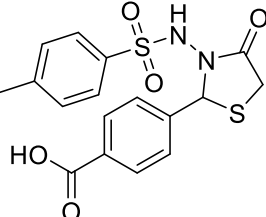
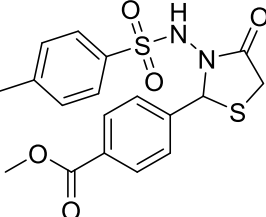
 <p>LaSMMed13</p>	Cumariltiourea
 <p>LaSMMed14</p>	Cumarilamida
 <p>LaSMMed15</p>	Cumarilamida
 <p>LaSMMed16</p>	Cumarilamida
 <p>LaSMMed17</p>	Cumarilamida
 <p>LaSMMed18</p>	Cumarilamida

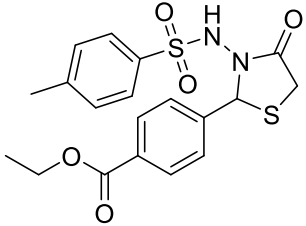
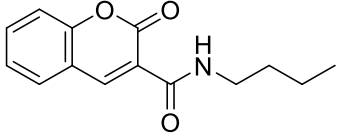
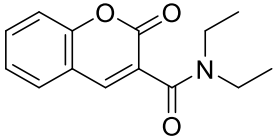
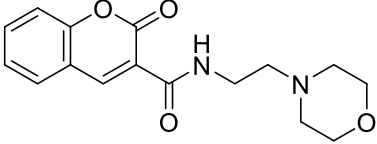
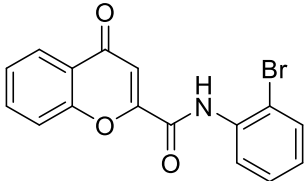
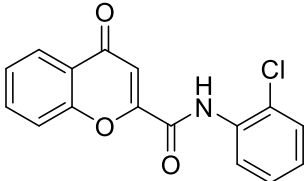
 <p>LaSMMed19</p>	Cumarilamida
 <p>LaSMMed20</p>	Cumarilamida
 <p>LaSMMed21</p>	Cumarilamida
 <p>LaSMMed22</p>	Cumarilamida
 <p>LaSMMed23</p>	Cumarilamida
 <p>LaSMMed24</p>	Indol
 <p>LaSMMed25</p>	Indol

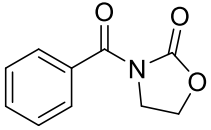
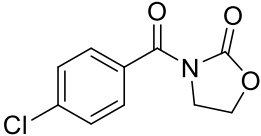
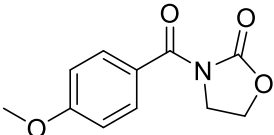
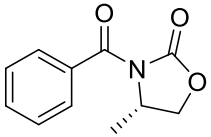
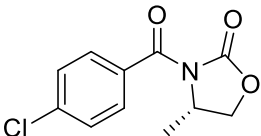
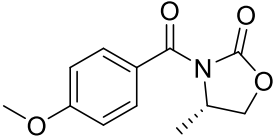
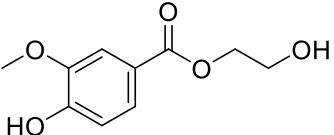
 <p>LaSMMed26</p>	Indol
 <p>LaSMMed27</p>	Indol
 <p>LaSMMed28</p>	Indol
 <p>LaSMMed29</p>	Indol
 <p>LaSMMed30</p>	Indol
 <p>LaSMMed31</p>	Indol
 <p>LaSMMed32</p>	Indol

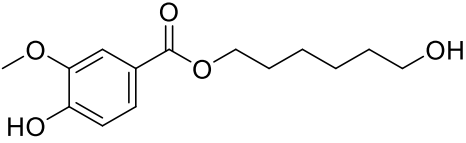
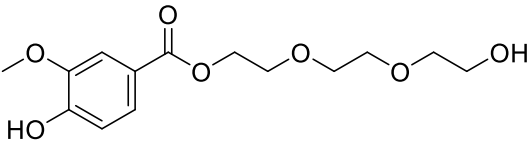
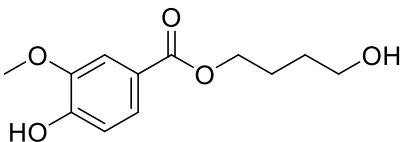
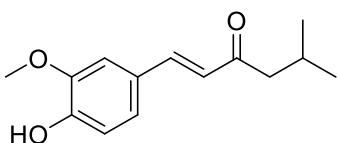
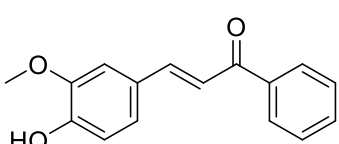
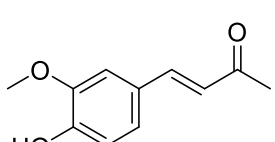
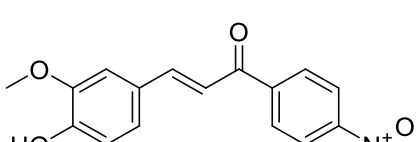
 <p>LaSMMed33</p>	Indol
 <p>LaSMMed34</p>	Indol
 <p>LaSMMed35</p>	Indol
 <p>LaSMMed36</p>	Indol
 <p>LaSMMed37</p>	Indol
 <p>LaSMMed38</p>	Oxazolidinona

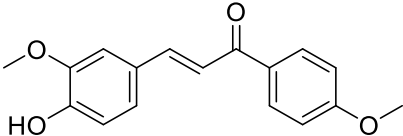
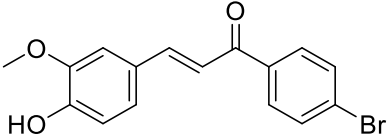
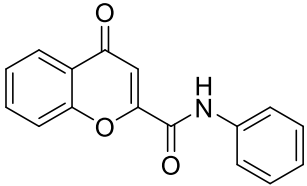
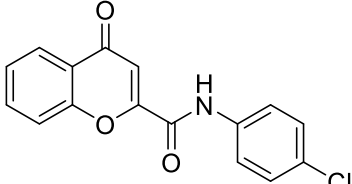
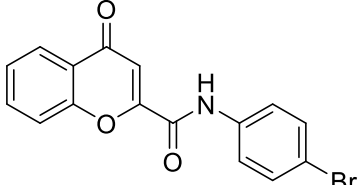
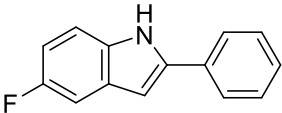
 <p>LaSMMed39</p>	Oxazolidinona
 <p>LaSMMed40</p>	Oxazolidinona
 <p>LaSMMed41</p>	Oxazolidinona
 <p>LaSMMed42</p>	Oxazolidinona
 <p>LaSMMed43</p>	Oxazolidinona

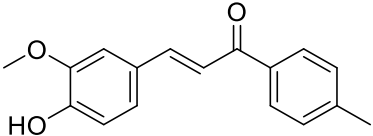
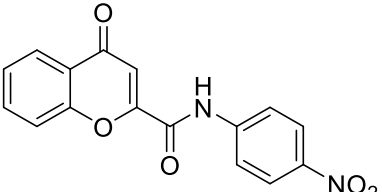
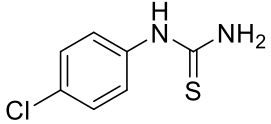
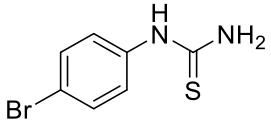
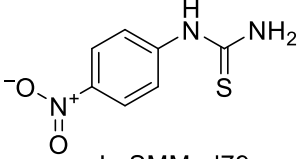
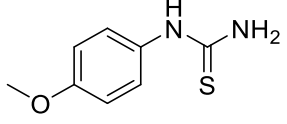
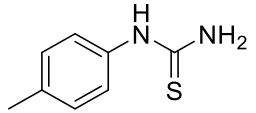
 <p>LaSMMed44</p>	Tiazolidinona
 <p>LaSMMed45</p>	Tiazolidinona
 <p>LaSMMed46</p>	Tiazolidinona
 <p>LaSMMed47</p>	Tiazolidinona
 <p>LaSMMed48</p>	Tiazolidinona

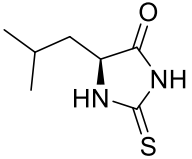
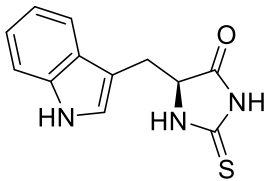
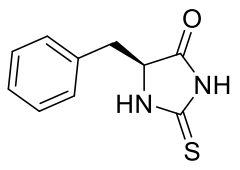
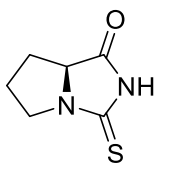
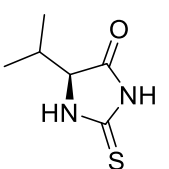
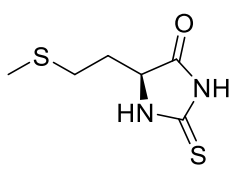
 <p>LaSMMed49</p>	Tiazolidinona
 <p>LaSMMed50</p>	Cumarilamida
 <p>LaSMMed51</p>	Cumarilamida
 <p>LaSMMed52</p>	Cumarilamida
 <p>LaSMMed53</p>	Cromona
 <p>LaSMMed54</p>	Cromona

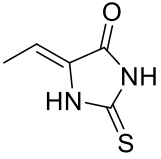
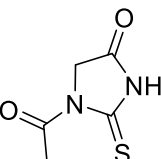
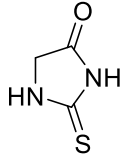
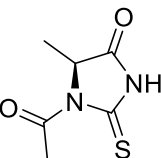
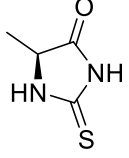
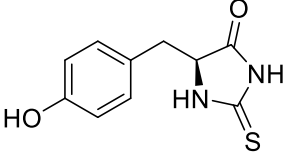
 <p>LaSMMed55</p>	Oxazolidinona
 <p>LaSMMed56</p>	Oxazolidinona
 <p>LaSMMed57</p>	Oxazolidinona
 <p>LaSMMed58</p>	Oxazolidinona
 <p>LaSMMed59</p>	Oxazolidinona
 <p>LaSMMed60</p>	Oxazolidinona
 <p>LaSMMed61</p>	Análogo éster de apocinina

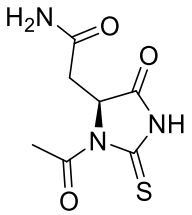
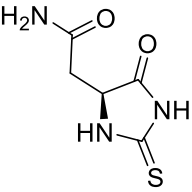
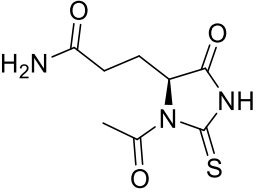
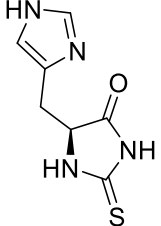
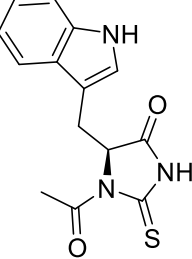
 <p>LaSMMed62</p>	Análogo éster de apocinina
 <p>LaSMMed63</p>	Análogo éster de apocinina
 <p>LaSMMed64</p>	Análogo éster de apocinina
 <p>LaSMMed65</p>	Análogo $\alpha,\beta$ -insaturado de apocinina
 <p>LaSMMed66</p>	Análogo $\alpha,\beta$ -insaturado de apocinina
 <p>LaSMMed67</p>	Análogo $\alpha,\beta$ -insaturado de apocinina
 <p>LaSMMed68</p>	Análogo $\alpha,\beta$ -insaturado de apocinina

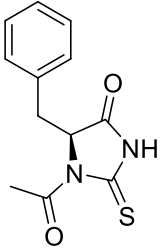
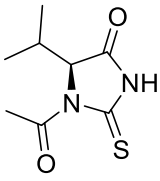
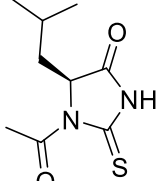
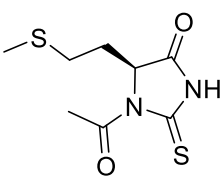
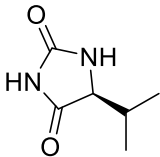
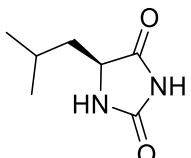
 <p>LaSMMed69</p>	Análogo $\alpha,\beta$ -insaturado de apocinina
 <p>LaSMMed70</p>	Análogo $\alpha,\beta$ -insaturado de apocinina
 <p>LaSMMed71</p>	Cromona
 <p>LaSMMed72</p>	Cromona
 <p>LaSMMed73</p>	Cromona
 <p>LaSMMed74</p>	Indol

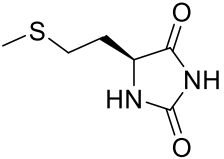
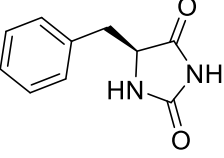
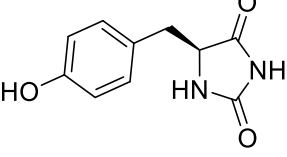
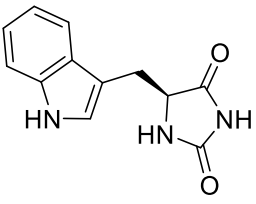
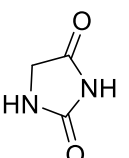
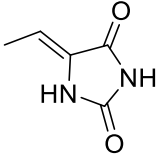
 <p>LaSMMed75</p>	Análogo $\alpha,\beta$ -insaturado de apocinina
 <p>LaSMMed76</p>	Cromona
 <p>LaSMMed77</p>	Ariltioureia
 <p>LaSMMed78</p>	Ariltioureia
 <p>LaSMMed79</p>	Ariltioureia
 <p>LaSMMed80</p>	Ariltioureia
 <p>LaSMMed81</p>	Ariltioureia

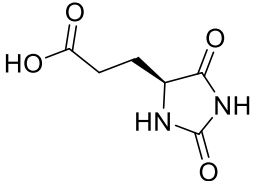
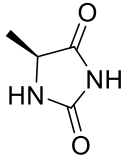
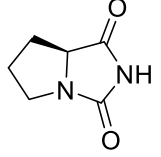
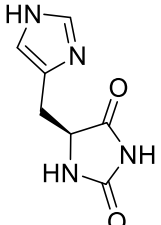
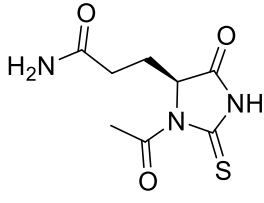
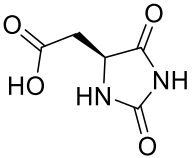
 <p>LAPSSO168</p>	Tiohidantoína
 <p>LAPSSO169</p>	Tiohidantoína
 <p>LAPSSO170</p>	Tiohidantoína
 <p>LAPSSO171</p>	Tiohidantoína
 <p>LAPSSO172</p>	Tiohidantoína
 <p>LAPSSO173</p>	Tiohidantoína

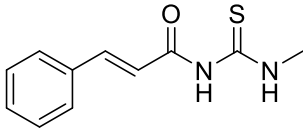
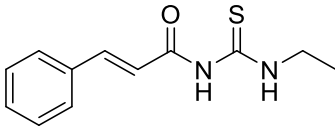
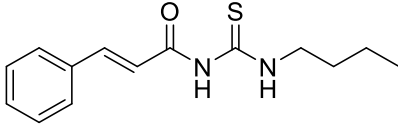
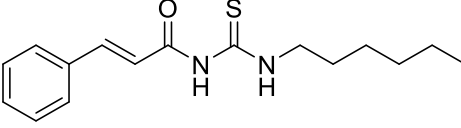
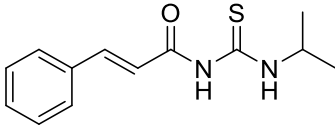
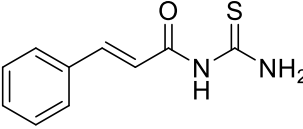
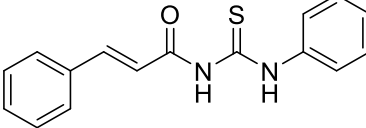
 LAPSSO174	Tiohidantoína
 LAPSSO175	Tiohidantoína
 LAPSSO176	Tiohidantoína
 LAPSSO177	Tiohidantoína
 LAPSSO178	Tiohidantoína
 LAPSSO179	Tiohidantoína

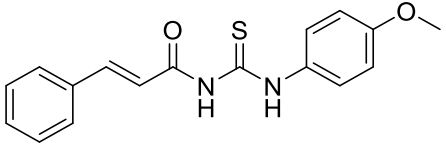
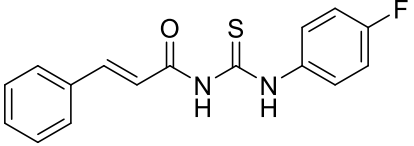
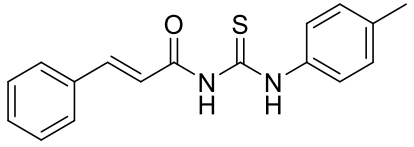
 <p>LAPSSO180</p>	Tiohidantoína
 <p>LAPSSO181</p>	Tiohidantoína
 <p>LAPSSO182</p>	Tiohidantoína
 <p>LAPSSO183</p>	Tiohidantoína
 <p>LAPSSO184</p>	Tiohidantoína

 <p>LAPSSO185</p>	Tiohidantoína
 <p>LAPSSO186</p>	Tiohidantoína
 <p>LAPSSO187</p>	Tiohidantoína
 <p>LAPSSO188</p>	Tiohidantoína
 <p>LAPSSO189</p>	Hidantoína
 <p>LAPSSO190</p>	Hidantoína

 <p>LAPSSO191</p>	Hidantoína
 <p>LAPSSO192</p>	Hidantoína
 <p>LAPSSO193</p>	Hidantoína
 <p>LAPSSO194</p>	Hidantoína
 <p>LAPSSO195</p>	Hidantoína
 <p>LAPSSO196</p>	Hidantoína

 <p>LAPSSO197</p>	Hidantoína
 <p>LAPSSO198</p>	Hidantoína
 <p>LAPSSO199</p>	Hidantoína
 <p>LAPSSO200</p>	Hidantoína
 <p>LAPSSO201</p>	Tiohidantoína
 <p>LAPSSO202</p>	Hidantoína

 <p>LAPSSO203</p>	Cinamoiltioureia
 <p>LAPSSO204</p>	Cinamoiltioureia
 <p>LAPSSO205</p>	Cinamoiltioureia
 <p>LAPSSO206</p>	Cinamoiltioureia
 <p>LAPSSO207</p>	Cinamoiltioureia
 <p>LAPSSO208</p>	Cinamoiltioureia
 <p>LAPSSO209</p>	Cinamoiltioureia

 <p>LAPSSO210</p>	Cinamoiltiureia
 <p>LAPSSO211</p>	Cinamoiltiureia
 <p>LAPSSO212</p>	Cinamoiltiureia

## APÊNDICE B

Espectros das substâncias da quimioteca do LaSMMed não publicados

Figura B1 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do LaSMMed 34

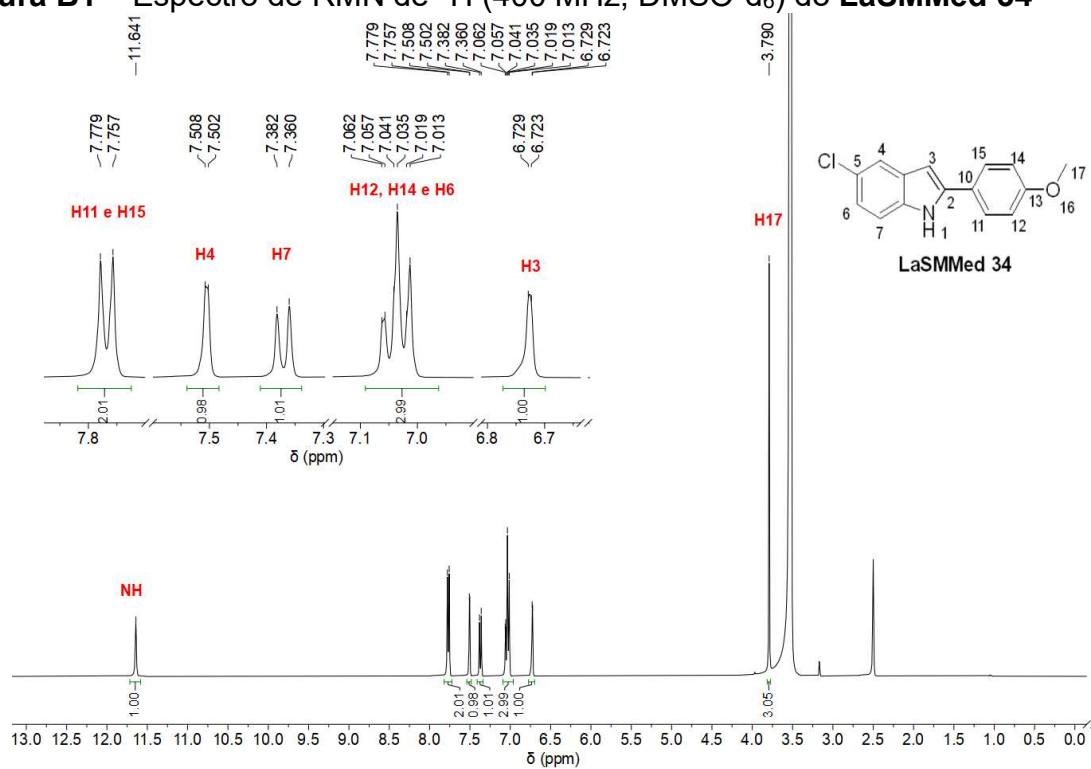


Figura B2 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do LaSMMed 34

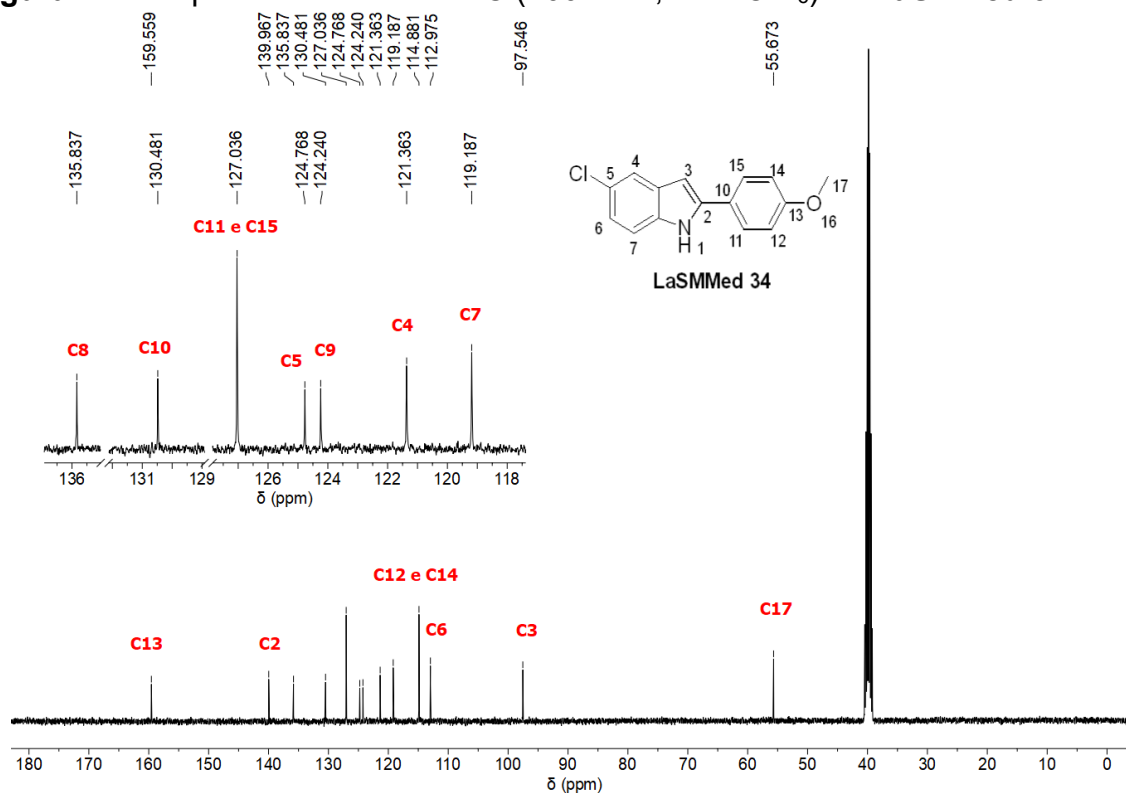


Figura B3 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do LaSMMed 35

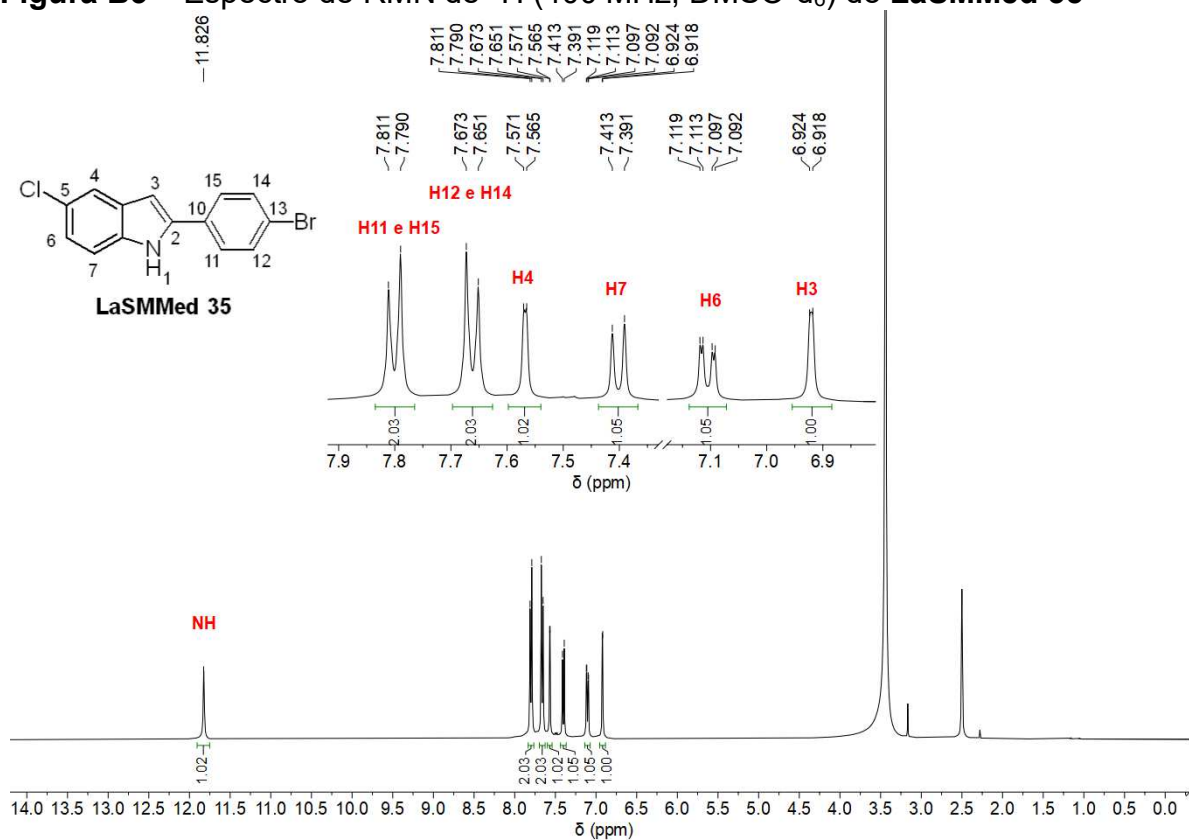


Figura B4 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do LaSMMed 35

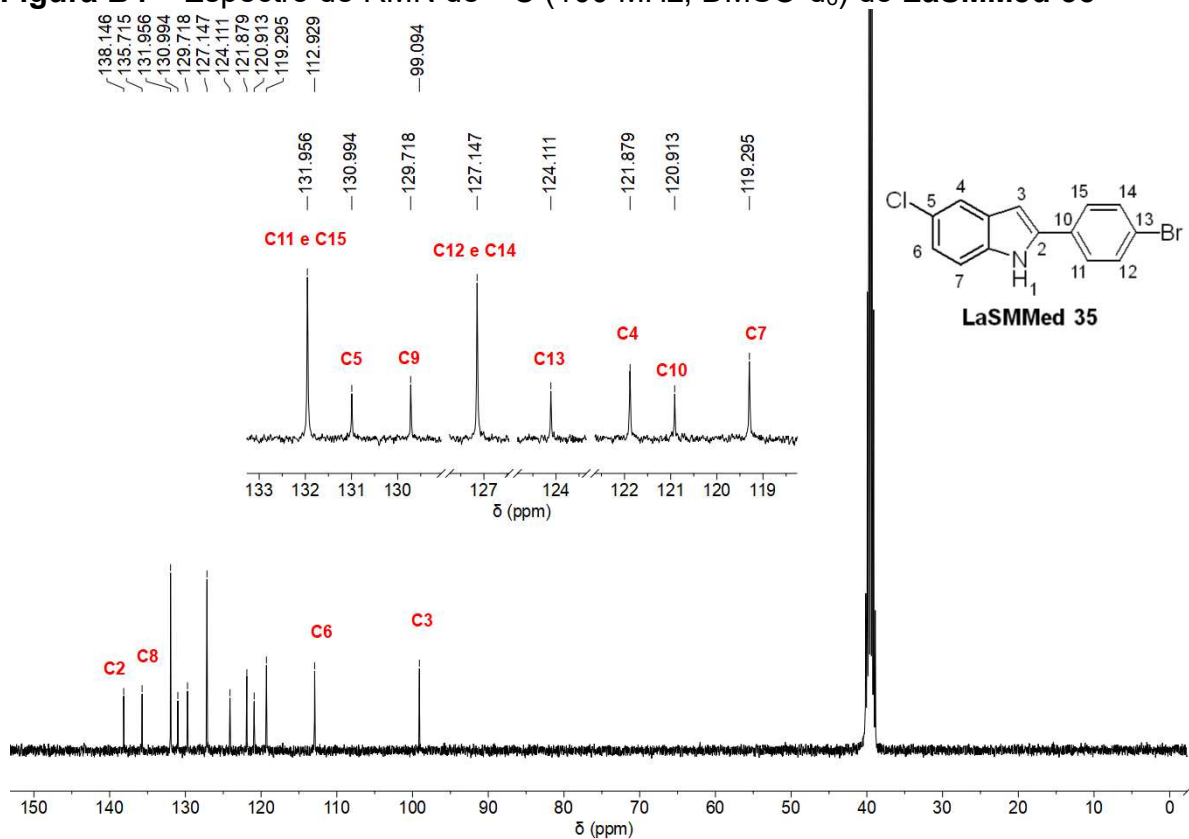


Figura B5 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do LaSMMed 36

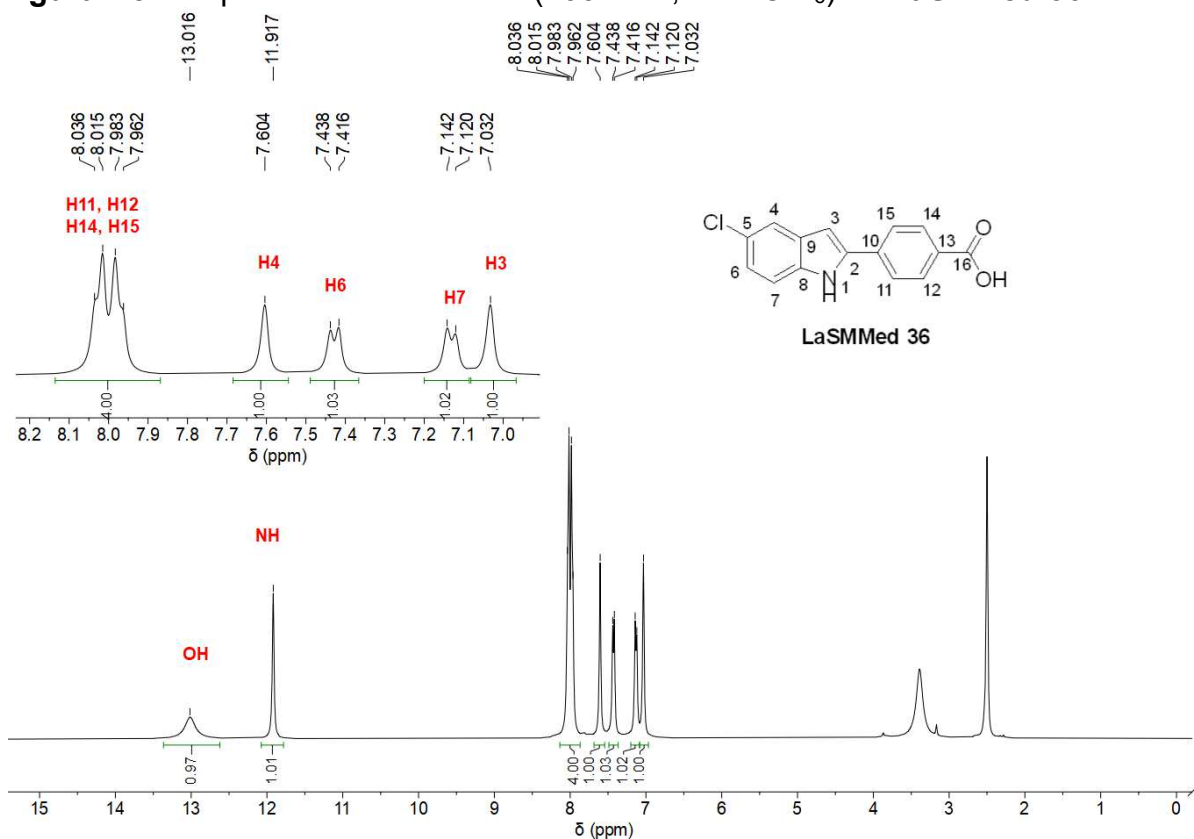


Figura B6 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do LaSMMed 36

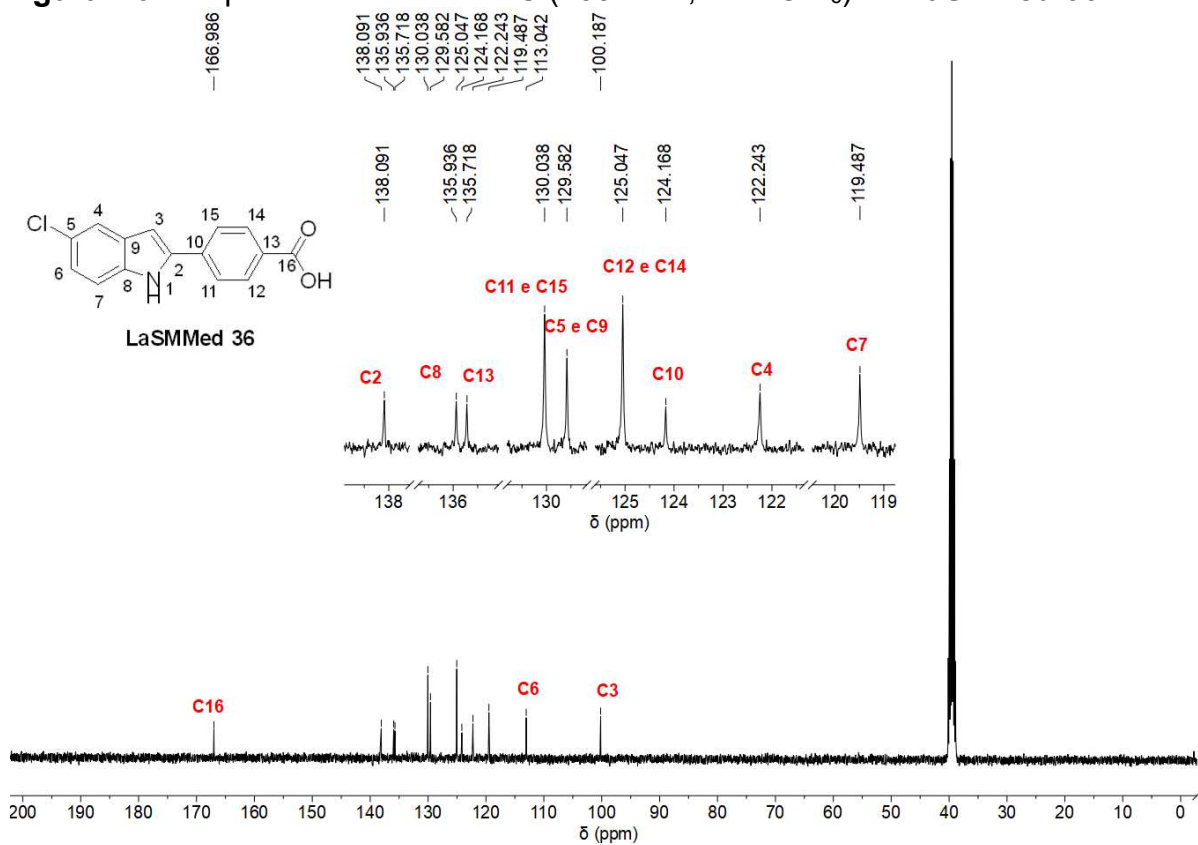


Figura B7 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do LaSMMed 37

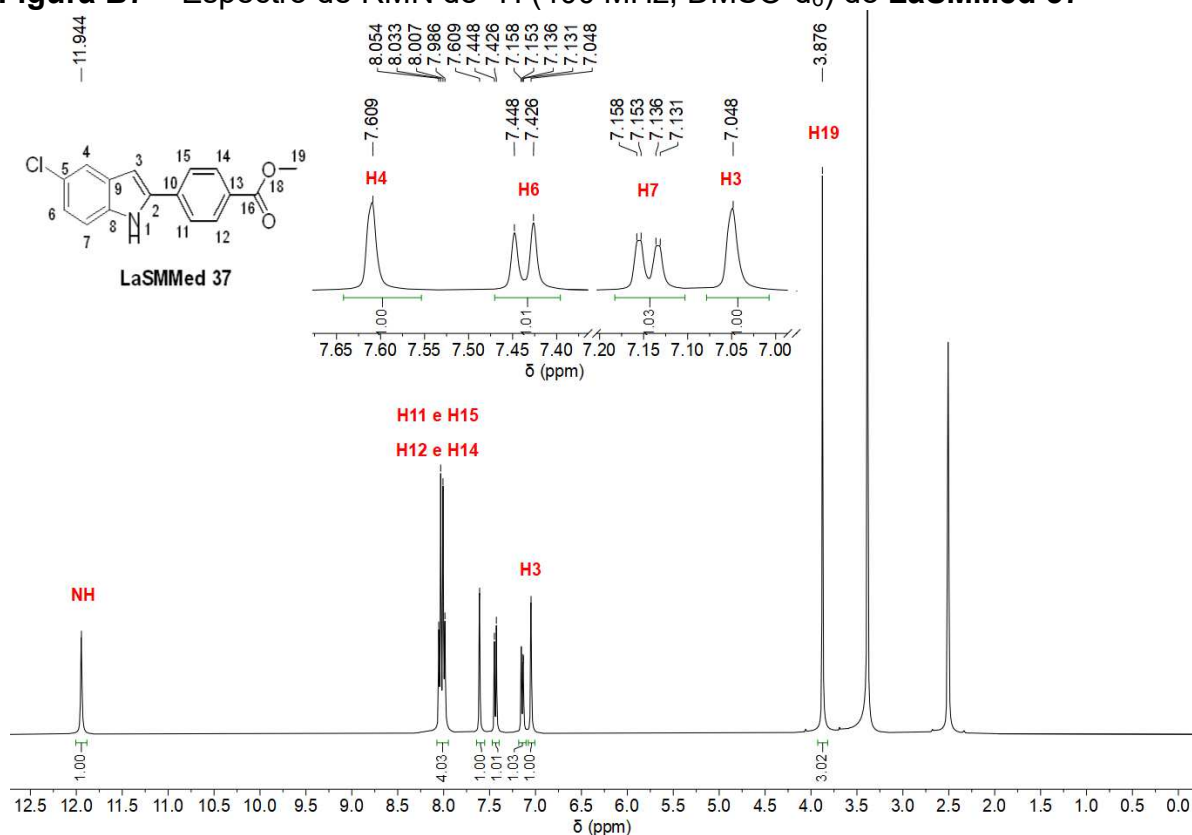


Figura B8 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do LaSMMed 37

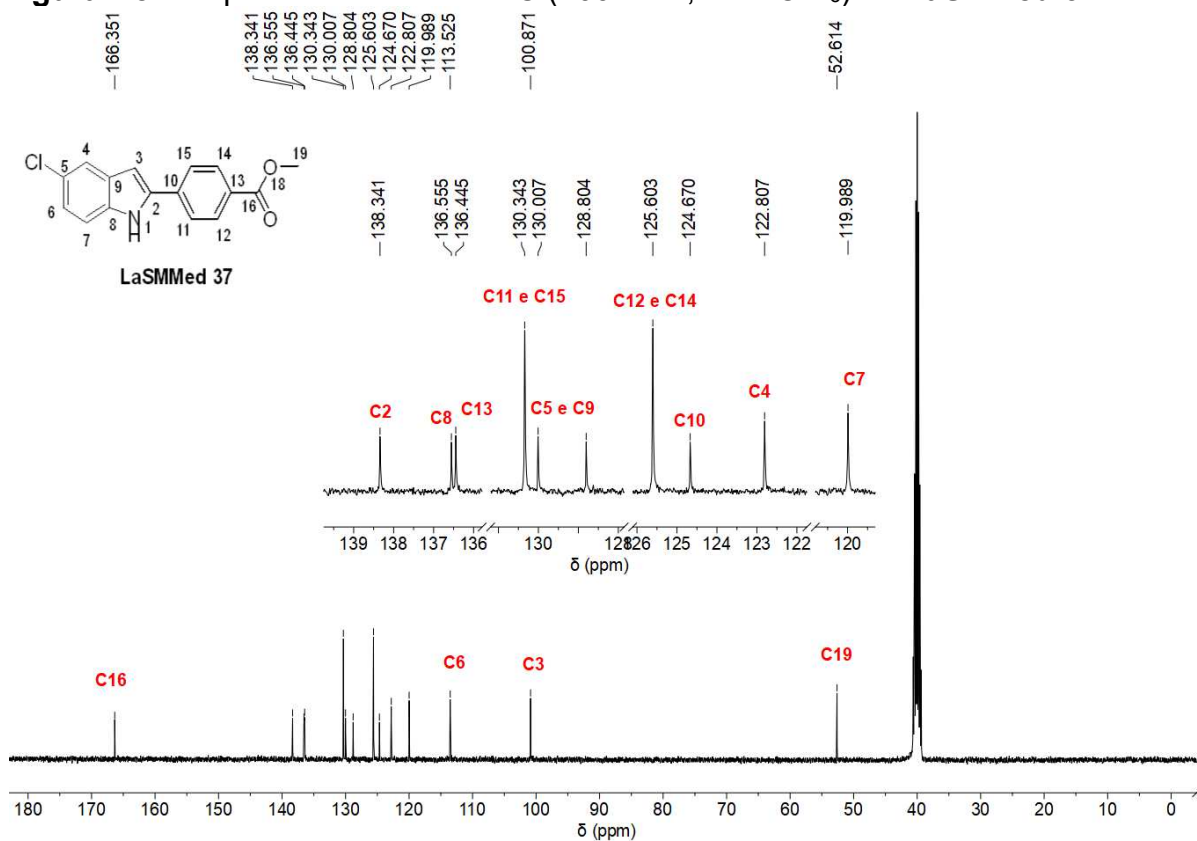


Figura B9 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do LaSMMed 74

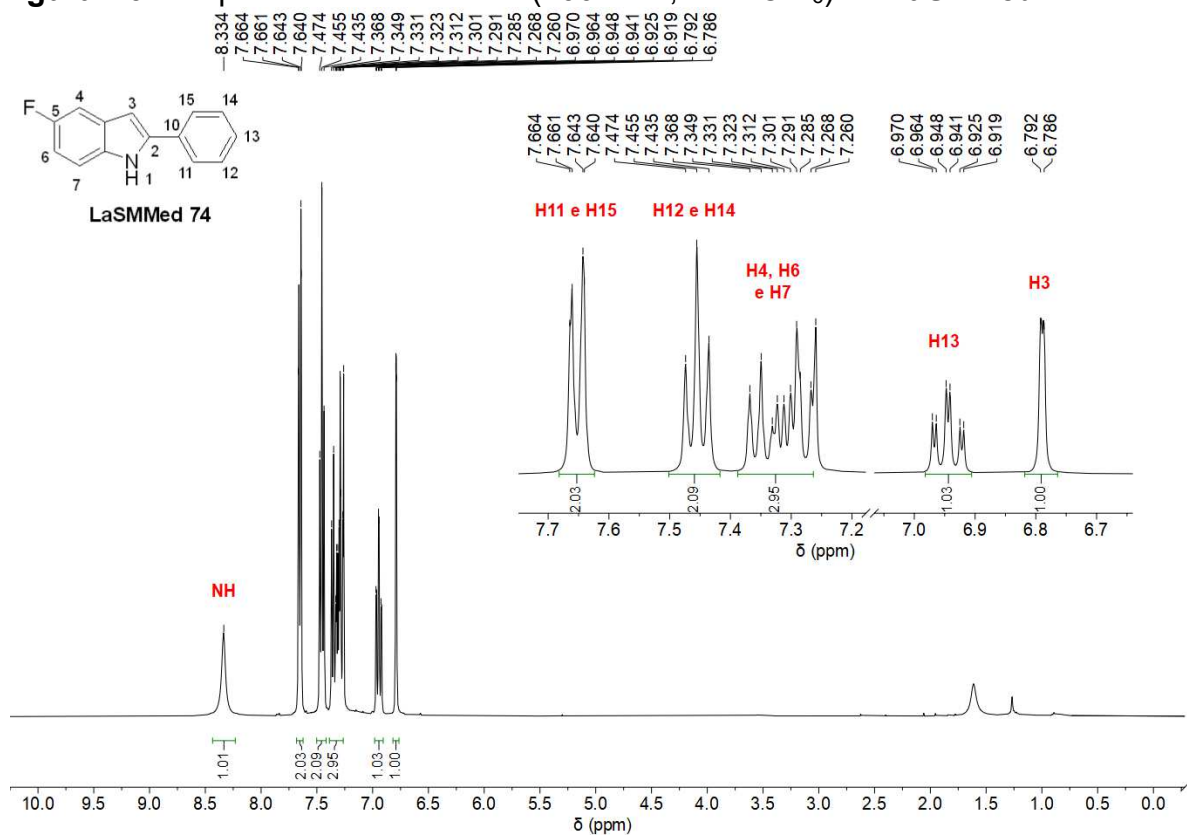


Figura B10 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do LaSMMed 74

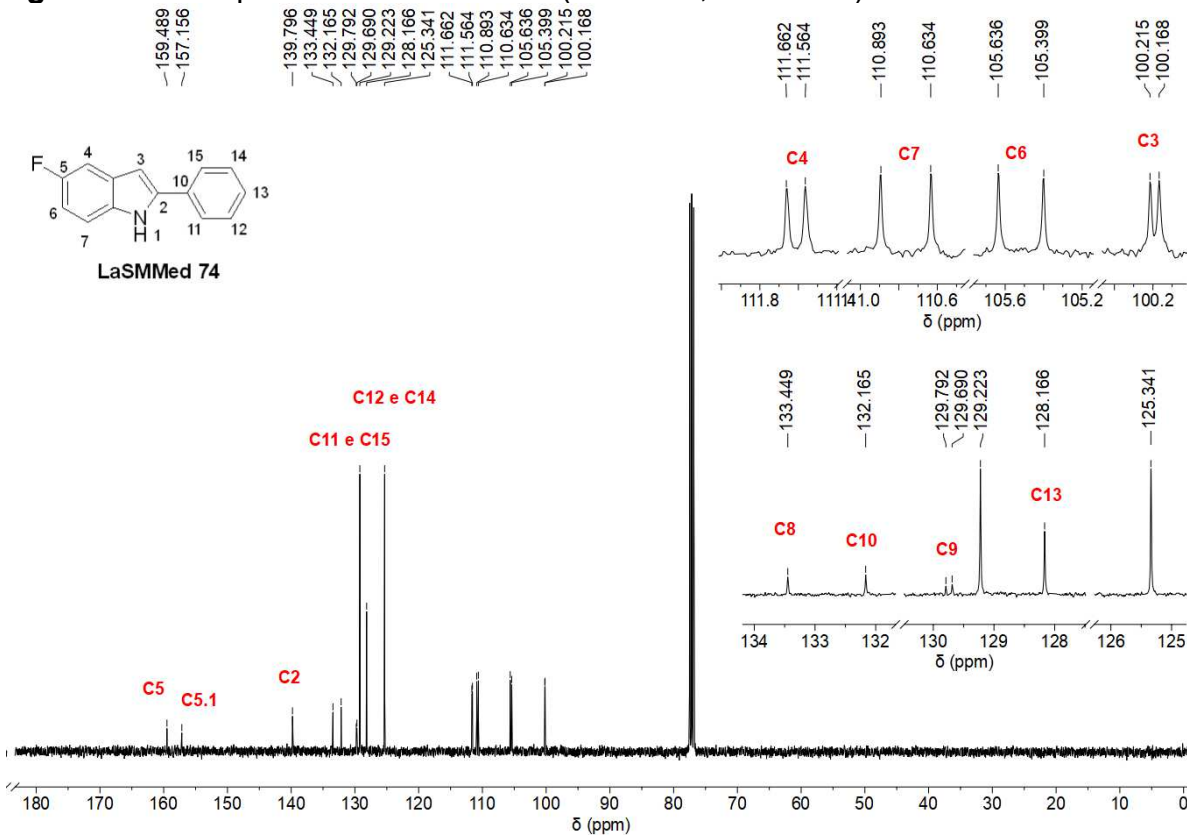


Figura B11 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do LaSMMed 77

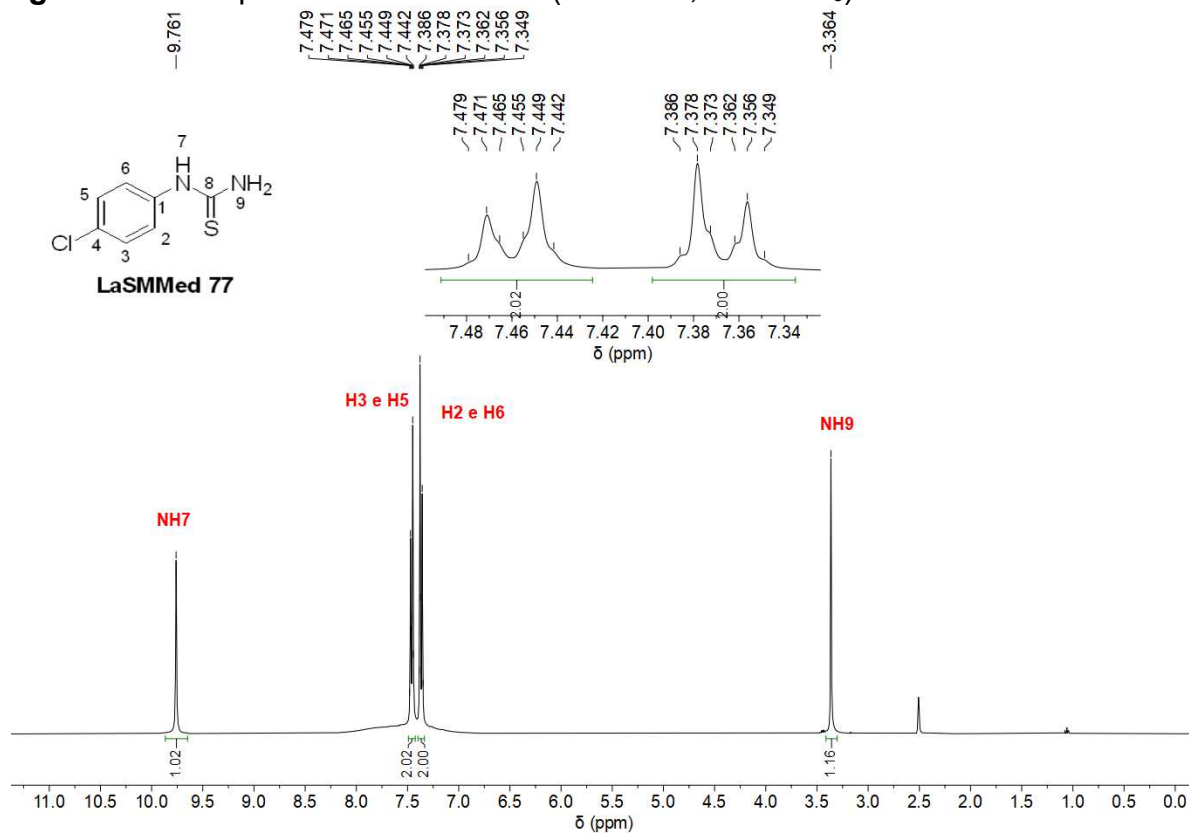


Figura B12 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do LaSMMed 77

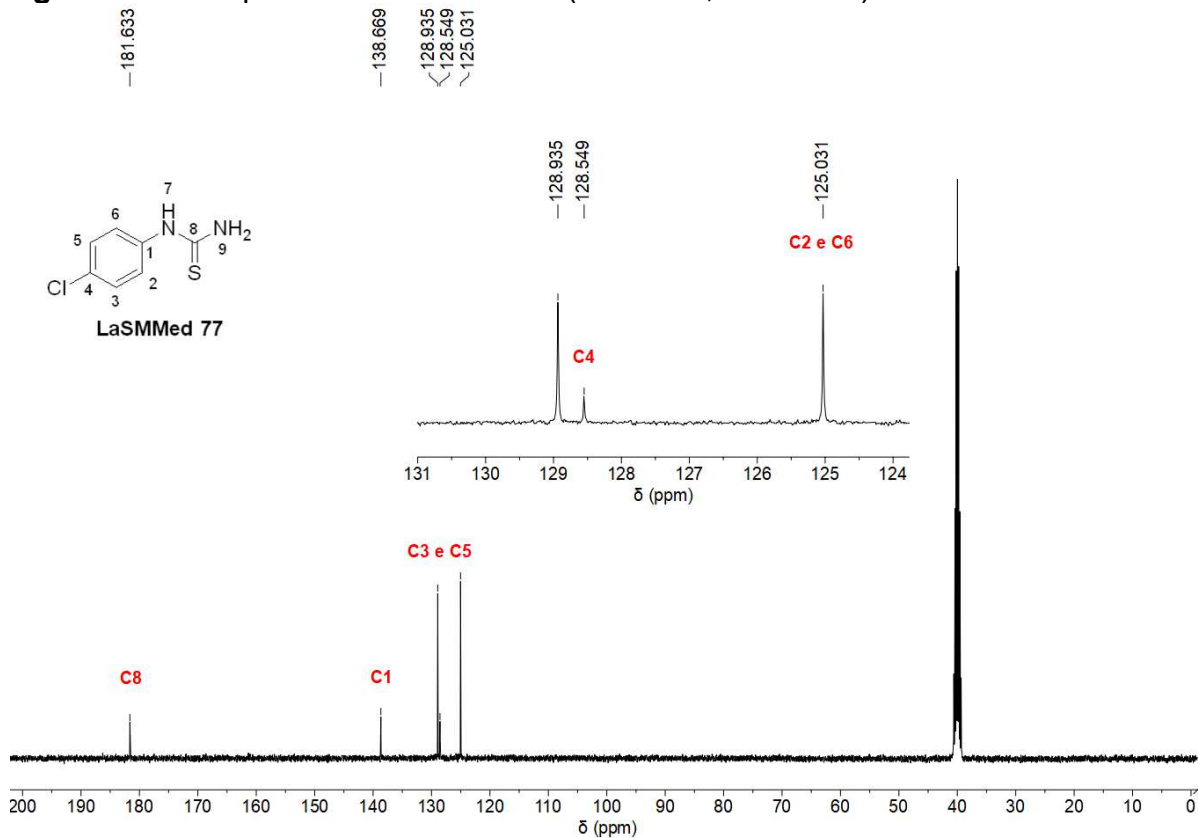


Figura B13 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do LaSMMed 78

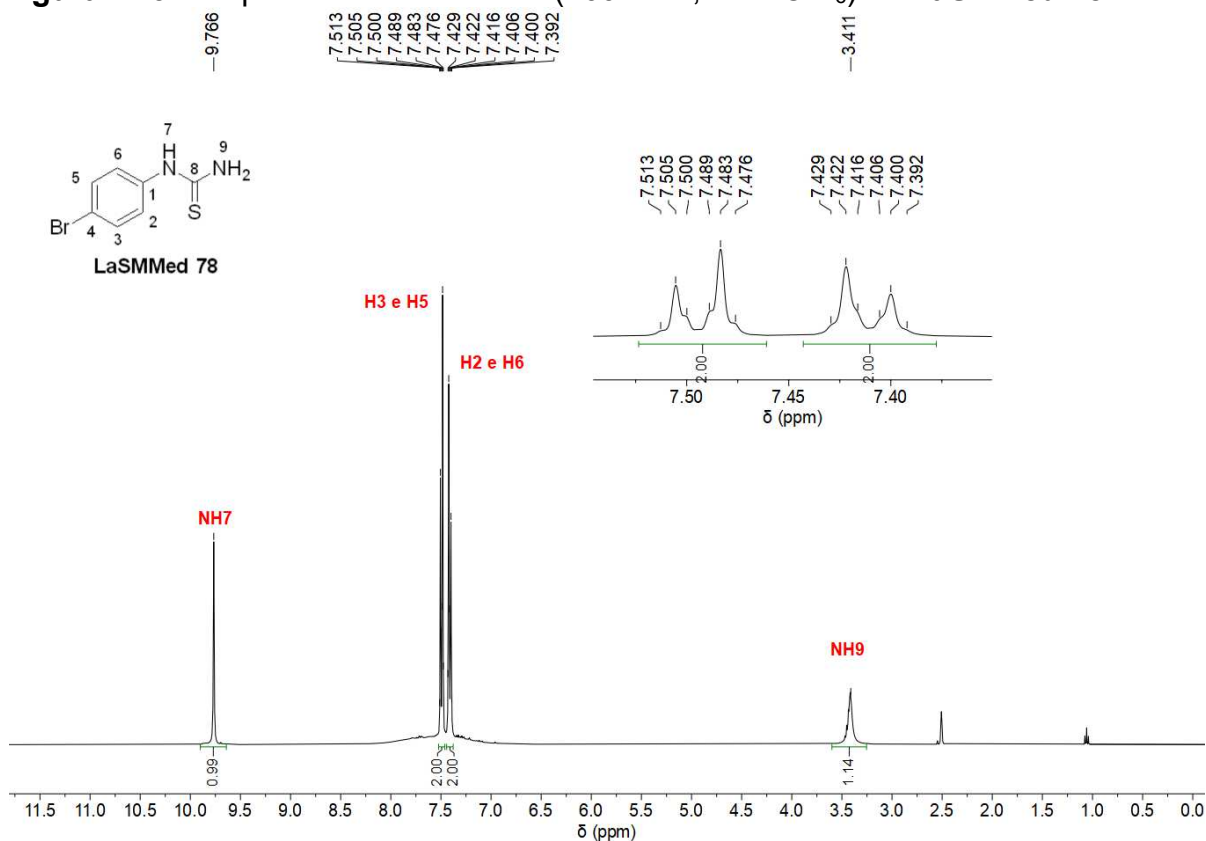


Figura B14 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do LaSMMed 78

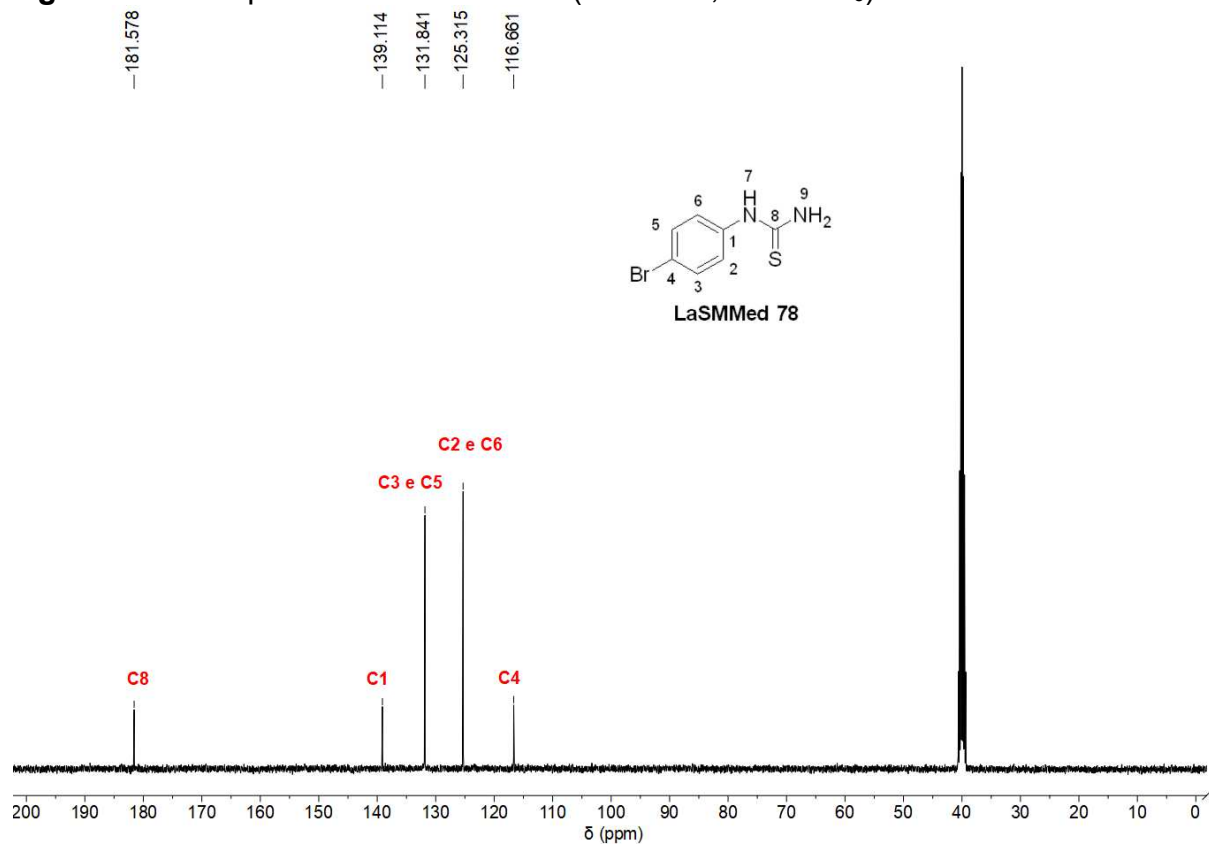


Figura B15 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do LaSMMed 79

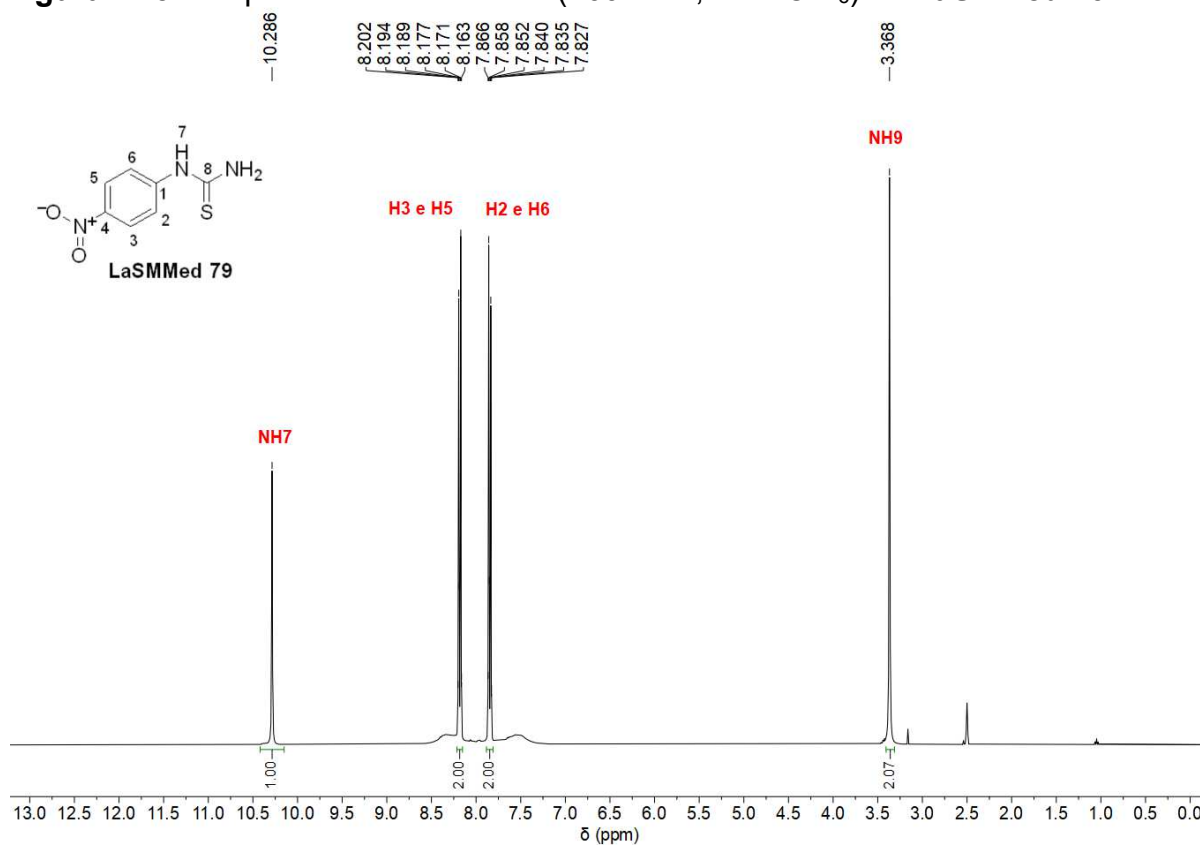


Figura B16 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do LaSMMed 79

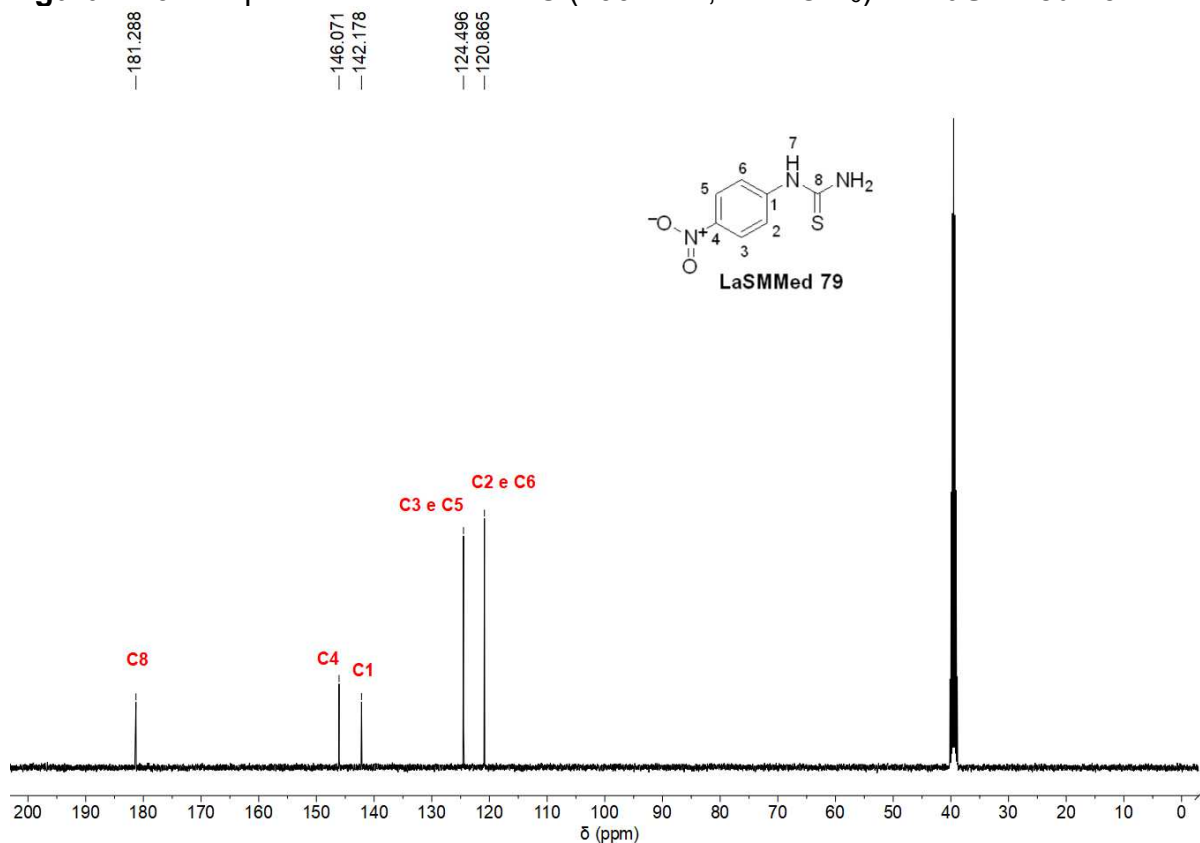


Figura B17 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) do LaSMMed 80

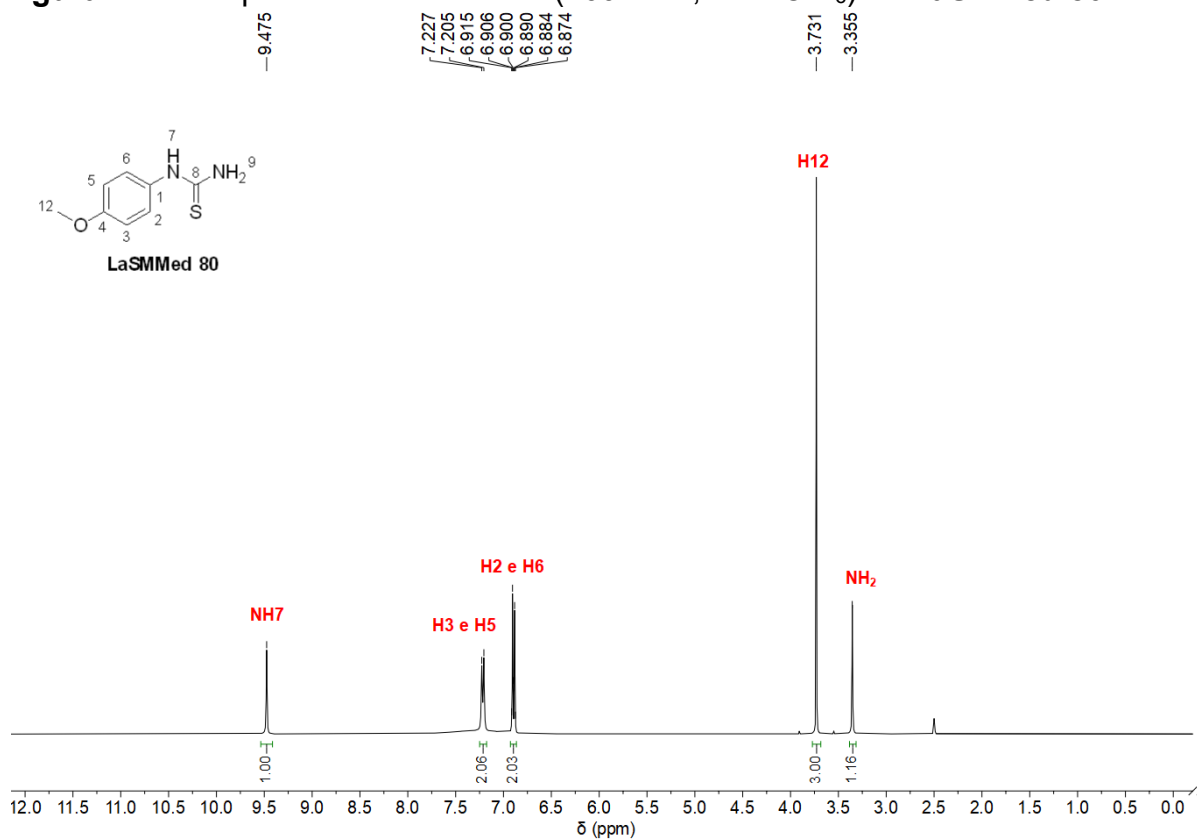
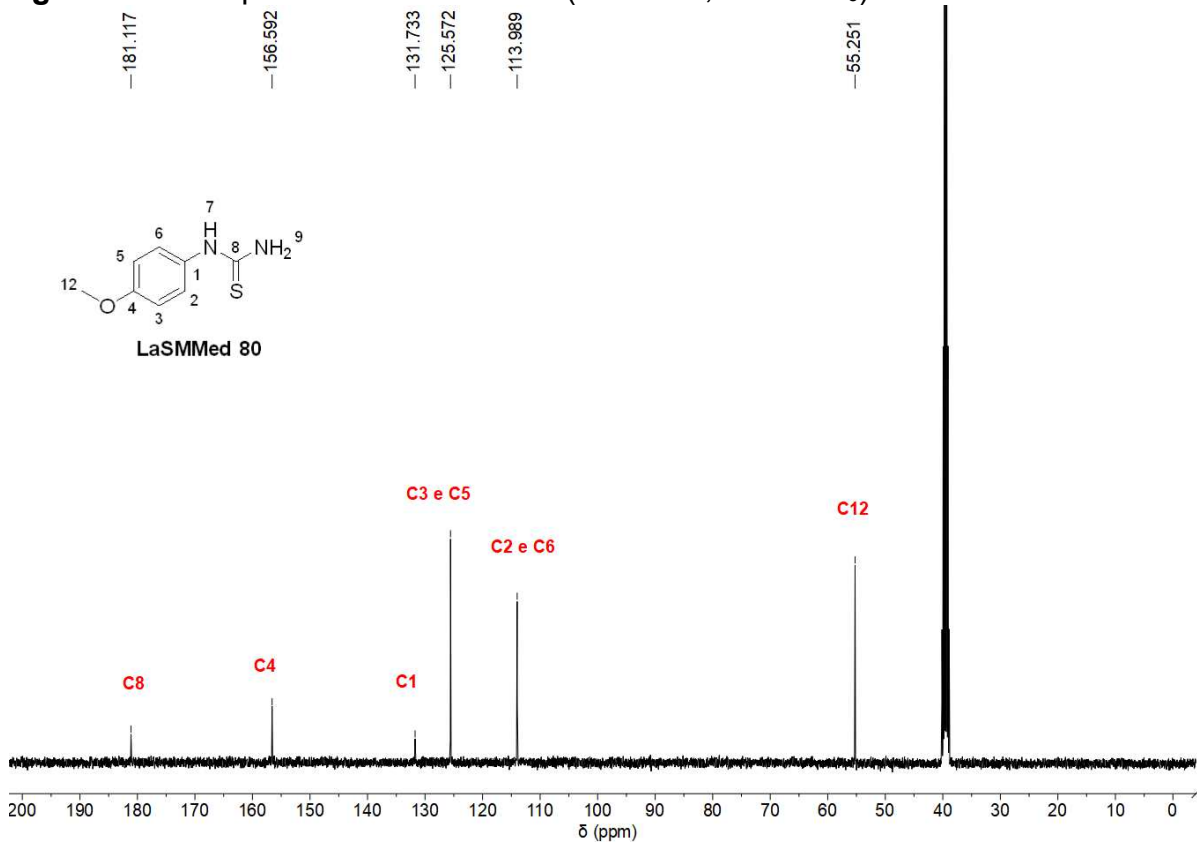
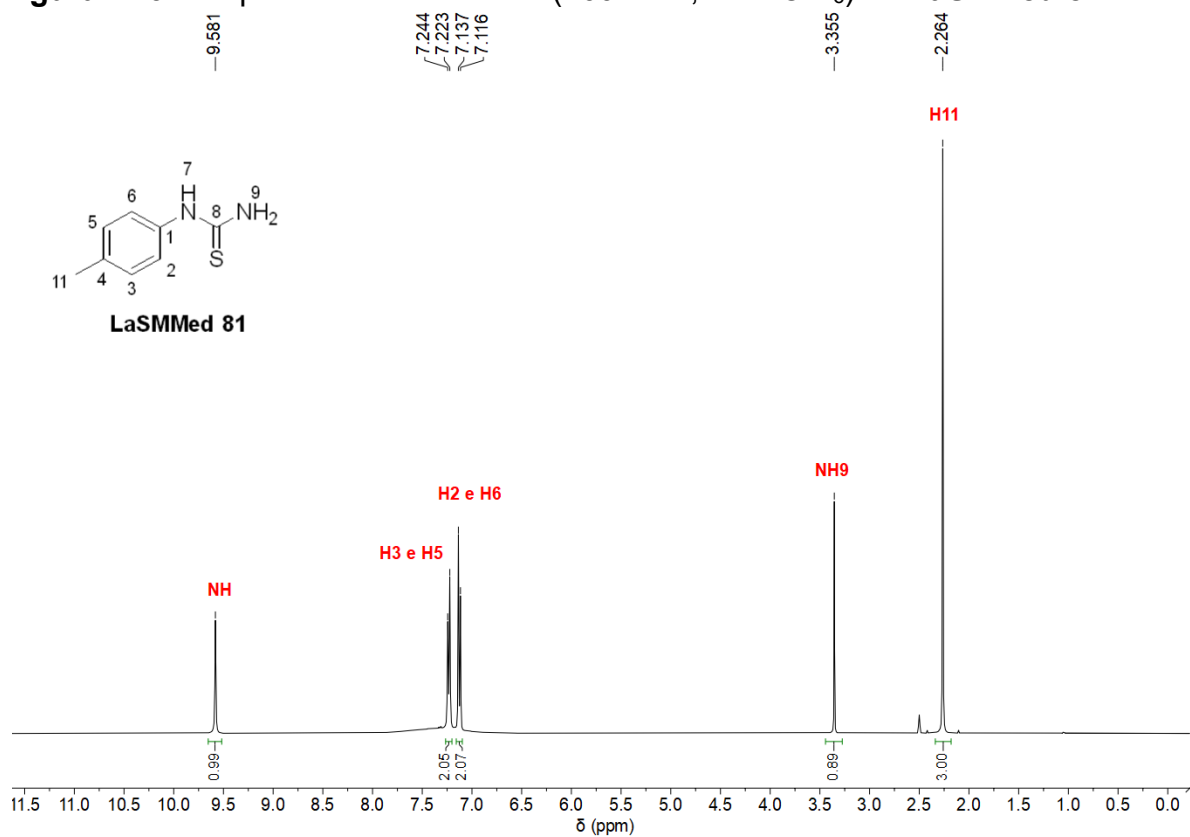


Figura B18 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ) do LaSMMed 80



**Figura B19** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do **LaSMMed 81**



**Figura B20** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do **LaSMMed 81**

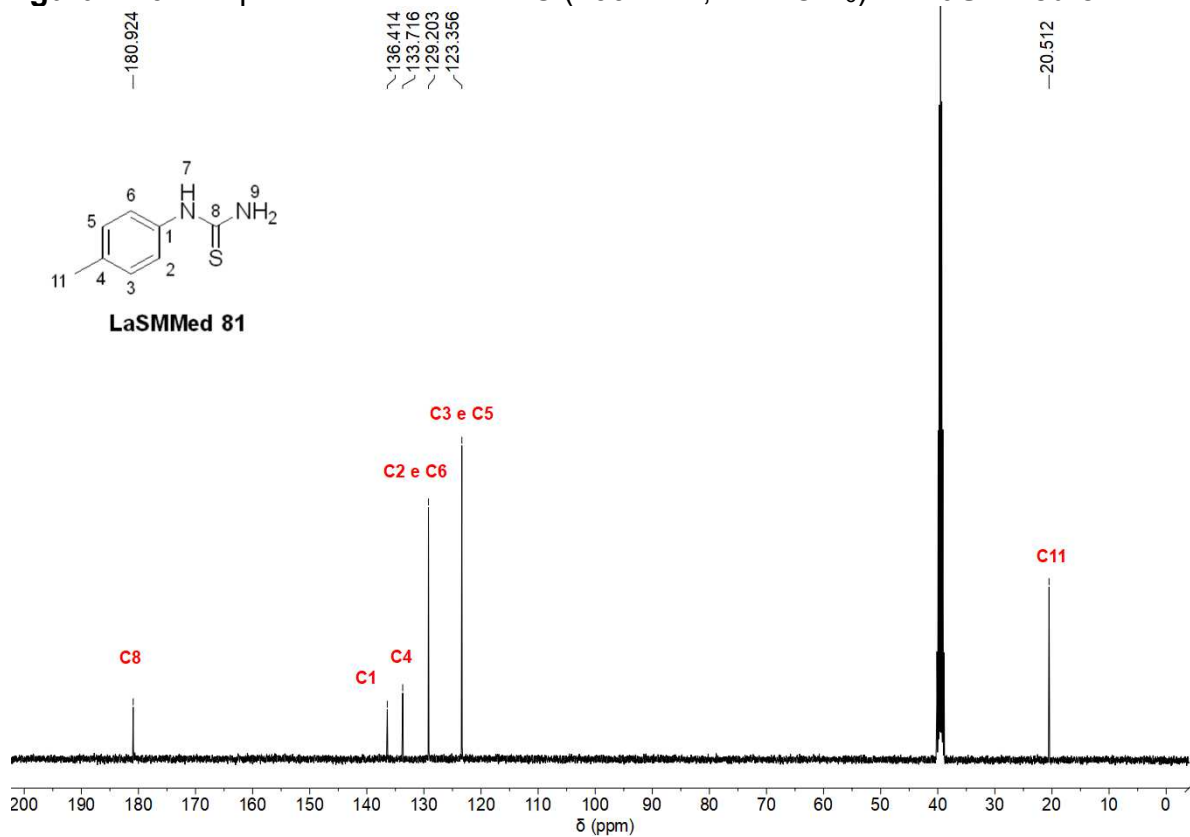


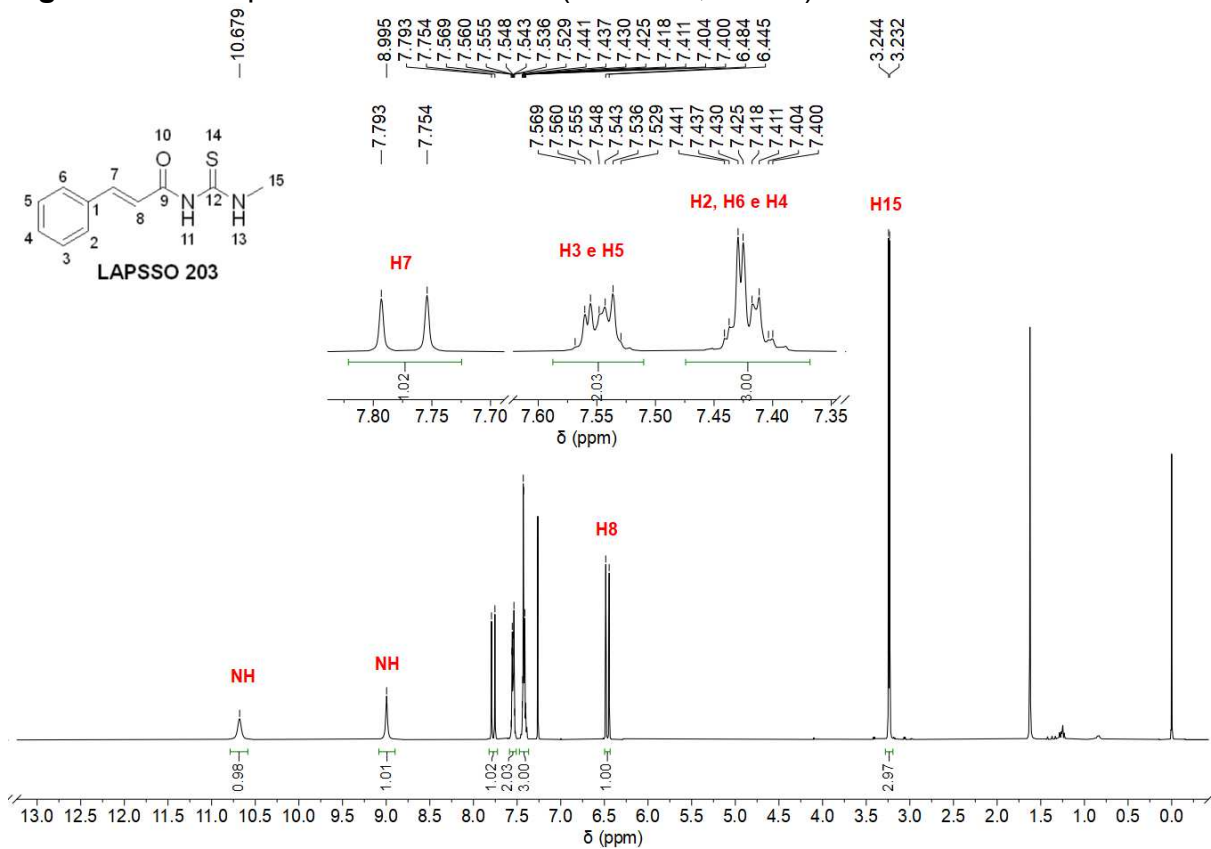
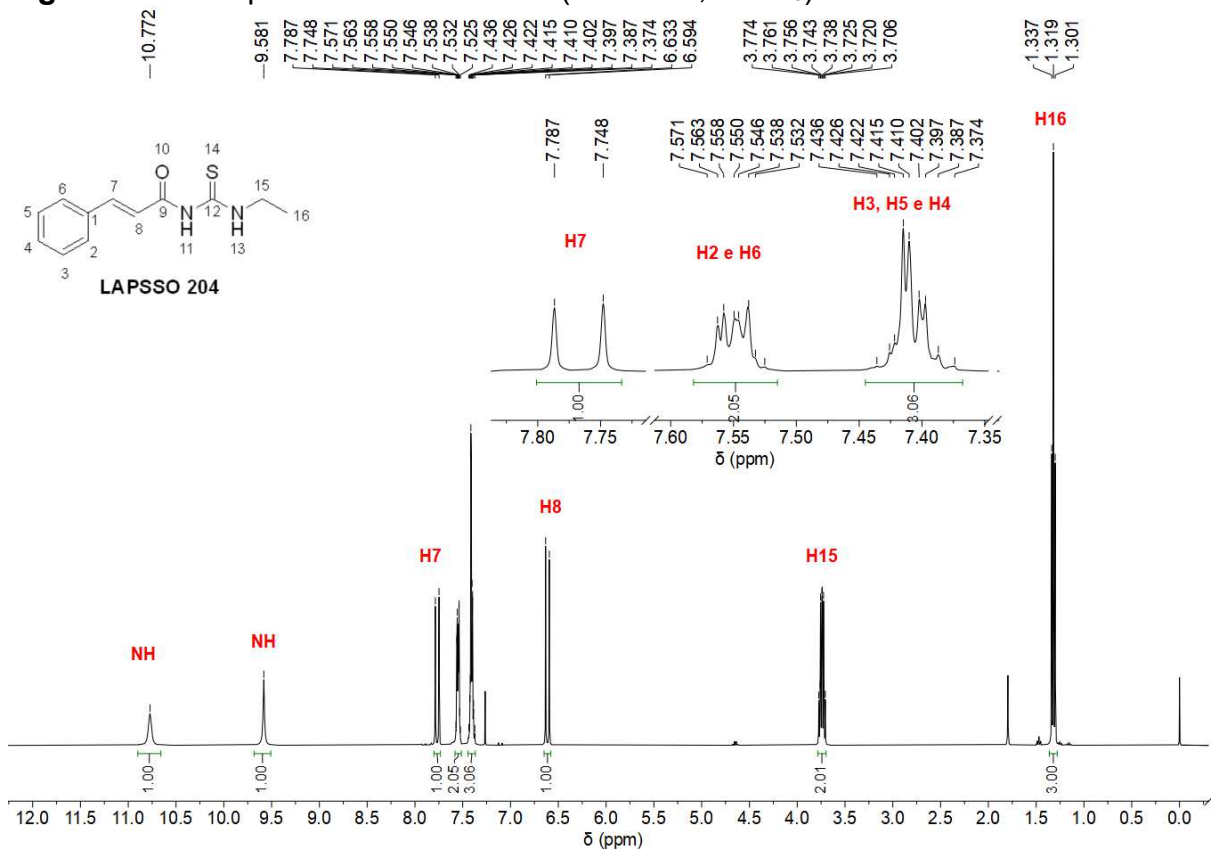
Figura B21 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do LAPSSO 203Figura B22 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do LAPSSO 204

Figura B23 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do LAPSSO 204

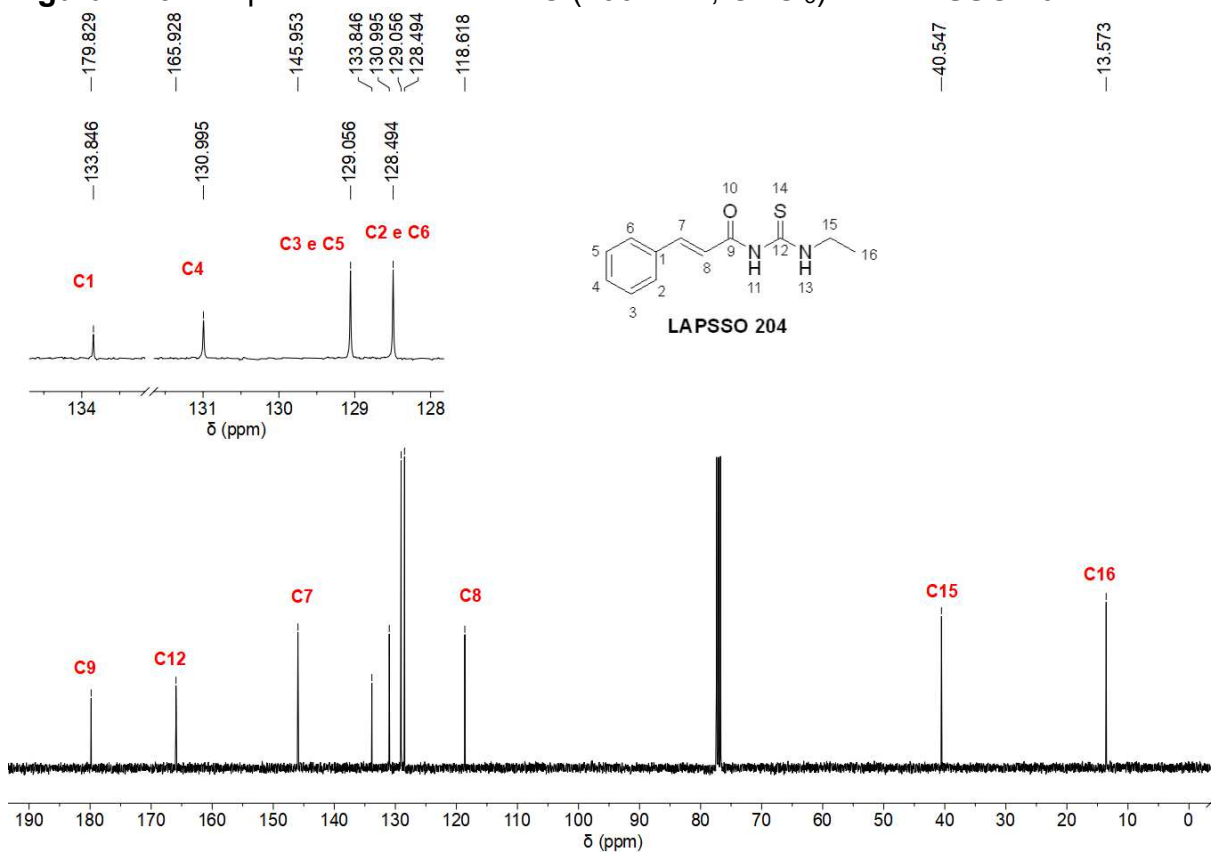


Figura B24 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do LAPSSO 205

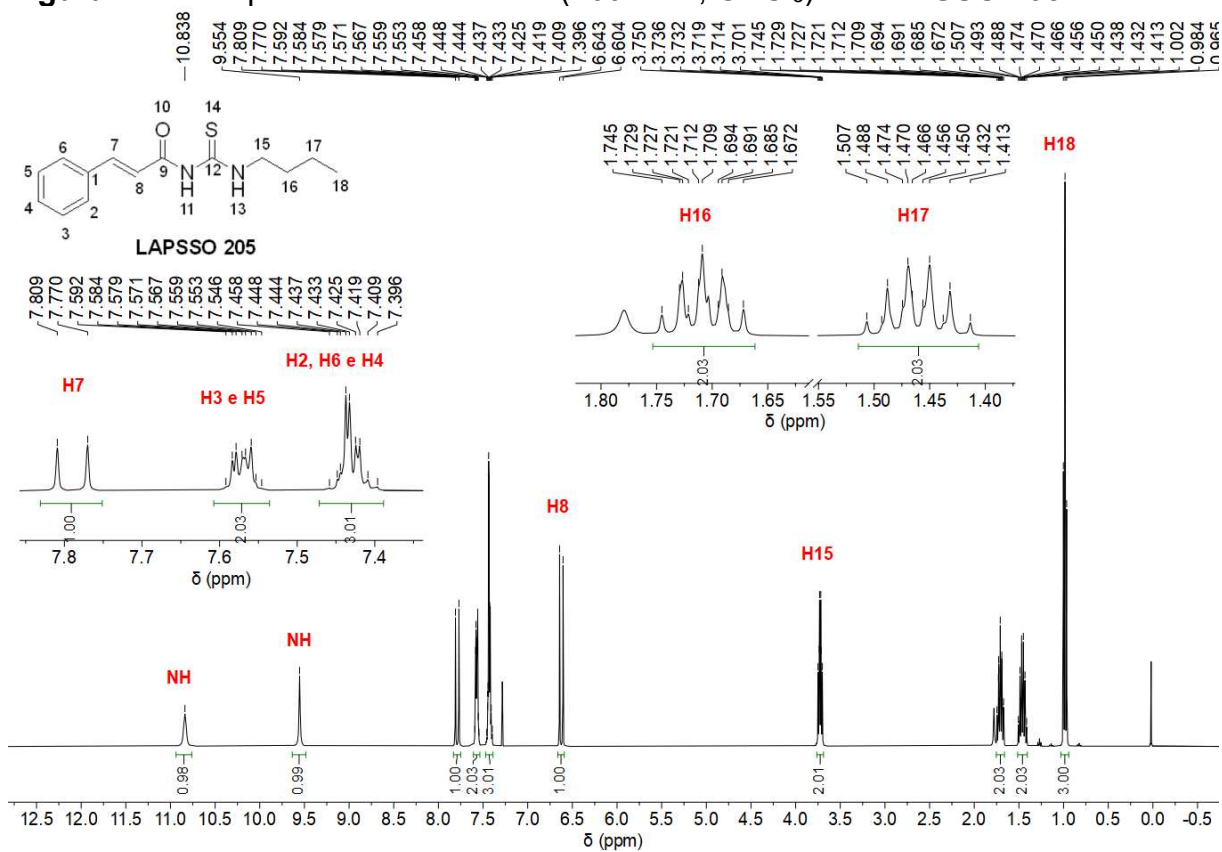


Figura B25 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do LAPSSO 205

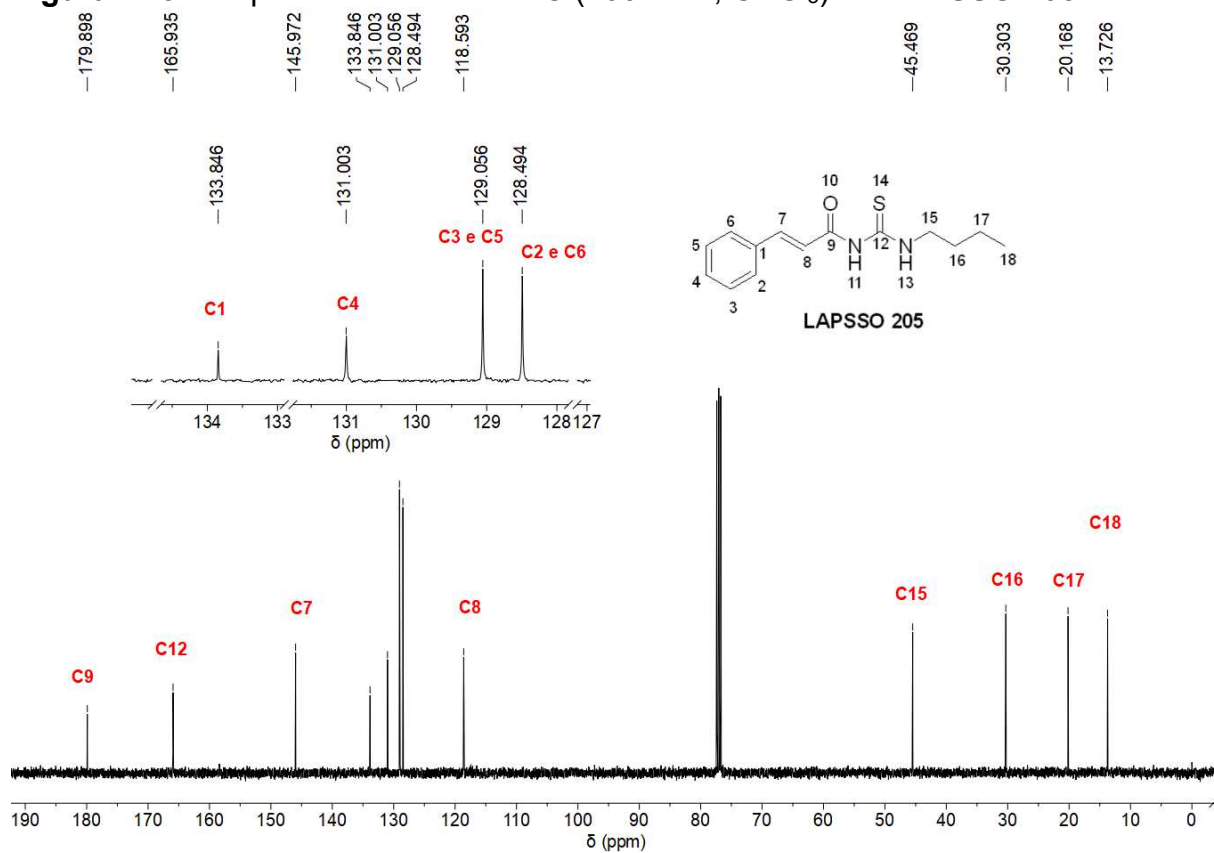


Figura B26 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do LAPSSO 206

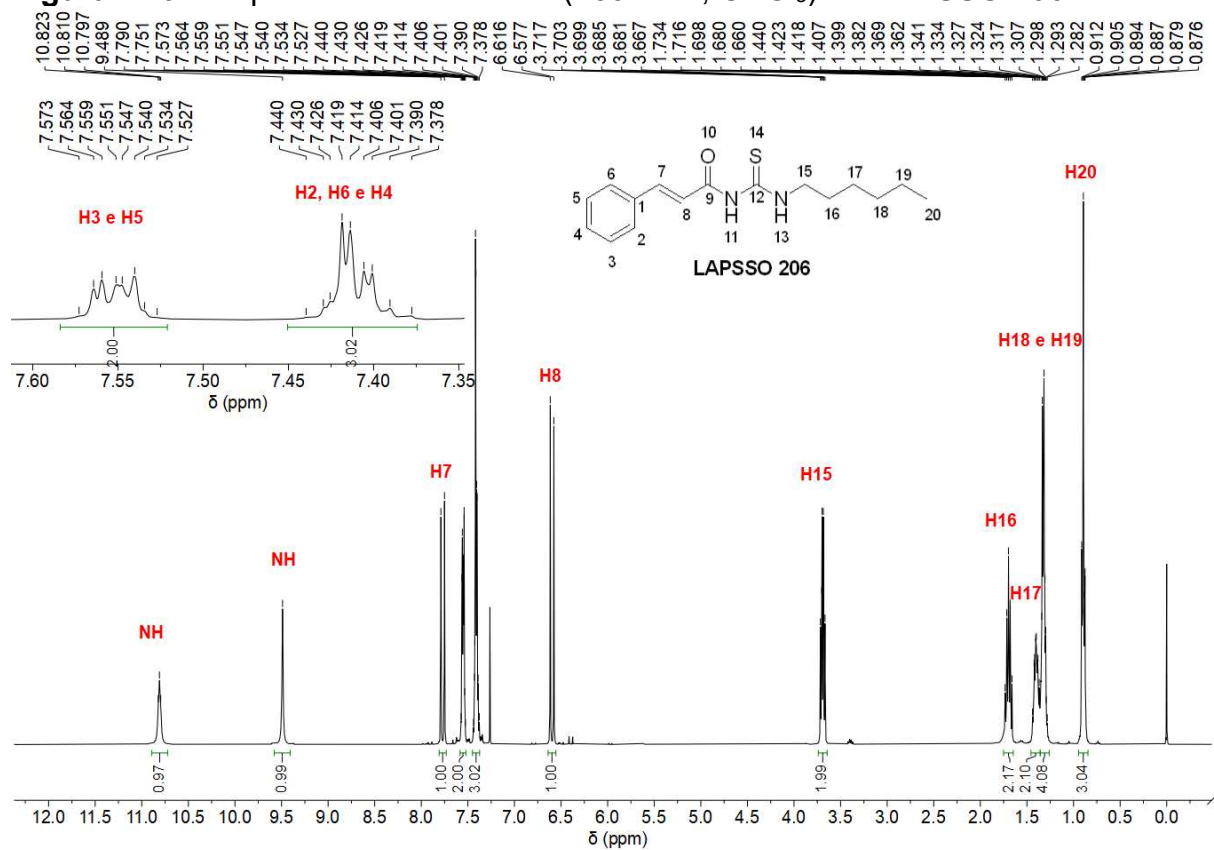


Figura B27 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do LAPSSO 206

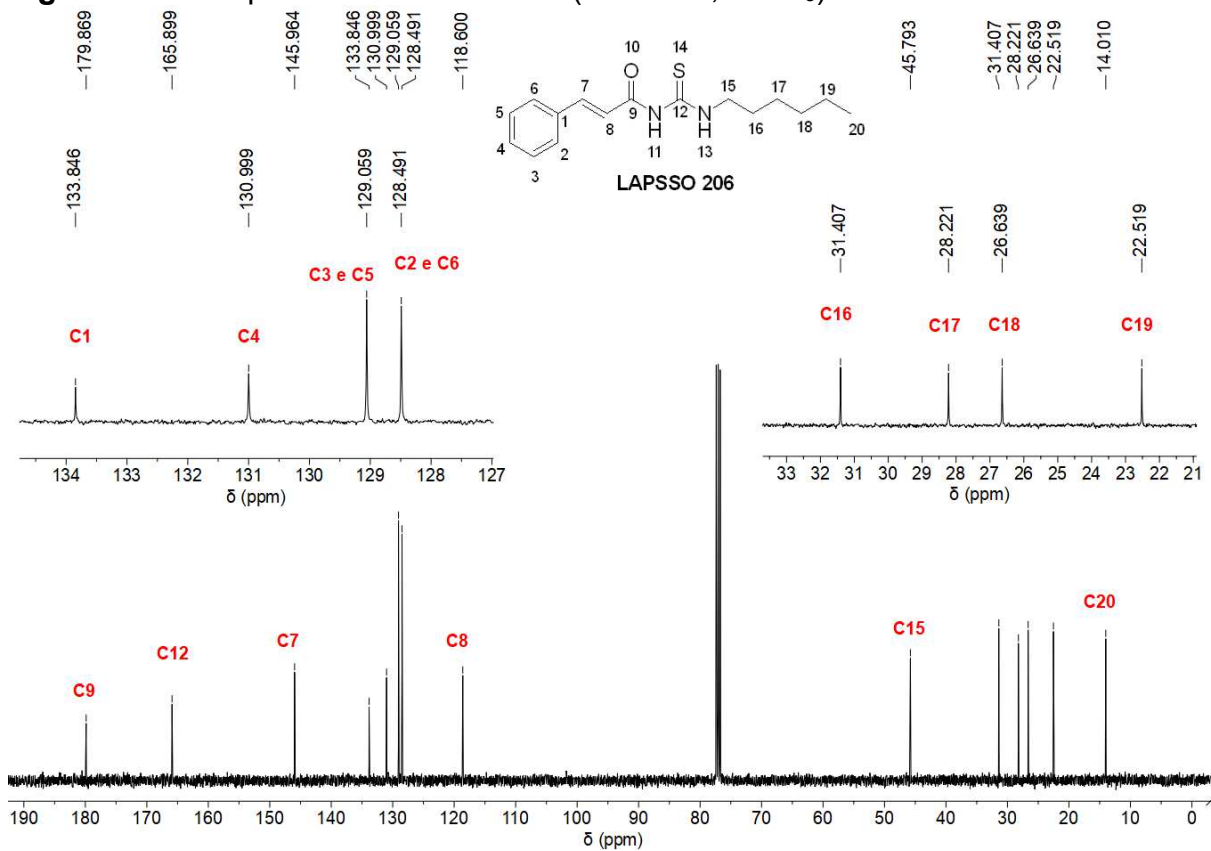


Figura B28 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do LAPSSO 207

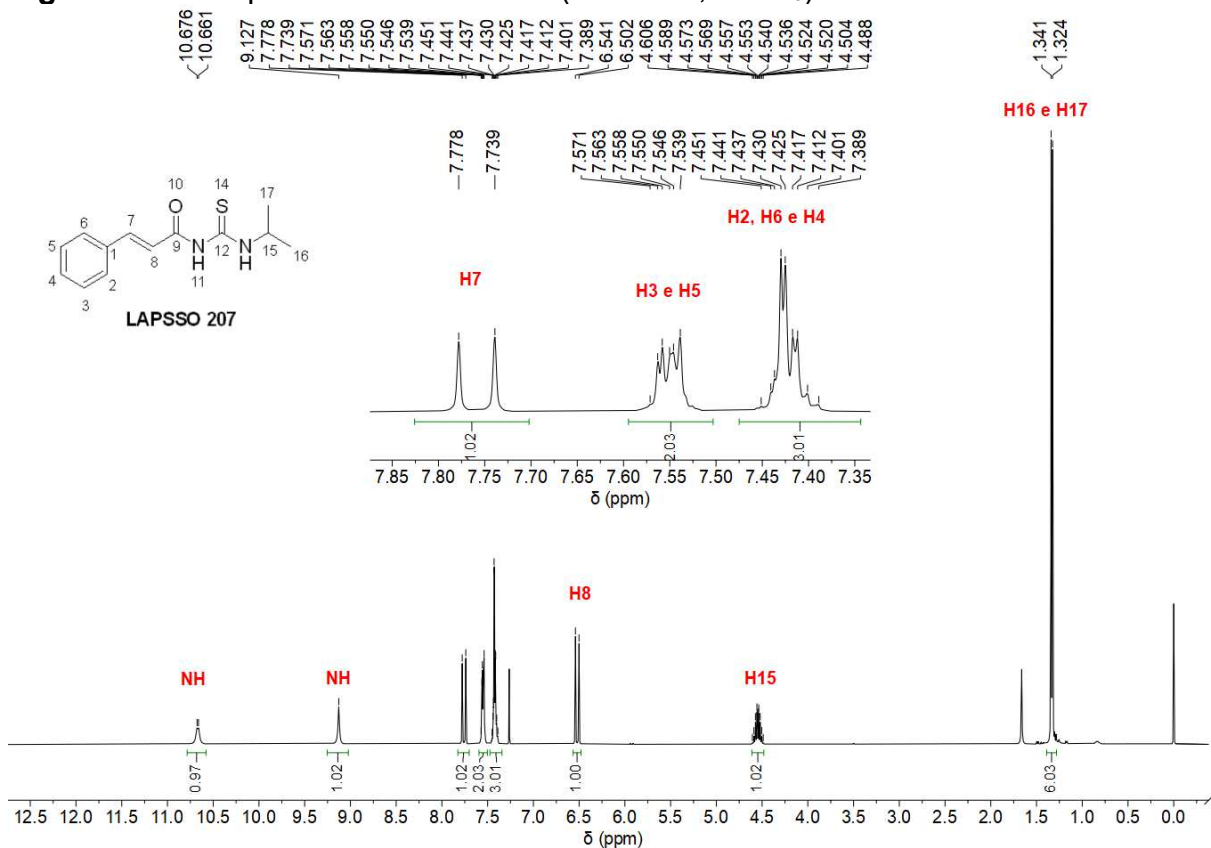


Figura B29 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do LAPSSO 207

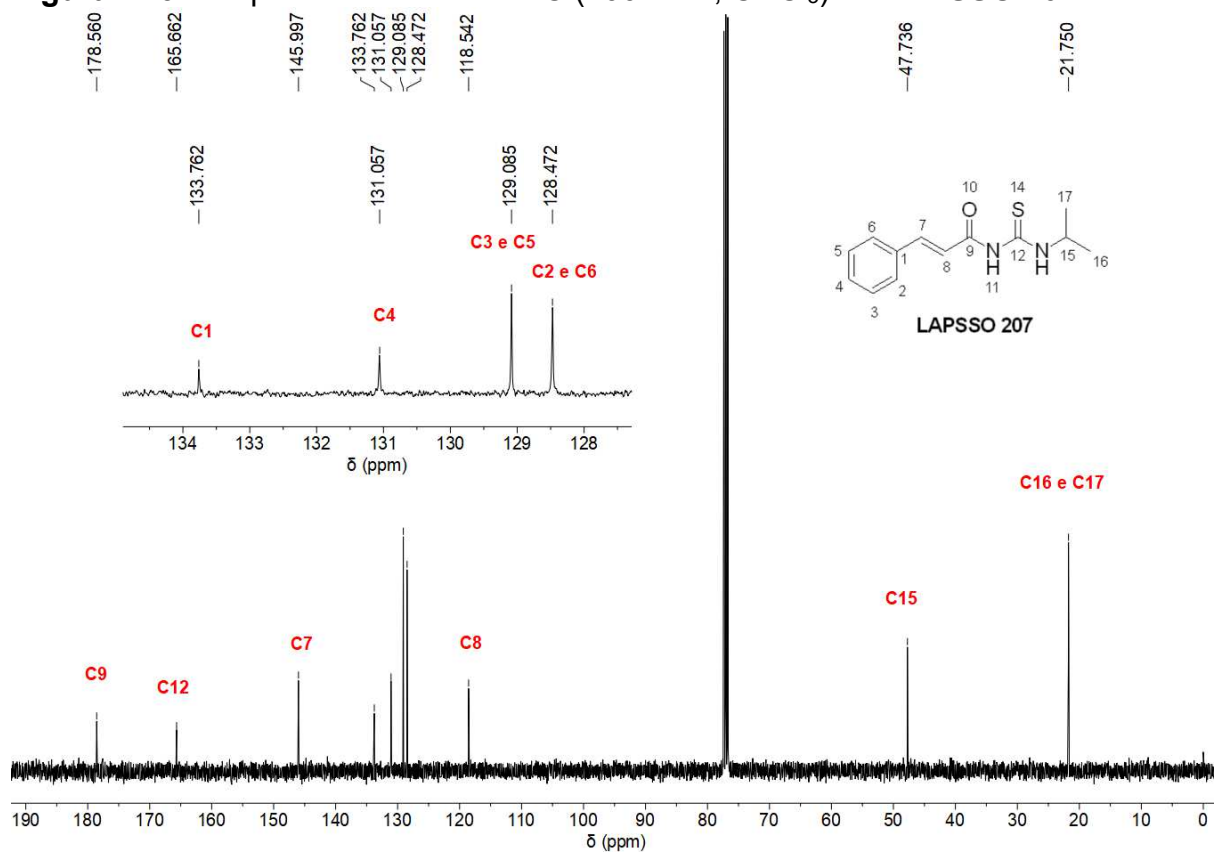


Figura B30 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do LAPSSO 208

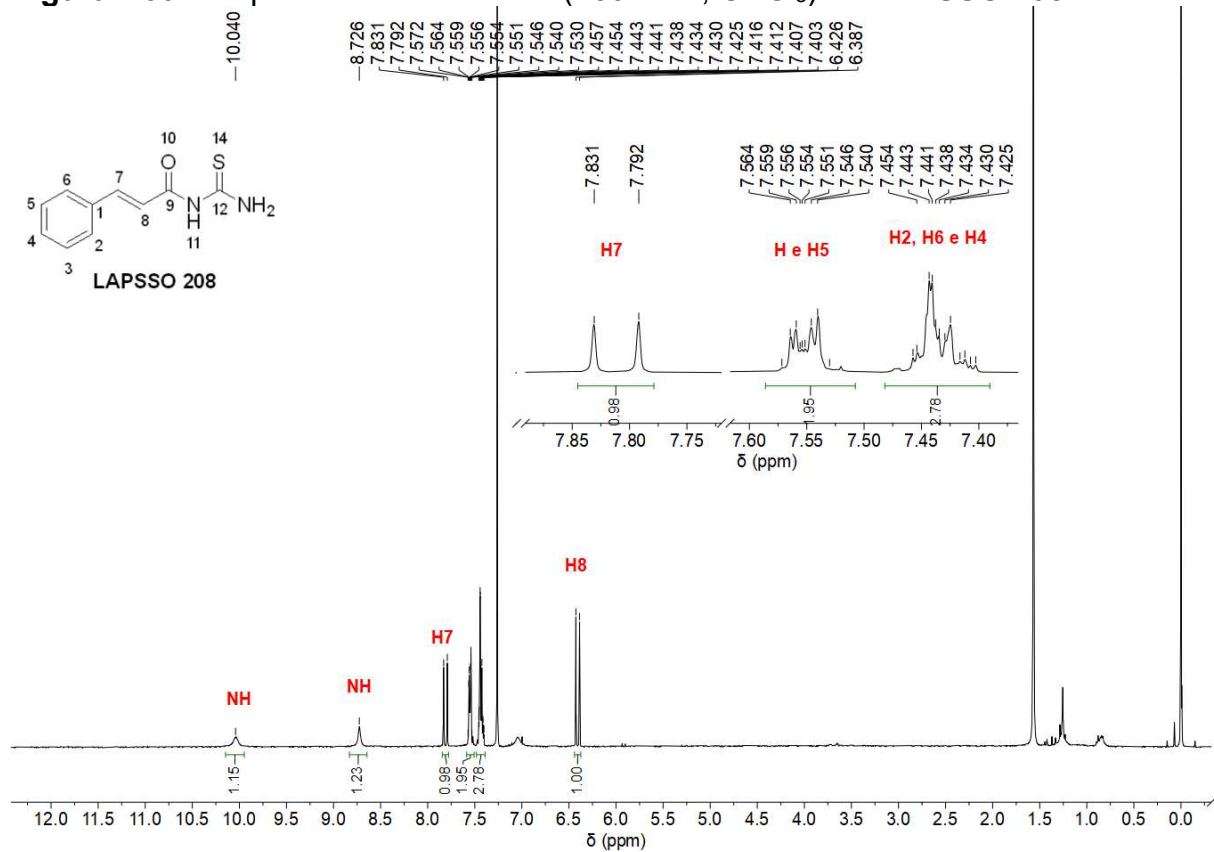


Figura B31 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do LAPSSO 209

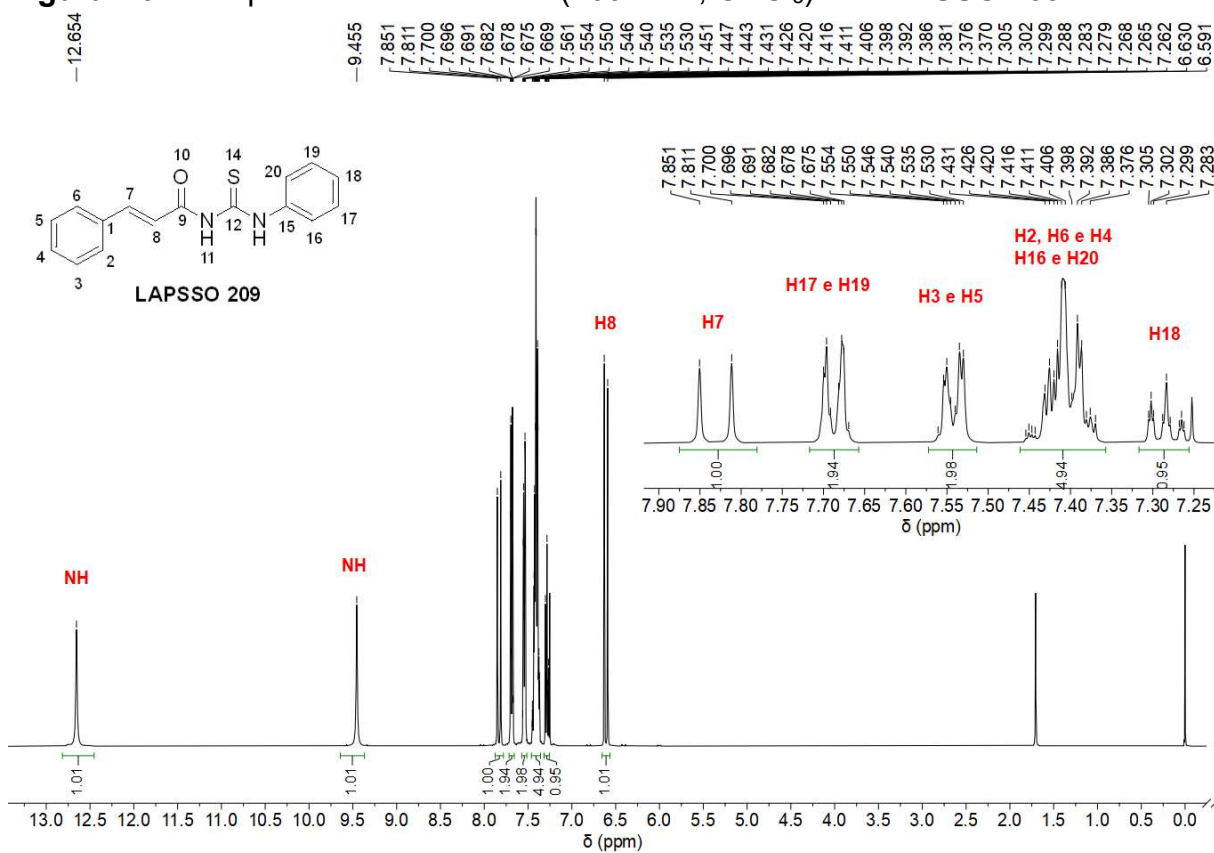
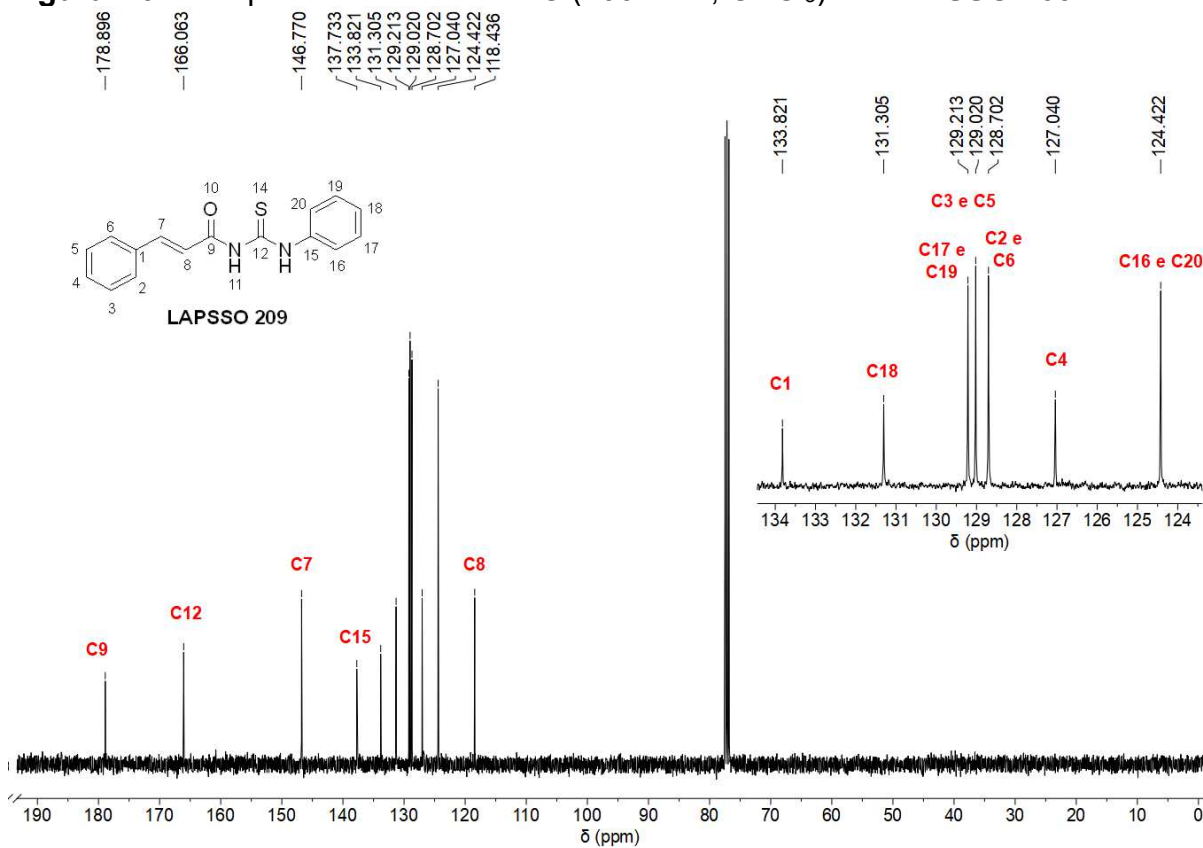
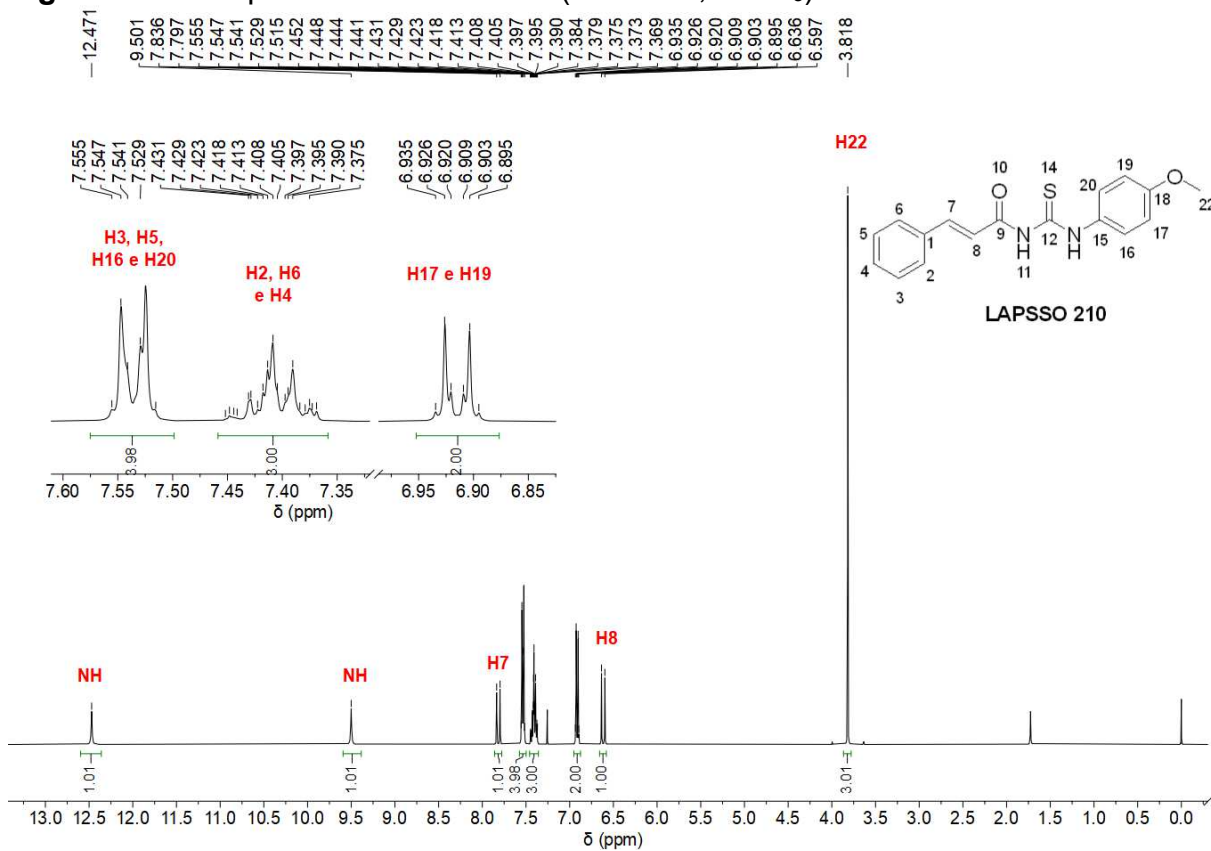


Figura B32 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do LAPSSO 209



**Figura B33 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do LAPSSO 210**



**Figura B34 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do LAPSSO 210**

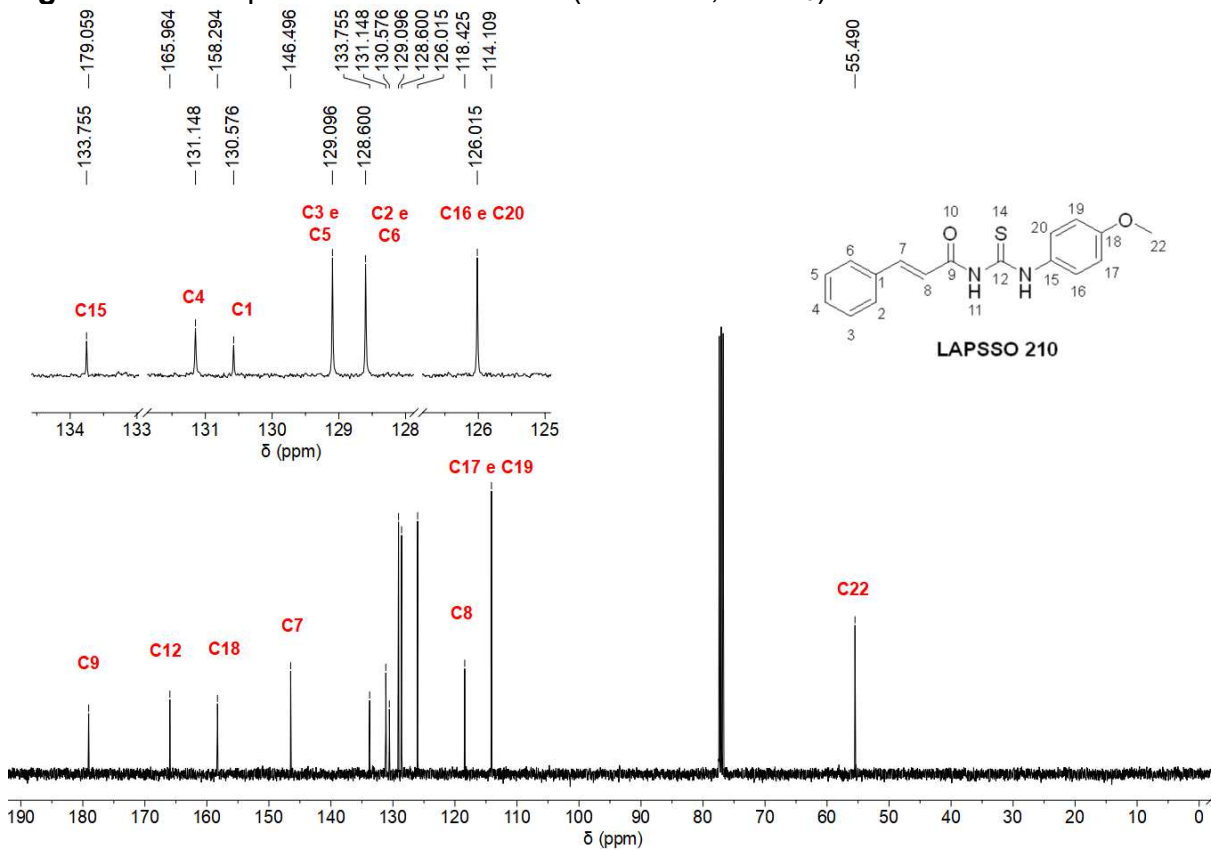


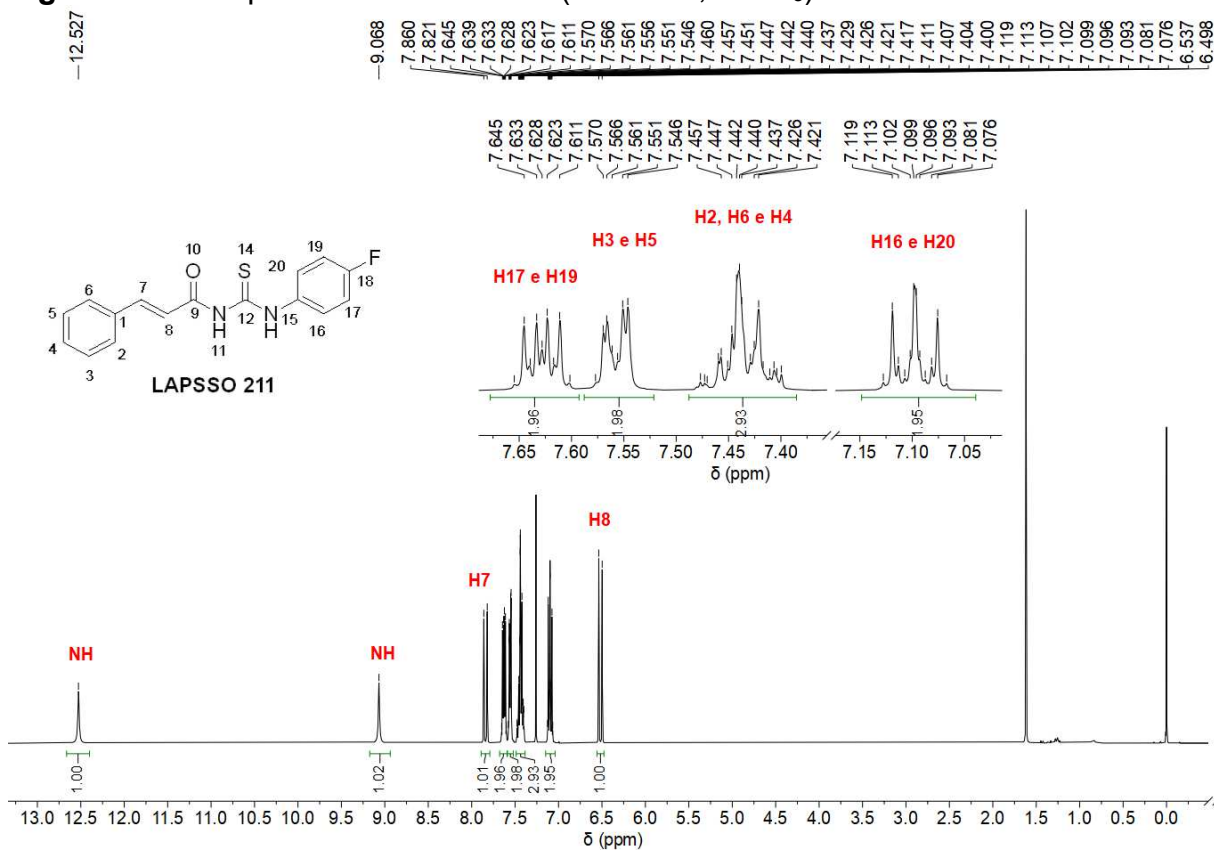
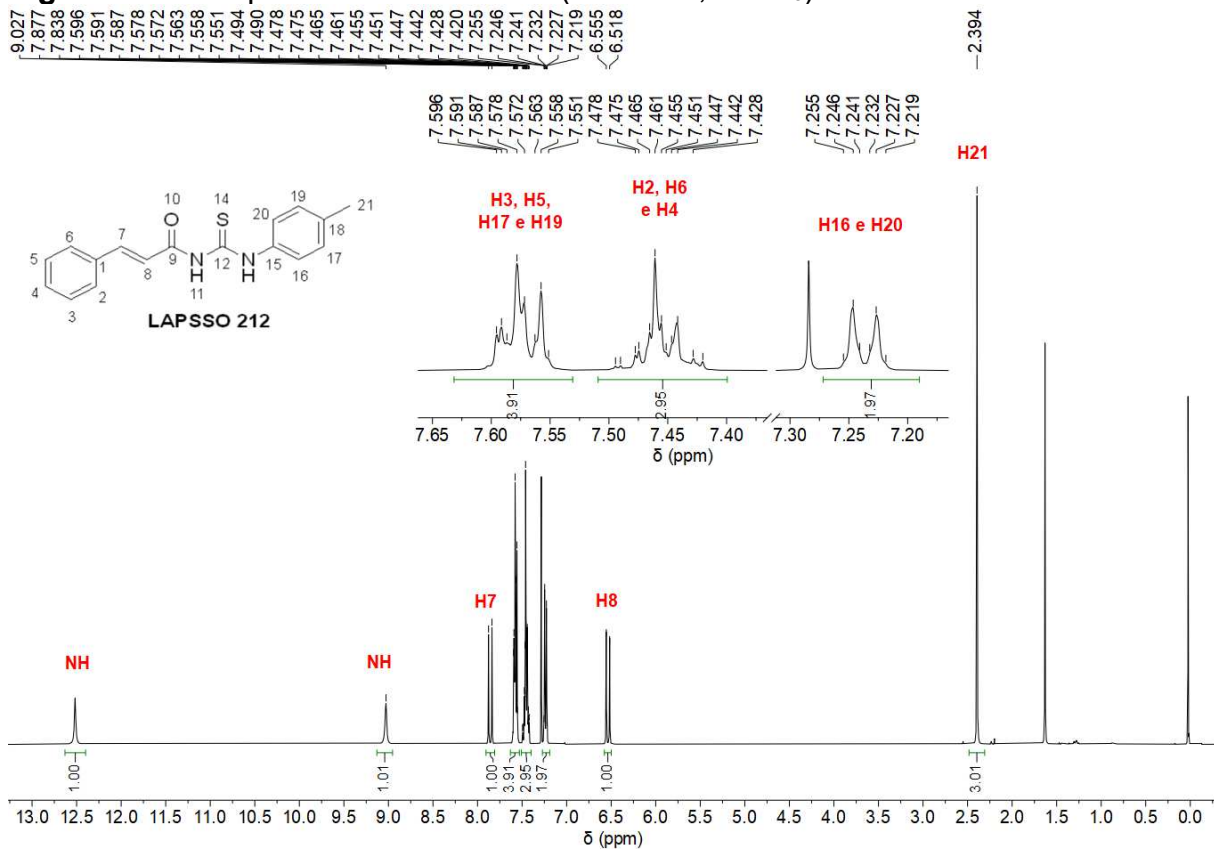
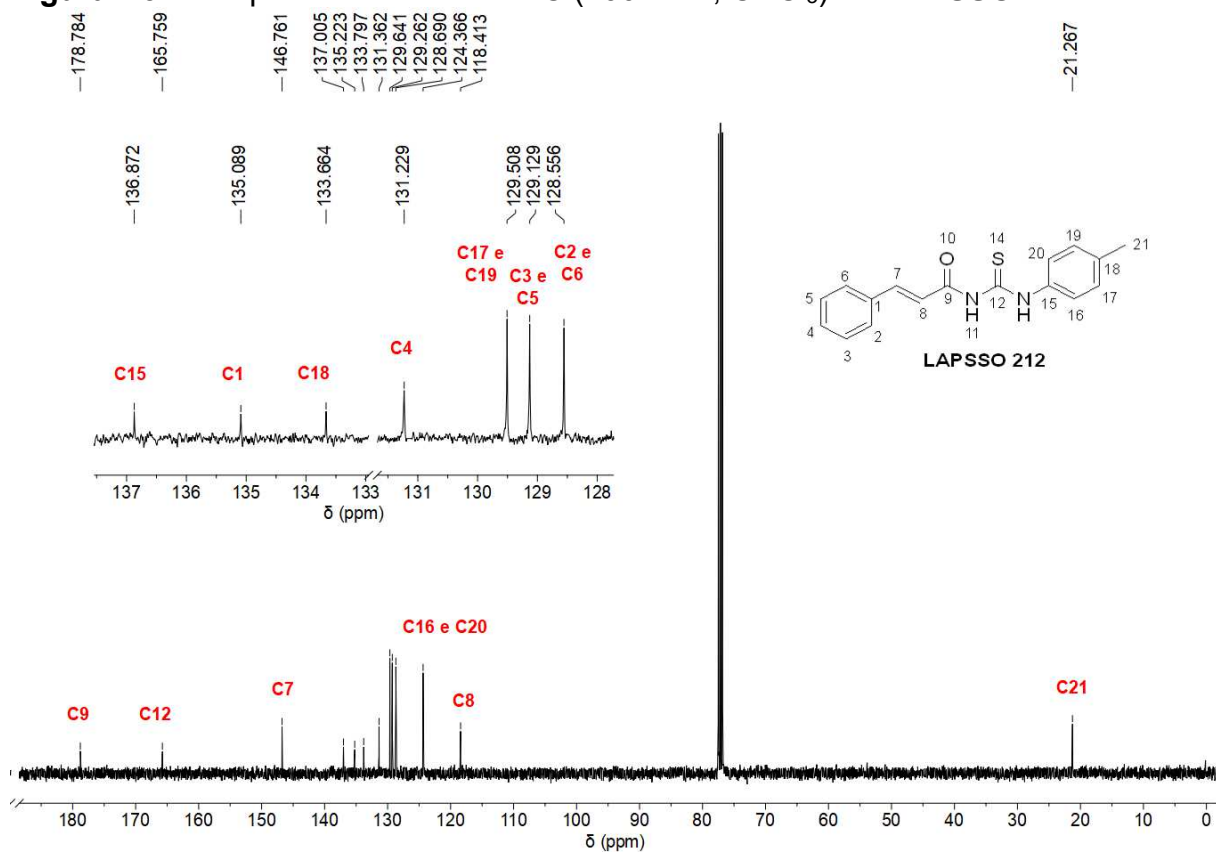
Figura B35 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do LAPSSO 211Figura B36 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do LAPSSO 212

Figura B37 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do LAPSSO 212

## APÊNDICE C

Redocagem do HAE, Considerando a Possibilidade de Permutação dos Tautômeros das Histidinas

**Tabela C1** – Possibilidade de permutação dos tautômeros das histidinas presentes no sítio ativo da enzima 4H9M, para a docagem do ácido acetoidroxâmico nas quatro funções de pontuação do GOLD

Possibilidades	Possibilidade 0		Possibilidade 1		
	His407	His492	His519	His545	
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	1
3	0	0	1	0	0
4	0	0	1	1	1
5	0	1	0	0	0
6	0	1	0	0	1
7	0	1	1	0	0
8	0	1	1	1	1
9	1	0	0	0	0
10	1	0	0	0	1
11	1	0	1	0	0
12	1	0	1	1	1
13	1	1	0	0	0
14	1	1	0	0	1
15	1	1	1	0	0
16	1	1	1	1	1

**Tabela C2** – Redocagem do HAE, considerando a possibilidade 1 de tautomerização das histidinas

Função	Pontuação	RMSD (Å)	Interações									
			H 407	H 409	K 490	H 492	H 519	H 545	G 550	D 633	Ni 901	Ni 902
HAE	-	-		-								
GoldScore	46,93	1,145	-	-		-	-					
ChemScore	24,27	1,151	-	-		-	-			-		
ChemPLP	35,76	0,610	-	-		-	-			-		
ASP	31,09	<b>0,243</b>		-		-			-			

**Tabela C3** – Redocagem do HAE, considerando a possibilidade 2 de tautomerização das histidinas

Função	Pontuação	RMSD (Å)	Interações										
			H 407	H 409	K 490	H 492	H 519	H 545	G 550	D 633	Ni 901	Ni 902	
HAE	-	-	■	-	■	■	■	■	■	■	■	■	■
GoldScore	46,28	1,121	-	-	■	-	-	■	■	■	■	■	■
ChemScore	23,67	0,928	-	■	■	-	-	■	■	-	■	■	■
ChemPLP	35,91	0,654	-	-	-	-	-	-	■	-	■	■	■
ASP	28,80	<b>0,238</b>	-	■	■	-	-	■	■	-	■	■	■

**Tabela C4** – Redocagem do HAE, considerando a possibilidade 3 de tautomerização das histidinas

Função	Pontuação	RMSD (Å)	Interações											
			H 407	H 409	K 490	H 492	H 519	H 545	G 550	D 633	Ni 901	Ni 902	H 407	
HAE	-	-	■	-	-	■	■	■	■	■	■	■	■	■
GoldScore	46,53	1,166	-	■	-	■	-	-	■	■	■	■	■	■
ChemScore	23,59	0,502	-	■	-	■	-	■	■	■	-	■	■	■
ChemPLP	36,18	0,582	-	■	■	-	■	-	■	-	-	■	■	■
ASP	31,95	<b>0,314</b>	-	-	-	-	-	■	-	-	■	■	■	■

**Tabela C5** – Redocagem do HAE, considerando a possibilidade 4 de tautomerização das histidinas

Função	Pontuação	RMSD (Å)	Interações									
			H 407	H 409	K 490	H 492	H 519	H 545	G 550	D 633	Ni 901	Ni 902
HAE	-	-	■	-	■	■	■	■	■	■	■	■
GoldScore	38,53	1,121	-	■	-	-	-	-	■	-	■	■
ChemScore	22,52	0,928	-	■	■	-	■	■	■	-	■	■
ChemPLP	36,08	0,654	-	■	■	-	-	■	■	-	■	■
ASP	30,91	<b>0,238</b>	■	-	■	-	■	■	-	■	■	■

**Tabela C6** – Redocagem do HAE, considerando a possibilidade 5 de tautomerização das histidinas

Função	Pontuação	RMSD (Å)	Interações										
			H 407	H 409	K 490	H 492	H 519	H 545	G 550	D 633	Ni 901	Ni 902	
HAE	-	-		-									
GoldScore	38,53	1,169	-			-	-	-		-			
ChemScore	25,09	<b>0,222</b>			-			-	-				
ChemPLP	40,37	0,496	-	-	-			-	-		-		
ASP	31,99	0,260		-					-				

**Tabela C7** – Redocagem do HAE, considerando a possibilidade 6 de tautomerização das histidinas

Função	Pontuação	RMSD (Å)	Interações										
			H 407	H 409	K 490	H 492	H 519	H 545	G 550	D 633	Ni 901	Ni 902	
HAE	-	-		-									
GoldScore	46,78	1,135	-	-			-	-	-				
ChemScore	26,10	0,307			-			-	-				
ChemPLP	38,50	0,428	-	-	-			-	-		-		
ASP	30,23	<b>0,214</b>		-			-		-				

**Tabela C8** – Redocagem do HAE, considerando a possibilidade 7 de tautomerização das histidinas

Função	Pontuação	RMSD (Å)	Interações										
			H 407	H 409	K 490	H 492	H 519	H 545	G 550	D 633	Ni 901	Ni 902	
HAE	-	-		-									
GoldScore	45,94	1,078	-			-	-			-			
ChemScore	25,13	0,301							-				
ChemPLP	41,20	0,489		-					-				
ASP	32,61	<b>0,225</b>		-			-		-				

**Tabela C9** – Redocagem do HAE, considerando a possibilidade 8 de tautomerização das histidinas

Função	Pontuação	RMSD (Å)	Interações										
			H 407	H 409	K 490	H 492	H 519	H 545	G 550	D 633	Ni 901	Ni 902	
HAE	-	-		-									
GoldScore	38,49	1,122	-		-	-	-	-		-			
ChemScore	25,50	0,380			-			-	-				
ChemPLP	40,97	0,463		-					-				
ASP	31,39	<b>0,199</b>		-					-				

**Tabela C10** – Redocagem do HAE, considerando a possibilidade 9 de tautomerização das histidinas

Função	Pontuação	RMSD (Å)	Interações										
			H 407	H 409	K 490	H 492	H 519	H 545	G 550	D 633	Ni 901	Ni 902	
HAE	-	-		-									
GoldScore	44,29	1,186	-	-		-	-						
ChemScore	22,40	1,028				-	-			-			
ChemPLP	35,23	0,614	-	-		-			-				
ASP	29,36	<b>0,241</b>	-		-	-	-			-			

**Tabela C11** – Redocagem do HAE, considerando a possibilidade 10 de tautomerização das histidinas

Função	Pontuação	RMSD (Å)	Interações										
			H 407	H 409	K 490	H 492	H 519	H 545	G 550	D 633	Ni 901	Ni 902	
HAE	-	-		-									
GoldScore	42,32	1,130	-	-		-	-			-			
ChemScore	23,51	0,458				-	-			-			
ChemPLP	35,27	0,646	-	-	-	-	-	-	-				
ASP	27,96	<b>0,360</b>				-	-						

**Tabela C12** – Redocagem do HAE, considerando a possibilidade 11 de tautomerização das histidinas

Função	Pontuação	RMSD (Å)	Interações											
			H 407	H 409	K 490	H 492	H 519	H 545	G 550	D 633	Ni 901	Ni 902		
HAE	-	-	■	-	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
GoldScore	44,63	1,075	-	-	■	-	-	-	■	■	■	■	■	■
ChemScore	22,74	0,627	■	■	■	-	■	■	■	-	■	■	■	■
ChemPLP	36,46	0,600	-	-	-	-	-	-	■	-	■	■	■	■
ASP	30,36	<b>0,295</b>	■	-	■	-	■	■	-	■	■	■	■	■

**Tabela C13** – Redocagem do HAE, considerando a possibilidade 12 de tautomerização das histidinas

Função	Pontuação	RMSD (Å)	Interações											
			H 407	H 409	K 490	H 492	H 519	H 545	G 550	D 633	Ni 901	Ni 902		
HAE	-	-	■	-	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
GoldScore	35,77	1,212	-	■	-	-	-	-	■	-	■	■	■	■
ChemScore	23,90	0,755	■	■	■	-	■	■	■	-	■	■	■	■
ChemPLP	36,35	0,617	-	-	-	-	-	-	■	■	■	■	■	■
ASP	29,08	<b>0,229</b>	-	-	■	-	■	■	-	■	-	■	■	■

**Tabela C14** – Redocagem do HAE, considerando a possibilidade 13 de tautomerização das histidinas

Função	Pontuação	RMSD (Å)	Interações											
			H 407	H 409	K 490	H 492	H 519	H 545	G 550	D 633	Ni 901	Ni 902		
HAE	-	-	■	-	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
GoldScore	45,79	1,255	-	-	■	-	-	■	■	■	■	■	■	■
ChemScore	25,50	0,262	-	■	-	■	■	-	-	■	■	■	■	■
ChemPLP	39,67	0,443	-	-	-	■	■	-	-	■	-	■	■	■
ASP	30,04	<b>0,232</b>	■	-	■	■	-	■	-	■	■	■	■	■

**Tabela C15** – Redocagem do HAE, considerando a possibilidade 14 de tautomerização das histidinas

Função	Pontuação	RMSD (Å)	Interações										
			H 407	H 409	K 490	H 492	H 519	H 545	G 550	D 633	Ni 901	Ni 902	
HAE	-	-	■	-	■	■	■	■	■	■	■	■	■
GoldScore	42,67	1,141	-	-	■	-	-	■	■	-	■	■	■
ChemScore	25,76	0,308	■	■	-	■	■	-	-	■	■	■	■
ChemPLP	38,58	0,484	-	-	-	■	■	-	-	■	-	■	■
ASP	28,82	<b>0,235</b>	-	-	■	■	-	■	-	■	■	■	■

**Tabela C16** – Redocagem do HAE, considerando a possibilidade 15 de tautomerização das histidinas

Função	Pontuação	RMSD (Å)	Interações										
			H 407	H 409	K 490	H 492	H 519	H 545	G 550	D 633	Ni 901	Ni 902	
HAE	-	-	■	-	■	■	■	■	■	■	■	■	■
GoldScore	44,59	1,056	-	-	■	-	-	-	■	■	■	■	■
ChemScore	25,47	0,283	■	■	-	■	■	-	-	■	■	■	■
ChemPLP	40,70	0,463	-	-	-	■	■	■	-	■	■	■	■
ASP	32,44	<b>0,240</b>	■	-	■	■	■	-	-	■	■	■	■

**Tabela C17** – Redocagem do HAE, considerando a possibilidade 16 de tautomerização das histidinas

Função	Pontuação	RMSD (Å)	Interações										
			H 407	H 409	K 490	H 492	H 519	H 545	G 550	D 633	Ni 901	Ni 902	
HAE	-	-	■	-	■	■	■	■	■	■	■	■	■
GoldScore	36,32	1,191	-	■	-	-	-	-	■	-	■	■	■
ChemScore	25,87	0,315	■	■	-	■	■	-	-	■	■	■	■
ChemPLP	39,45	0,499	-	-	-	■	■	-	-	■	-	■	■
ASP	29,73	<b>0,173</b>	■	-	■	■	■	■	-	■	■	■	■

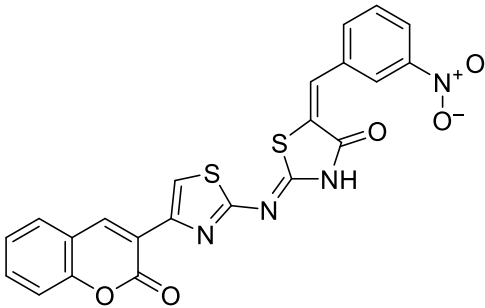
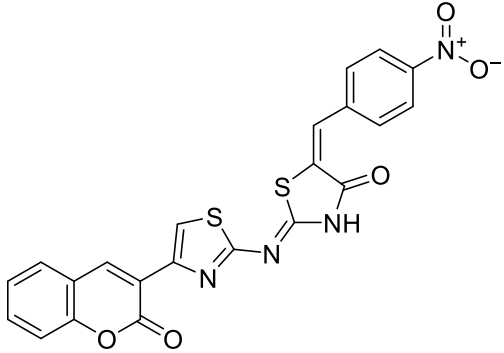
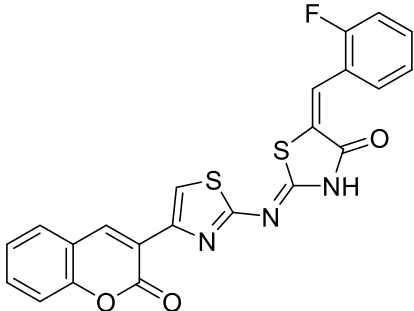
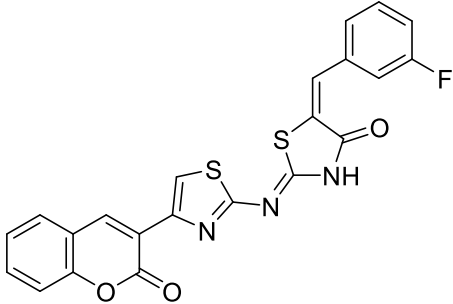
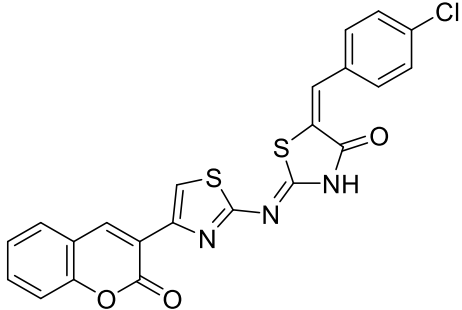
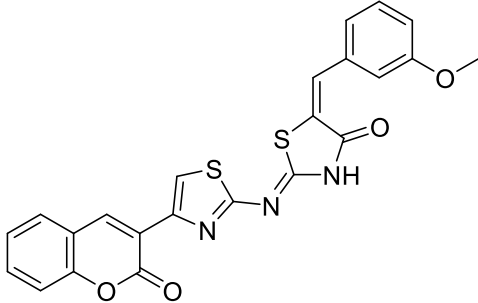
Legenda das cores de acordo com os tipos de interações:

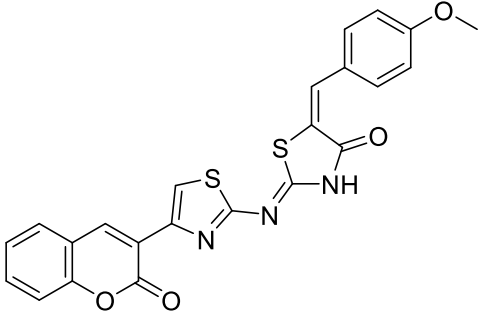
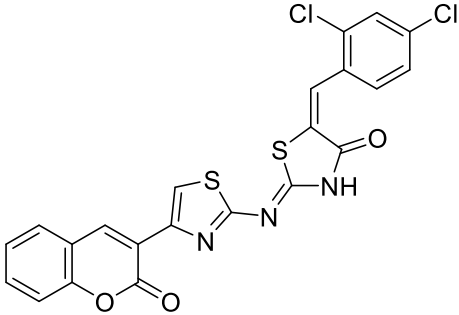
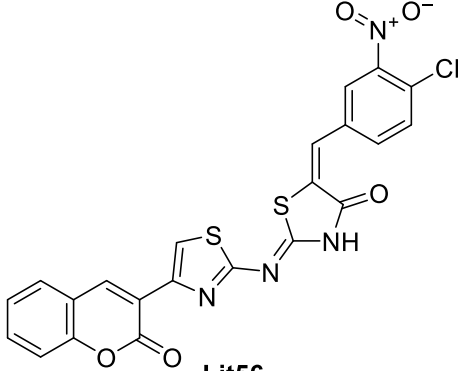
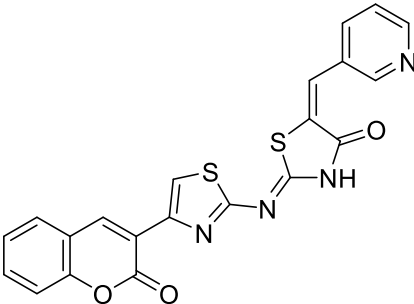
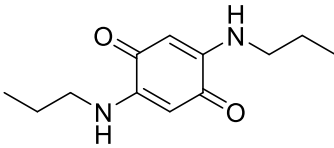
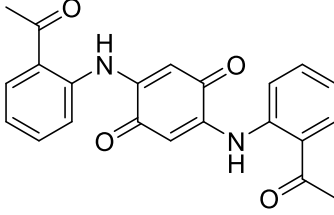
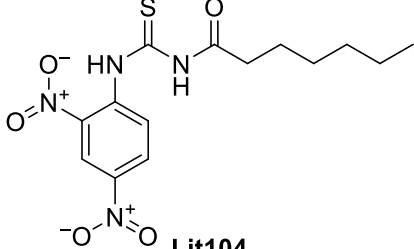
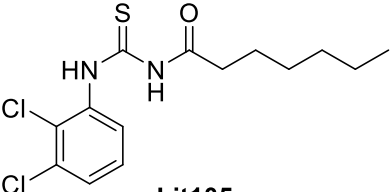
■	Interação de hidrogênio	■	Metal – aceptor	■	Repulsão estérica
■	Hidrogênio não-convencional	■	Hidrofóbica		

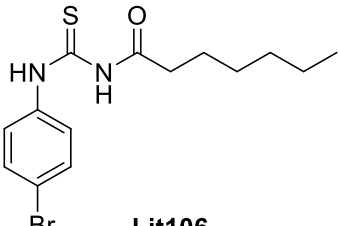
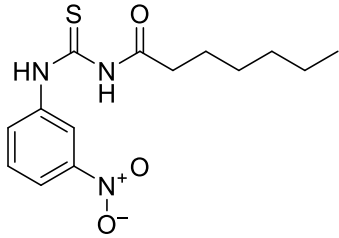
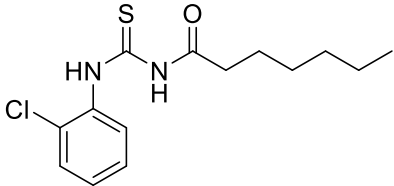
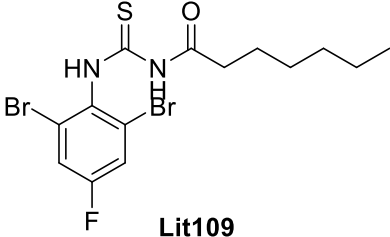
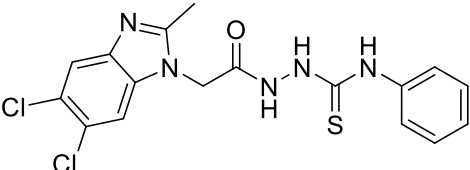
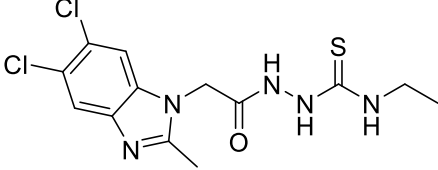
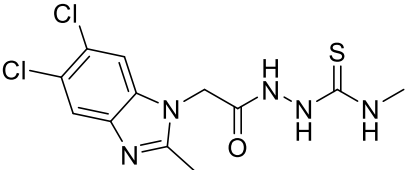
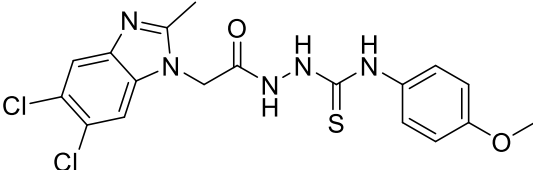
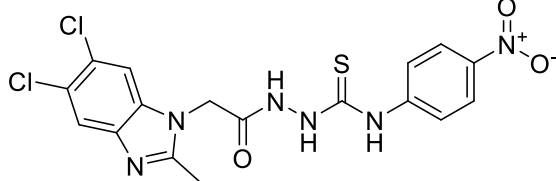
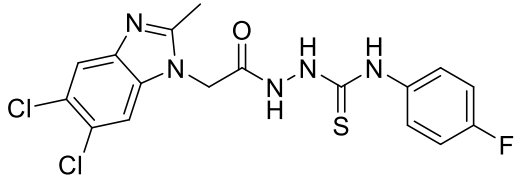
## APÊNDICE D

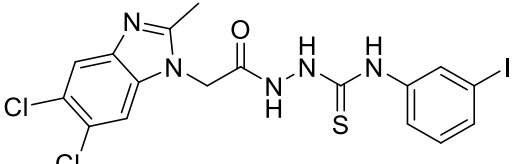
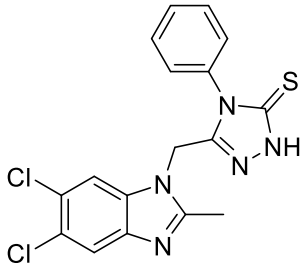
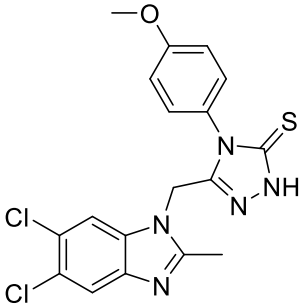
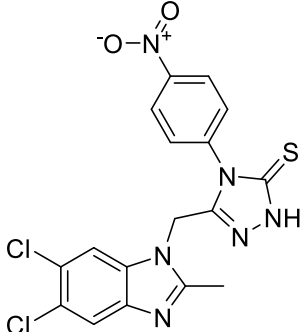
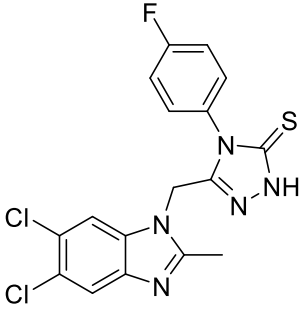
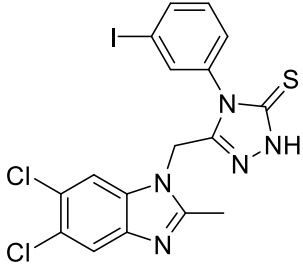
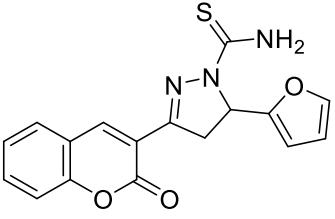
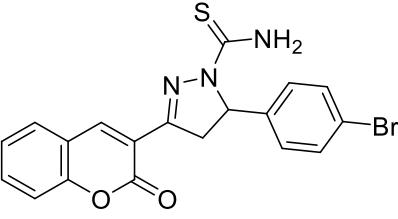
Estruturas 2D das substâncias da literatura triadas virtualmente

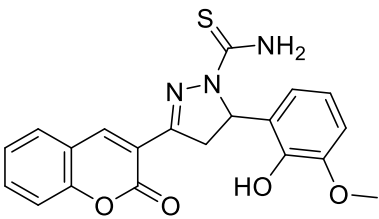
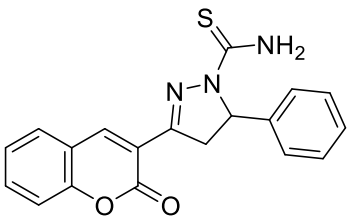
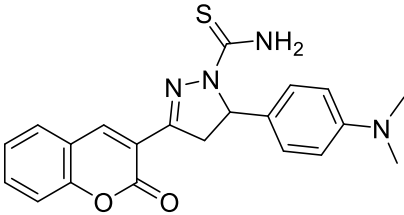
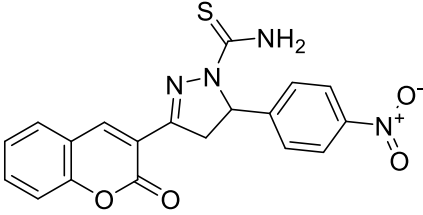
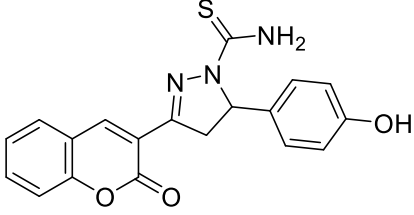
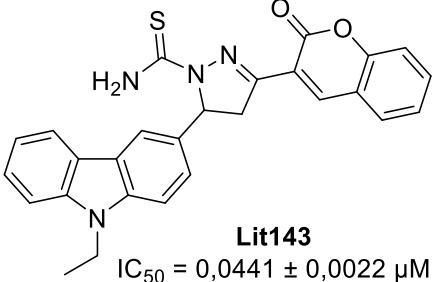
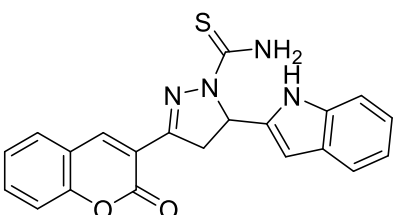
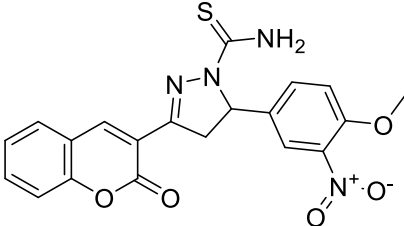
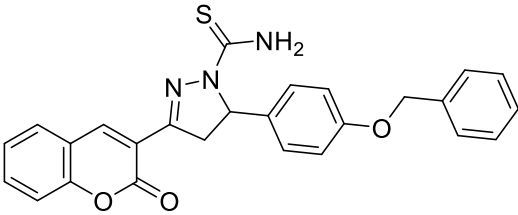
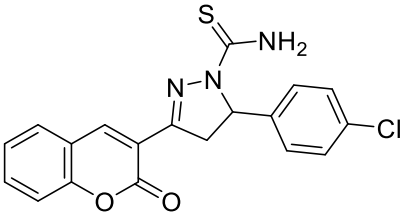
**Quadro D1** – Substâncias da literatura que compõem a faixa 1 de inibição da CEU ( $IC_{50} < 0,1 \mu M$ )

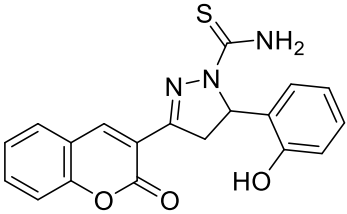
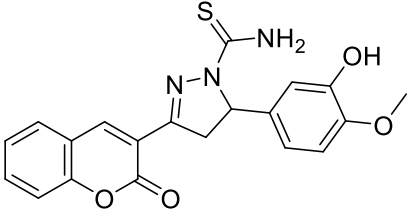
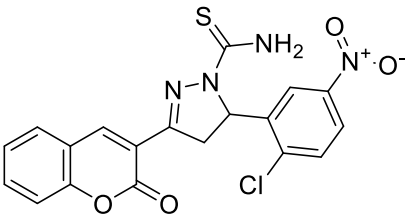
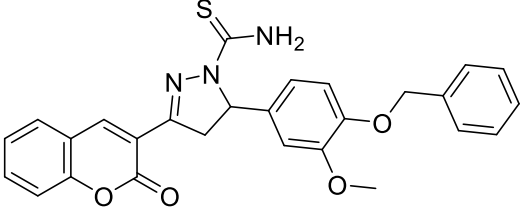
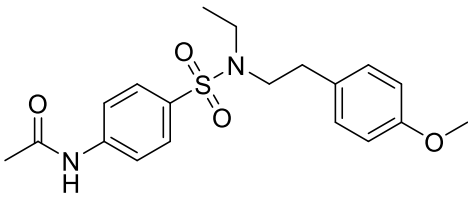
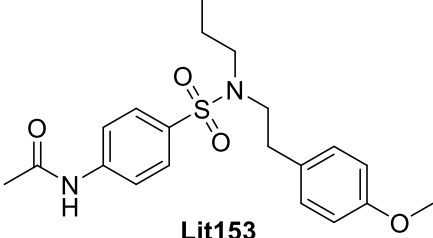
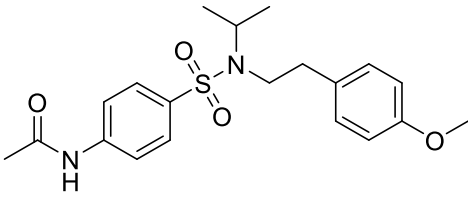
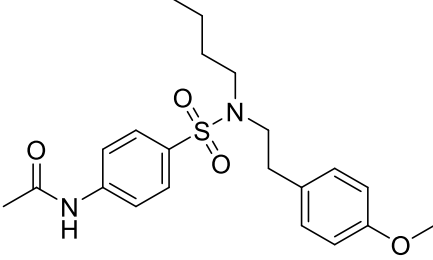
 <p><b>Lit48</b> <math>IC_{50} = 0,013 \mu M</math> Mahmood et al., 2020</p>	 <p><b>Lit49</b> <math>IC_{50} = 0,018 \mu M</math> Mahmood et al., 2020</p>
 <p><b>Lit50</b> <math>IC_{50} = 0,017 \mu M</math> Mahmood et al., 2020</p>	 <p><b>Lit51</b> <math>IC_{50} = 0,033 \mu M</math> Mahmood et al., 2020</p>
 <p><b>Lit52</b> <math>IC_{50} = 0,016 \mu M</math> Mahmood et al., 2020</p>	 <p><b>Lit53</b> <math>IC_{50} = 0,021 \mu M</math> Mahmood et al., 2020</p>

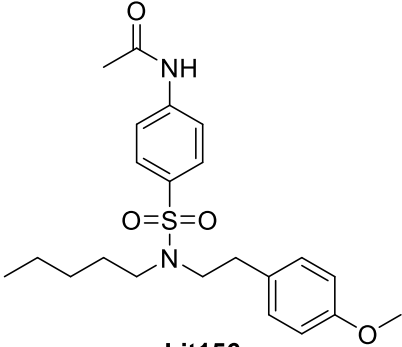
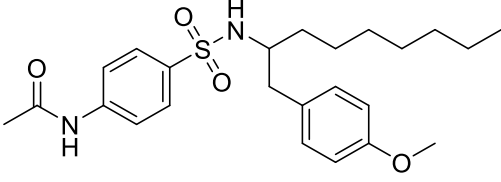
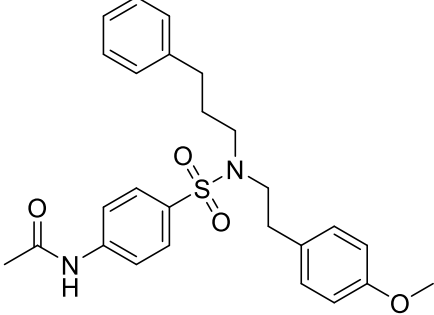
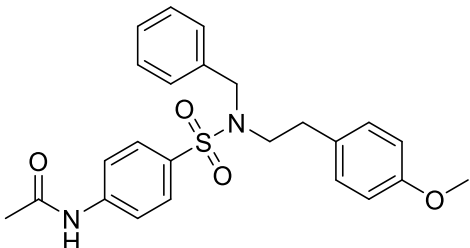
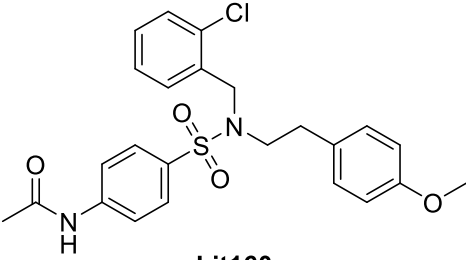
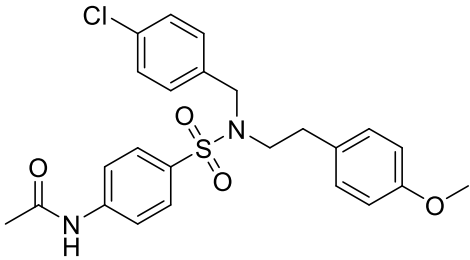
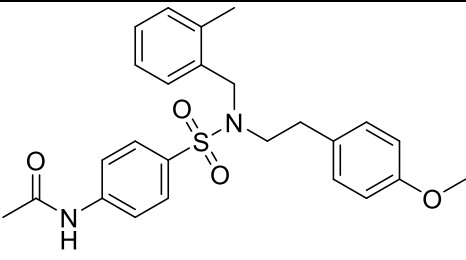
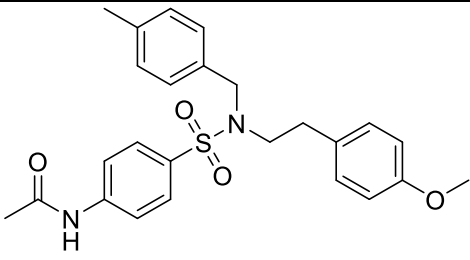
 <p><b>Lit54</b>  <math>IC_{50} = 0,019 \mu M</math>  Mahmood et al., 2020</p>	 <p><b>Lit55</b>  <math>IC_{50} = 0,008 \mu M</math>  Mahmood et al., 2020</p>
 <p><b>Lit56</b>  <math>IC_{50} = 0,013 \mu M</math>  Mahmood et al., 2020</p>	 <p><b>Lit57</b>  <math>IC_{50} = 0,027 \mu M</math>  Mahmood et al., 2020  (MAHMOOD <i>et al.</i>, 2020)</p>
 <p><b>Lit58</b>  <math>IC_{50} = 0,0314 \mu M</math>  Nain-Perez, et al 2019  (NAIN-PEREZ <i>et al.</i>, 2019)</p>	 <p><b>Lit59</b>  <math>IC_{50} = 0,036 \mu M</math>  Nain-Perez, et al 2019</p>
 <p><b>Lit104</b>  <math>IC_{50} = 0,0313 \pm 0,0021 \mu M</math>  Larik et al. 2019</p>	 <p><b>Lit105</b>  <math>IC_{50} = 0,0445 \pm 0,0036 \mu M</math>  Larik et al. 2019</p>

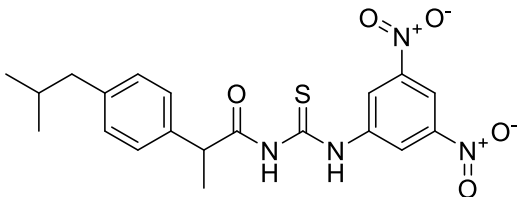
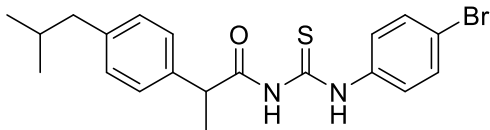
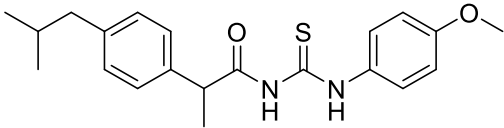
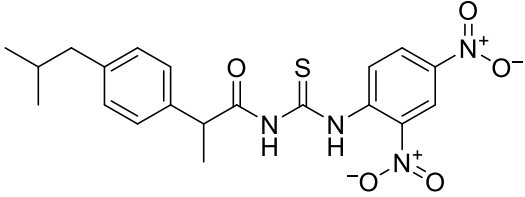
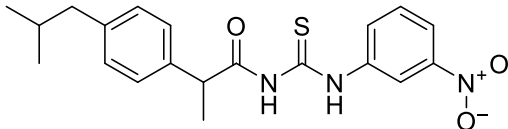
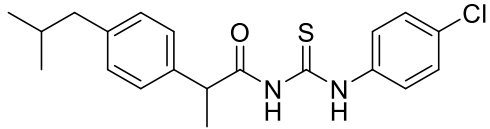
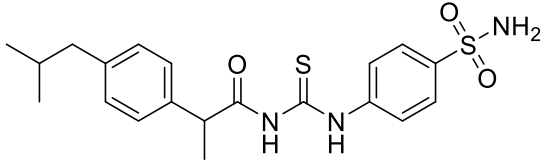
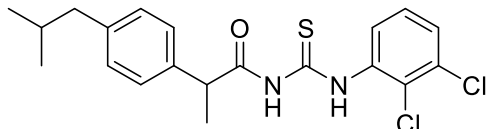
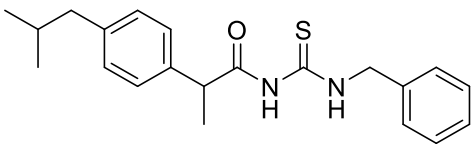
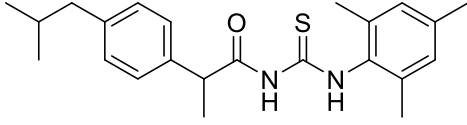
 <p><b>Lit106</b>  <math>IC_{50} = 0,0396 \pm 0,0038 \mu M</math>  Larik et al. 2019</p>	 <p><b>Lit107</b>  <math>IC_{50} = 0,0621 \pm 0,0041 \mu M</math>  Larik et al. 2019</p>
 <p><b>Lit108</b>  <math>IC_{50} = 0,0644 \pm 0,0062 \mu M</math>  Larik et al. 2019  (LARIK <i>et al.</i>, 2019)</p>	 <p><b>Lit109</b>  <math>IC_{50} = 0,0934 \pm 0,0082 \mu M</math>  Larik et al. 2019</p>
 <p><b>Lit116</b>  <math>IC_{50} = 0,0635 \pm 0,0013 \mu M</math>  Mentese et al. 2019</p>	 <p><b>Lit117</b>  <math>IC_{50} = 0,0921 \pm 0,0028 \mu M</math>  Mentese et al. 2019</p>
 <p><b>Lit118</b>  <math>IC_{50} = 0,0425 \pm 0,0015 \mu M</math>  Mentese et al. 2019</p>	 <p><b>Lit119</b>  <math>IC_{50} = 0,0653 \pm 0,0014 \mu M</math>  Mentese et al. 2019</p>
 <p><b>Lit120</b>  <math>IC_{50} = 0,0354 \pm 0,0017 \mu M</math>  Mentese et al. 2019</p>	 <p><b>Lit121</b>  <math>IC_{50} = 0,0771 \pm 0,0019 \mu M</math>  Mentese et al. 2019</p>

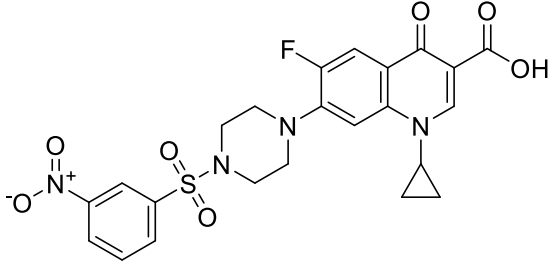
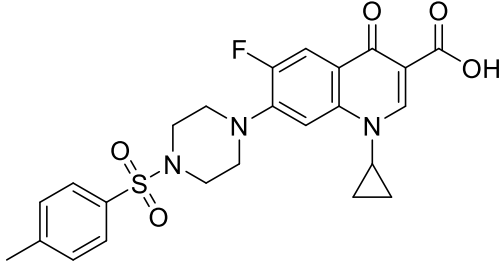
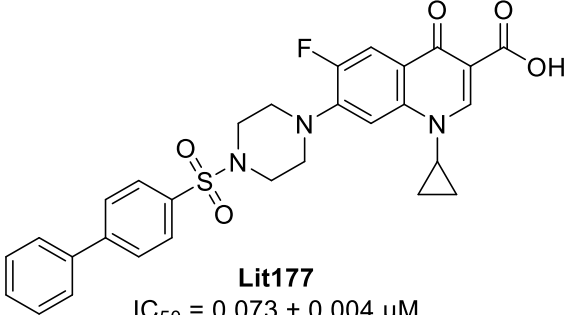
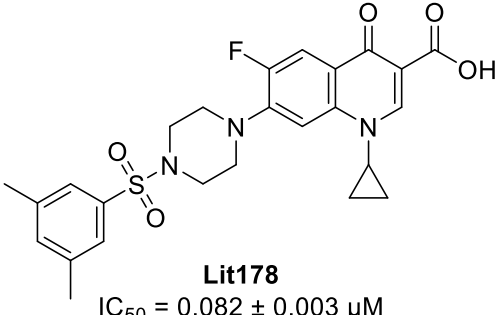
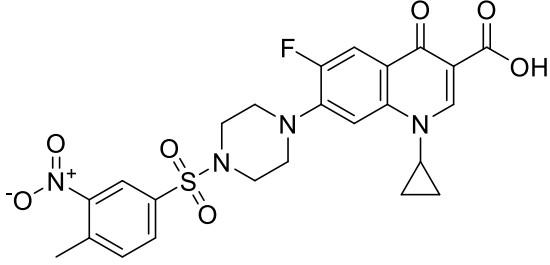
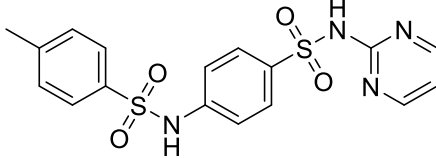
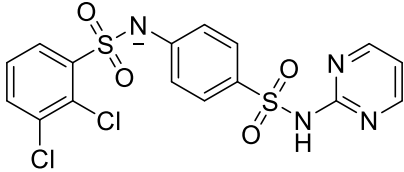
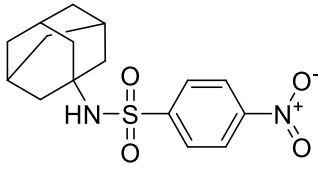
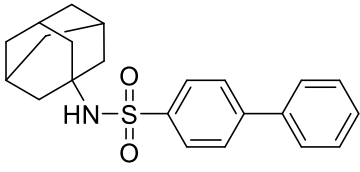
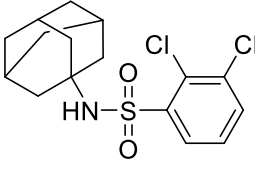
 <p><b>Lit123</b>  <math>IC_{50} = 0,0759 \pm 0,0015 \mu\text{M}</math>  Mentese et al. 2019  <b>(MENTEŞE et al., 2019)</b></p>	 <p><b>Lit124</b>  <math>IC_{50} = 0,0723 \pm 0,0011 \mu\text{M}</math>  Mentese et al. 2019</p>
 <p><b>Lit126</b>  <math>IC_{50} = 0,0720 \pm 0,0017 \mu\text{M}</math>  Mentese et al. 2019</p>	 <p><b>Lit127</b>  <math>IC_{50} = 0,0294 \pm 0,0015 \mu\text{M}</math>  Mentese et al. 2019</p>
 <p><b>Lit128</b>  <math>IC_{50} = 0,0549 \pm 0,0020 \mu\text{M}</math>  Mentese et al. 2019</p>	 <p><b>Lit129</b>  <math>IC_{50} = 0,0357 \pm 0,0015 \mu\text{M}</math>  Mentese et al. 2019</p>
 <p><b>Lit130</b>  <math>IC_{50} = 0,0014 \pm 0,00007 \mu\text{M}</math>  Saeed et al. 2017</p>	 <p><b>Lit131</b>  <math>IC_{50} = 0,0046 \pm 0,0023 \mu\text{M}</math>  Saeed et al. 2017</p>

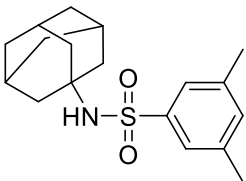
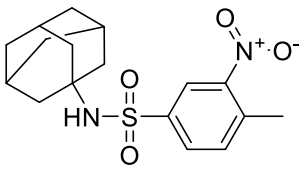
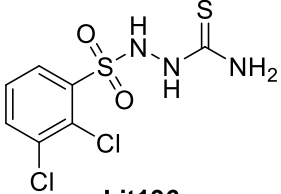
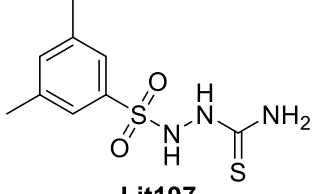
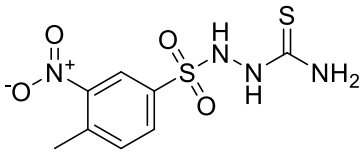
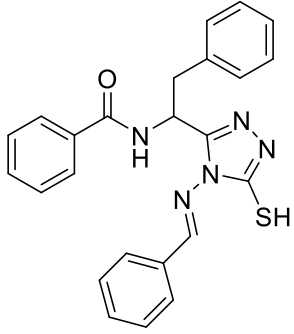
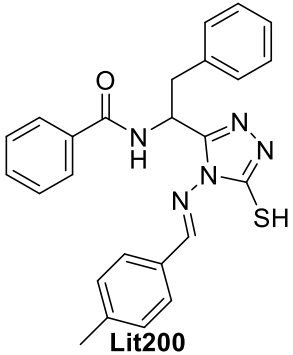
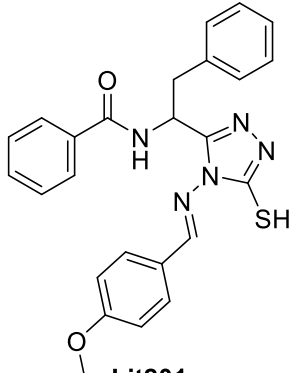
 <p><b>Lit132</b>  <math>IC_{50} = 0,00127 \pm 0,00006 \mu\text{M}</math>  Saeed et al. 2017</p>	 <p><b>Lit133</b>  <math>IC_{50} = 0,000358 \pm 0,00002 \mu\text{M}</math>  Saeed et al. 2017</p>
 <p><b>Lit134</b>  <math>IC_{50} = 0,0816 \pm 0,0040 \mu\text{M}</math>  Saeed et al. 2017</p>	 <p><b>Lit135</b>  <math>IC_{50} = 0,0061 \pm 0,0030 \mu\text{M}</math>  Saeed et al. 2017</p>
 <p><b>Lit136</b>  <math>IC_{50} = 0,0987 \pm 0,0016 \mu\text{M}</math>  Saeed et al. 2017</p>	 <p><b>Lit143</b>  <math>IC_{50} = 0,0441 \pm 0,0022 \mu\text{M}</math>  Saeed et al. 2017</p>
 <p><b>Lit144</b>  <math>IC_{50} = 0,0370 \pm 0,0018 \mu\text{M}</math>  Saeed et al. 2017</p>	 <p><b>Lit145</b>  <math>IC_{50} = 0,0436 \pm 0,0021 \mu\text{M}</math>  Saeed et al. 2017</p>
 <p><b>Lit146</b>  <math>IC_{50} = 0,0622 \pm 0,0031 \mu\text{M}</math>  Saeed et al. 2017</p>	 <p><b>Lit147</b>  <math>IC_{50} = 0,0092 \pm 0,0004 \mu\text{M}</math>  Saeed et al. 2017</p>

 <p><b>Lit148</b>  <math>IC_{50} = 0,0085 \pm 0,0004 \mu\text{M}</math>  Saeed et al. 2017</p>	 <p><b>Lit149</b>  <math>IC_{50} = 0,0070 \pm 0,0003 \mu\text{M}</math>  Saeed et al. 2017</p>
 <p><b>Lit150</b>  <math>IC_{50} = 0,0946 \pm 0,0047 \mu\text{M}</math>  Saeed et al. 2017</p>	 <p><b>Lit151</b>  <math>IC_{50} = 0,0437 \pm 0,0021 \mu\text{M}</math>  Saeed et al. 2017  (SAEED <i>et al.</i>, 2017a)</p>
 <p><b>Lit152</b>  <math>IC_{50} = 0,0269 \pm 0,0034 \mu\text{M}</math>  Abbasi et al. 2019</p>	 <p><b>Lit153</b>  <math>IC_{50} = 0,0623 \pm 0,0001 \mu\text{M}</math>  Abbasi et al. 2019</p>
 <p><b>Lit154</b>  <math>IC_{50} = 0,0698 \pm 0,0014 \mu\text{M}</math>  Abbasi et al. 2019</p>	 <p><b>Lit155</b>  <math>IC_{50} = 0,0333 \pm 0,0024 \mu\text{M}</math>  Abbasi et al. 2019</p>

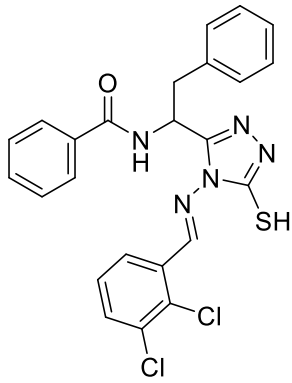
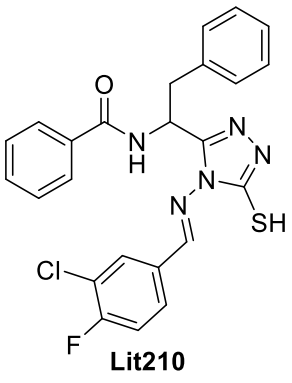
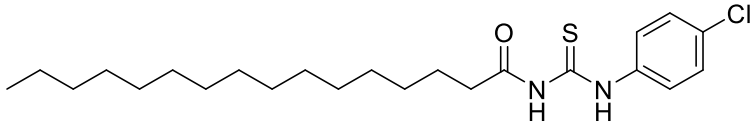
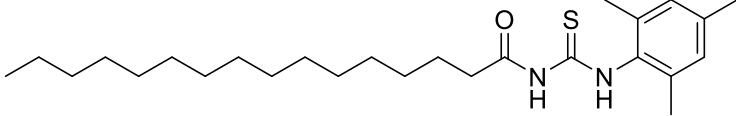
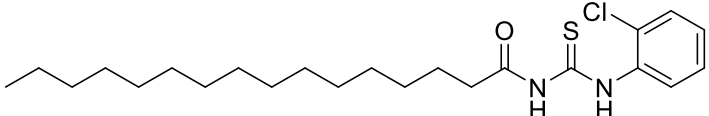
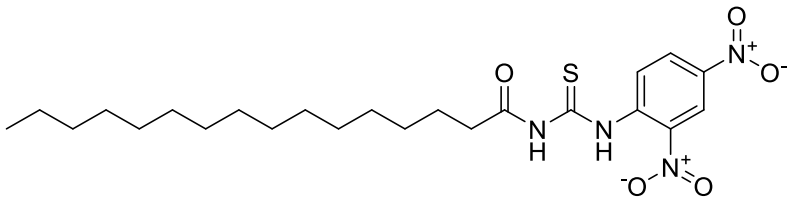
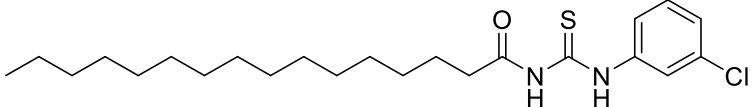
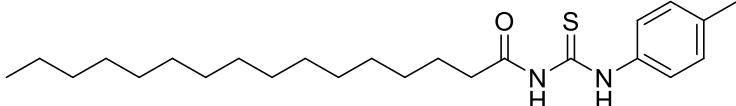
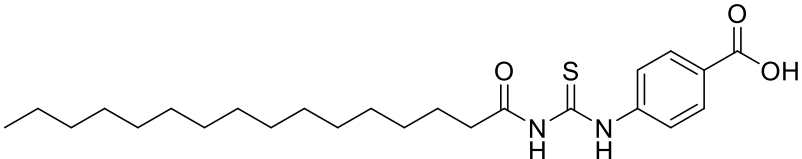
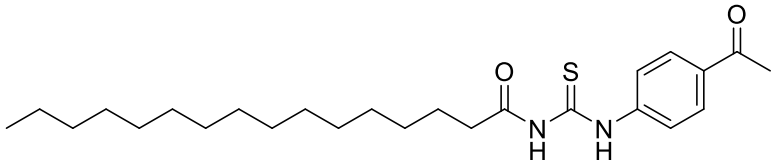
 <p><b>Lit156</b>  <math>IC_{50} = 0,0582 \pm 0,0157 \mu M</math>  Abbasi et al. 2019</p>	 <p><b>Lit157</b>  <math>IC_{50} = 0,0171 \pm 0,0070 \mu M</math>  Abbasi et al. 2019  <b>(ABBASI <i>et al.</i>, 2019)</b></p>
 <p><b>Lit158</b>  <math>IC_{50} = 0,0540 \pm 0,0250 \mu M</math>  Abbasi et al. 2019</p>	 <p><b>Lit159</b>  <math>IC_{50} = 0,0783 \pm 0,0163 \mu M</math>  Abbasi et al. 2019</p>
 <p><b>Lit160</b>  <math>IC_{50} = 0,0439 \pm 0,0076 \mu M</math>  Abbasi et al. 2019</p>	 <p><b>Lit161</b>  <math>IC_{50} = 0,0674 \pm 0,0142 \mu M</math>  Abbasi et al. 2019</p>
 <p><b>Lit162</b>  <math>IC_{50} = 0,0297 \pm 0,0039 \mu M</math>  Abbasi et al. 2019</p>	 <p><b>Lit163</b>  <math>IC_{50} = 0,0209 \pm 0,0059 \mu M</math>  Abbasi et al. 2019</p>

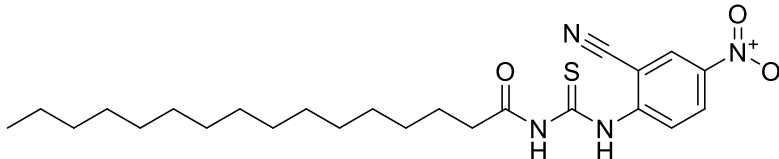
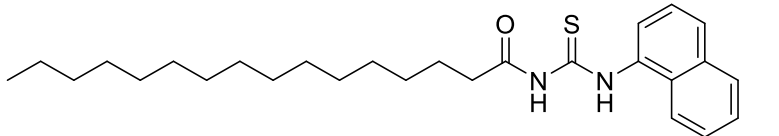
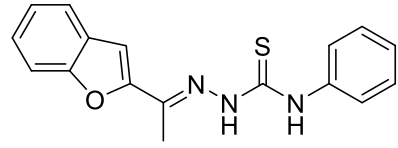
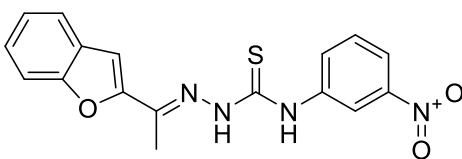
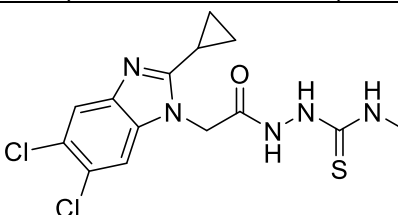
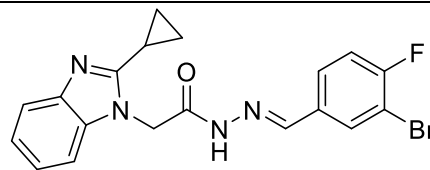
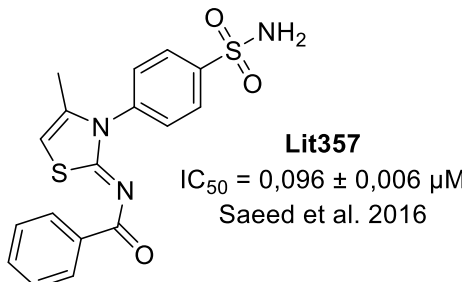
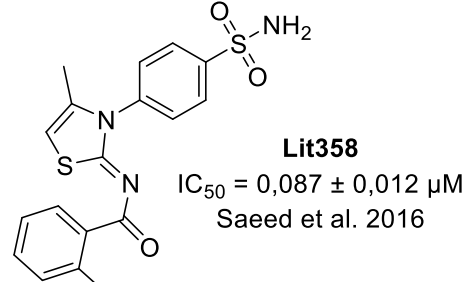
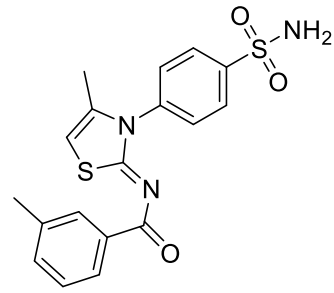
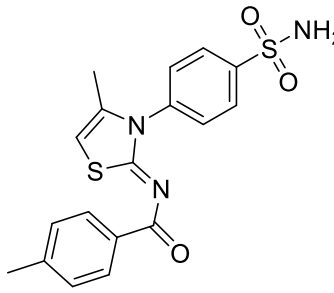
 <p><b>Lit165</b>  <math>IC_{50} = 0,0002599 \pm 0,00000825 \mu\text{M}</math>  Fattah et al. 2018</p>	 <p><b>Lit166</b>  <math>IC_{50} = 0,0002214 \pm 0,00000451 \mu\text{M}</math>  Fattah et al. 2018</p>
 <p><b>Lit167</b>  <math>IC_{50} = 0,0004626 \pm 0,000022 \mu\text{M}</math>  Fattah et al. 2018</p>	 <p><b>Lit168</b>  <math>IC_{50} = 0,0001216 \pm 0,00000451 \mu\text{M}</math>  Fattah et al. 2018</p>
 <p><b>Lit169</b>  <math>IC_{50} = 0,0000086 \pm 0,000000167 \mu\text{M}</math>  Fattah et al. 2018</p>	 <p><b>Lit170</b>  <math>IC_{50} = 0,0000381 \pm 0,00000214 \mu\text{M}</math>  Fattah et al. 2018</p>
 <p><b>Lit171</b>  <math>IC_{50} = 0,0000340 \pm 0,00000020 \mu\text{M}</math>  Fattah et al. 2018</p>	 <p><b>Lit172</b>  <math>IC_{50} = 0,0000081 \pm 0,000000351 \mu\text{M}</math>  Fattah et al. 2018</p>
 <p><b>Lit173</b>  <math>IC_{50} = 0,0000292 \pm 0,000000981 \mu\text{M}</math>  Fattah et al. 2018</p>	 <p><b>Lit174</b>  <math>IC_{50} = 0,0000094 \pm 0,00000040 \mu\text{M}</math>  Fattah et al. 2018  (FATTAH <i>et al.</i>, 2018)</p>

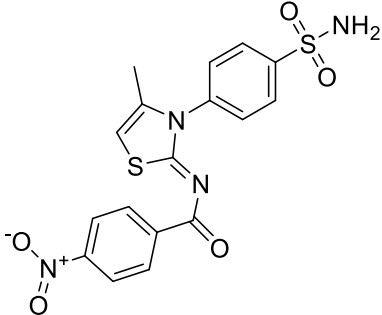
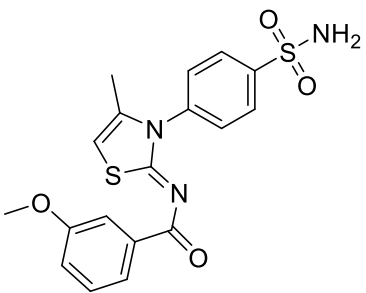
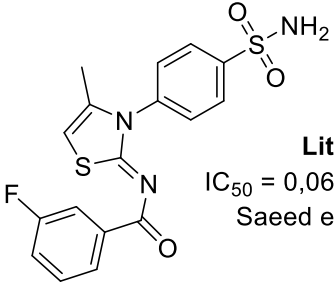
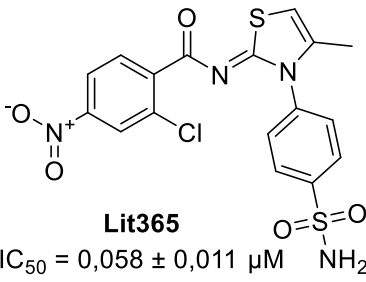
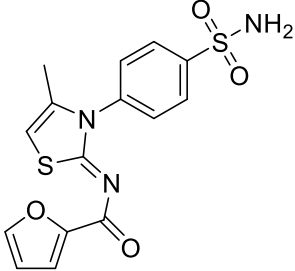
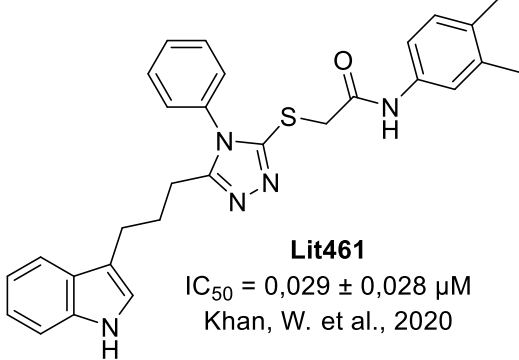
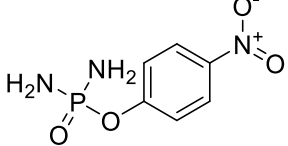
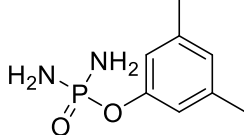
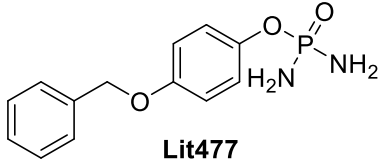
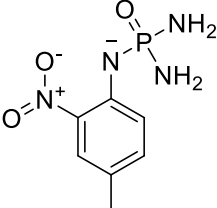
 <p><b>Lit175</b>  <math>IC_{50} = 0,081 \pm 0,003 \mu M</math>  Channar et al. 2017</p>	 <p><b>Lit176</b>  <math>IC_{50} = 0,078 \pm 0,003 \mu M</math>  Channar et al. 2017</p>
 <p><b>Lit177</b>  <math>IC_{50} = 0,073 \pm 0,004 \mu M</math>  Channar et al. 2017</p>	 <p><b>Lit178</b>  <math>IC_{50} = 0,082 \pm 0,003 \mu M</math>  Channar et al. 2017</p>
 <p><b>Lit179</b>  <math>IC_{50} = 0,045 \pm 0,001 \mu M</math>  Channar et al. 2017</p>	 <p><b>Lit180</b>  <math>IC_{50} = 0,002 \pm 0,000 \mu M</math>  Channar et al. 2017</p>
 <p><b>Lit181</b>  <math>IC_{50} = 0,095 \pm 0,004 \mu M</math>  Channar et al. 2017  (CHANNAR <i>et al.</i>, 2017)</p>	 <p><b>Lit188</b>  <math>IC_{50} = 0,02757 \pm 0,001 \mu M</math>  Channar et al. 2017</p>
 <p><b>Lit189</b>  <math>IC_{50} = 0,01776 \pm 0,000 \mu M</math>  Channar et al. 2017</p>	 <p><b>Lit190</b>  <math>IC_{50} = 0,0533 \pm 0,001 \mu M</math>  Channar et al. 2017</p>

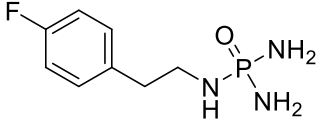
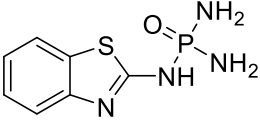
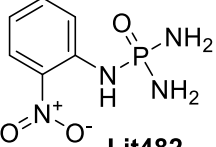
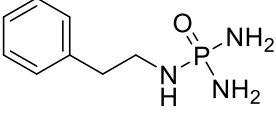
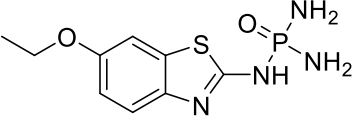
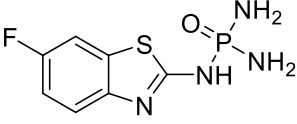
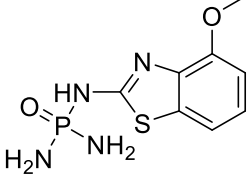
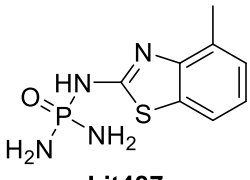
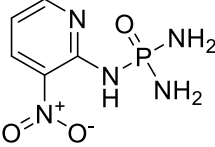
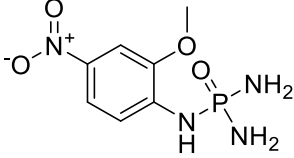
 <p><b>Lit191</b>  <math>IC_{50} = 0,0250 \pm 0,000 \mu M</math>  Channar et al. 2017</p>	 <p><b>Lit192</b>  <math>IC_{50} = 0,0558 \pm 0,001 \mu M</math>  Channar et al. 2017</p>
 <p><b>Lit196</b>  <math>IC_{50} = 0,026 \pm 0,002 \mu M</math>  Channar et al. 2017</p>	 <p><b>Lit197</b>  <math>IC_{50} = 0,096 \pm 0,004 \mu M</math>  Channar et al. 2017</p>
 <p><b>Lit198</b>  <math>IC_{50} = 0,067 \pm 0,0029 \mu M</math>  Channar et al. 2017</p>	 <p><b>Lit199</b>  <math>IC_{50} = 0,0962 \pm 0,00189 \mu M</math>  Saeed et al. 2017</p>
 <p><b>Lit200</b>  <math>IC_{50} = 0,0856 \pm 0,00368 \mu M</math>  Saeed et al. 2017</p>	 <p><b>Lit201</b>  <math>IC_{50} = 0,0137 \pm 0,00082 \mu M</math>  Saeed et al. 2017</p>

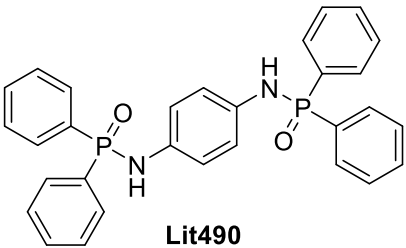
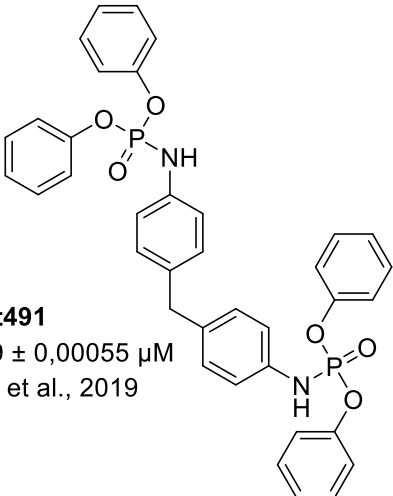
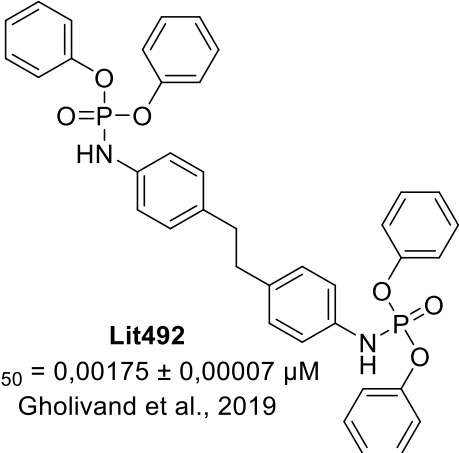
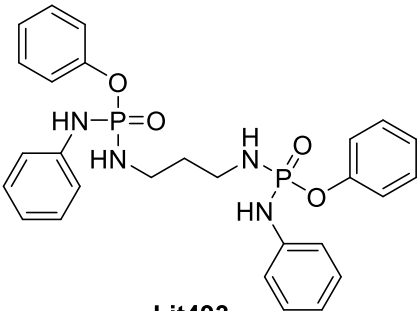
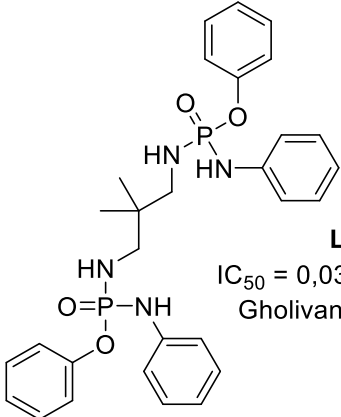
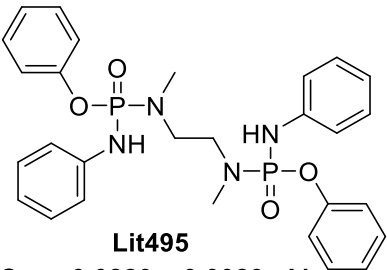
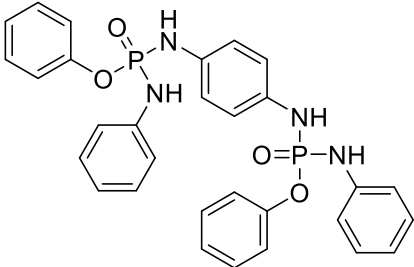
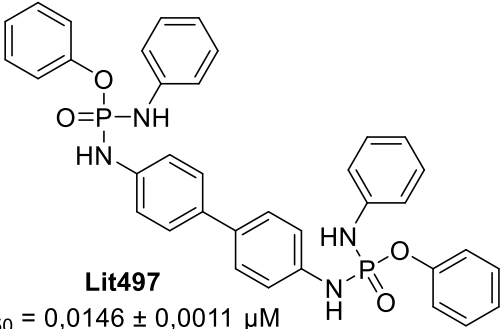
<p><b>Lit202</b> <math>IC_{50} = 0,0202 \pm 0,00073 \mu\text{M}</math> Saeed et al. 2017</p>	<p><b>Lit203</b> <math>IC_{50} = 0,0183 \pm 0,00068 \mu\text{M}</math> Saeed et al. 2017</p>
<p><b>Lit204</b> <math>IC_{50} = 0,0551 \pm 0,00156 \mu\text{M}</math> Saeed et al. 2017</p>	<p><b>Lit205</b> <math>IC_{50} = 0,750 \pm 0,0226 \mu\text{M}</math> Saeed et al. 2017</p>
<p><b>Lit206</b> <math>IC_{50} = 0,070 \pm 0,0011 \mu\text{M}</math> Saeed et al. 2017</p>	<p><b>Lit207</b> <math>IC_{50} = 0,0191 \pm 0,00057 \mu\text{M}</math> Saeed et al. 2017</p>

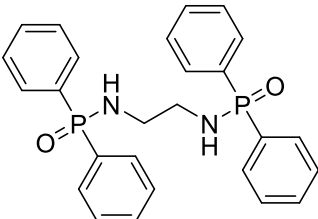
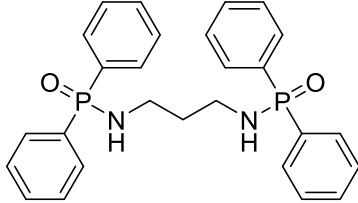
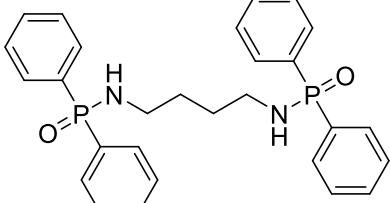
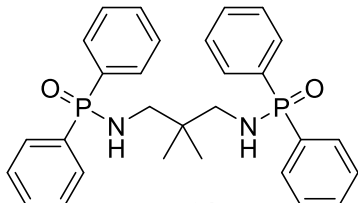
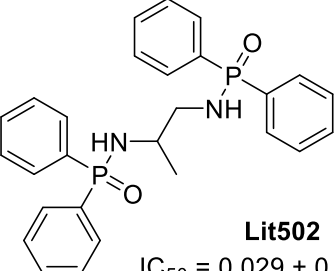
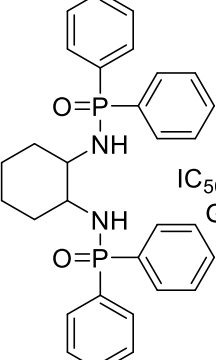
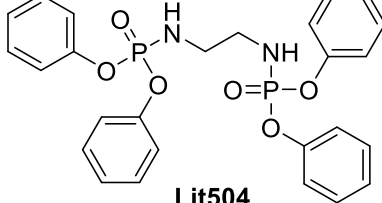
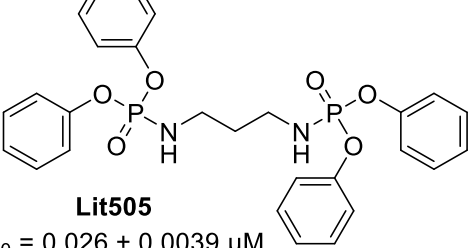
 <p><b>Lit208</b>  <math>IC_{50} = 0,00866 \pm 0,00018 \mu M</math>  Saeed et al. 2017</p>	 <p><b>Lit210</b>  <math>IC_{50} = 0,044 \pm 0,00148 \mu M</math>  Saeed et al. 2017  (SAEED et al., 2017b)</p>
 <p><b>Lit211</b>  <math>IC_{50} = 0,01701 \mu M</math>  Saeed et al. 2017  (SAEED et al., 2017c)</p>	
 <p><b>Lit212</b>  <math>IC_{50} = 0,06001 \mu M</math>  Saeed et al. 2017</p>	
 <p><b>Lit213</b>  <math>IC_{50} = 0,07532 \mu M</math>  Saeed et al. 2017</p>	
 <p><b>Lit214</b>  <math>IC_{50} = 0,02937 \mu M</math>  Saeed et al. 2017</p>	
 <p><b>Lit215</b>  <math>IC_{50} = 0,0300 \mu M</math>  Saeed et al. 2017</p>	
 <p><b>Lit216</b>  <math>IC_{50} = 0,03674 \mu M</math>  Saeed et al. 2017</p>	
 <p><b>Lit217</b>  <math>IC_{50} = 0,05293 \mu M</math>  Saeed et al. 2017</p>	
 <p><b>Lit218</b>  <math>IC_{50} = 0,04001 \mu M</math>  Saeed et al. 2017</p>	

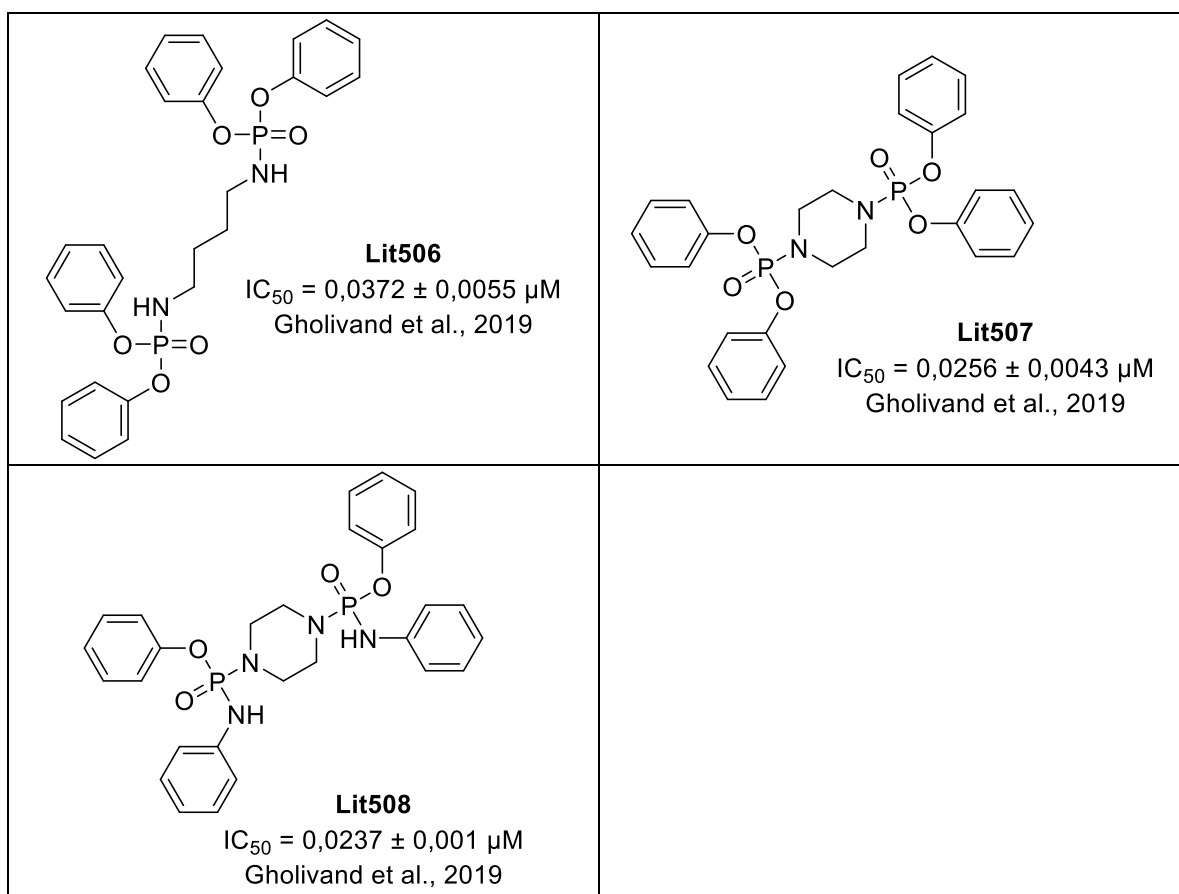
 <p><b>Lit219</b>  <math>IC_{50} = 0,06047 \mu M</math>  Saeed et al. 2017</p>	
 <p><b>Lit220</b>  <math>IC_{50} = 0,04282 \mu M</math>  Saeed et al. 2017</p>	
 <p><b>Lit304</b>  <math>IC_{50} = 0,089 \pm 0,24 \mu M</math>  Hanif et al. 2012  <b>(HANIF et al., 2012)</b></p>	 <p><b>Lit314</b>  <math>IC_{50} = 0,077 \pm 0,001 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>
 <p><b>Lit327</b>  <math>IC_{50} = 0,05 \pm 0,002 \mu M</math>  Mentese et al. 2017</p>	 <p><b>Lit334</b>  <math>IC_{50} = 0,06 \pm 0,008 \mu M</math>  Mentese et al. 2017  <b>(MENTEŞE et al., 2017)</b></p>
 <p><b>Lit357</b>  <math>IC_{50} = 0,096 \pm 0,006 \mu M</math>  Saeed et al. 2016</p>	 <p><b>Lit358</b>  <math>IC_{50} = 0,087 \pm 0,012 \mu M</math>  Saeed et al. 2016</p>
 <p><b>Lit359</b>  <math>IC_{50} = 0,087 \pm 0,006 \mu M</math>  Saeed et al. 2016</p>	 <p><b>Lit360</b>  <math>IC_{50} = 0,072 \pm 0,015 \mu M</math>  Saeed et al. 2016</p>

 <p><b>Lit361</b>  <math>IC_{50} = 0,083 \pm 0,007 \mu\text{M}</math>  Saeed et al. 2016</p>	 <p><b>Lit363</b>  <math>IC_{50} = 0,081 \pm 0,003 \mu\text{M}</math>  Saeed et al. 2016</p>
 <p><b>Lit364</b>  <math>IC_{50} = 0,064 \pm 0,01 \mu\text{M}</math>  Saeed et al. 2016</p> <p>(SAEED <i>et al.</i>, 2016)</p>	 <p><b>Lit365</b>  <math>IC_{50} = 0,058 \pm 0,011 \mu\text{M}</math>  Saeed et al. 2016</p>
 <p><b>Lit366</b>  <math>IC_{50} = 0,083 \pm 0,02 \mu\text{M}</math>  Saeed et al. 2016</p>	 <p><b>Lit461</b>  <math>IC_{50} = 0,029 \pm 0,028 \mu\text{M}</math>  Khan, W. et al., 2020</p>
 <p><b>Lit475</b>  <math>IC_{50} = 0,063 \mu\text{M}</math>  Domínguez et al., 2008</p>	 <p><b>Lit476</b>  <math>IC_{50} = 0,026 \mu\text{M}</math>  Domínguez et al., 2008</p>
 <p><b>Lit477</b>  <math>IC_{50} = 0,016 \mu\text{M}</math>  Domínguez et al., 2008</p> <p>(DOMÍNGUEZ <i>et al.</i>, 2008)</p>	 <p><b>Lit478</b>  <math>IC_{50} = 0,0035 \mu\text{M}</math>  Domínguez et al., 2008</p>

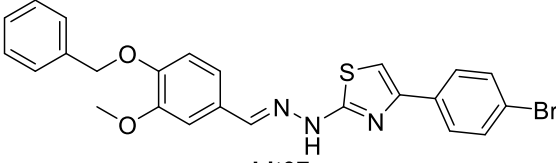
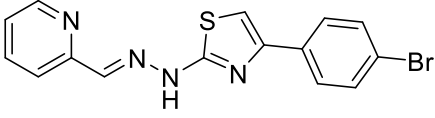
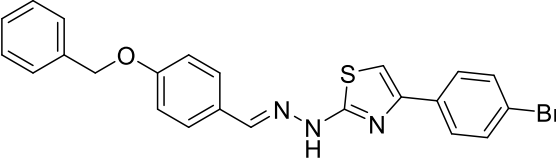
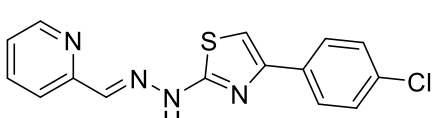
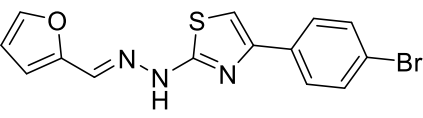
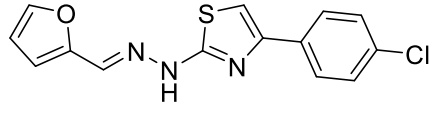
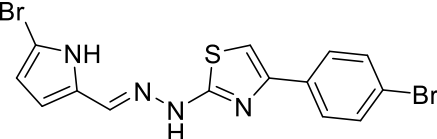
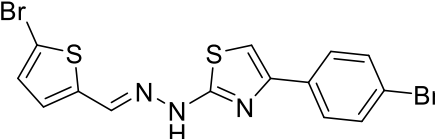
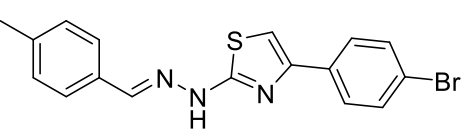
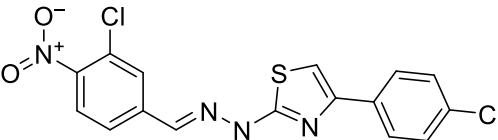
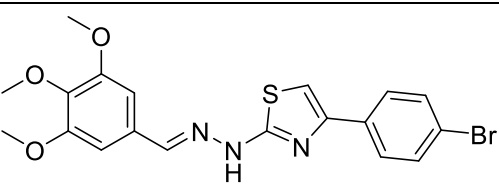
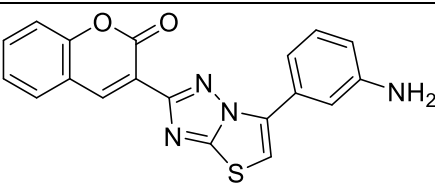
 <p><b>Lit479</b>  <math>IC_{50} = 0,049 \mu M</math>  Domínguez et al., 2008</p>	 <p><b>Lit480</b>  <math>IC_{50} = 0,002 \mu M</math>  Domínguez et al., 2008</p>
 <p><b>Lit482</b>  <math>IC_{50} = 0,003 \mu M</math>  Domínguez et al., 2008</p>	 <p><b>Lit483</b>  <math>IC_{50} = 0,014 \mu M</math>  Domínguez et al., 2008</p>
 <p><b>Lit484</b>  <math>IC_{50} = 0,005 \mu M</math>  Domínguez et al., 2008</p>	 <p><b>Lit485</b>  <math>IC_{50} = 0,005 \mu M</math>  Domínguez et al., 2008</p>
 <p><b>Lit486</b>  <math>IC_{50} = 0,010 \mu M</math>  Domínguez et al., 2008</p>	 <p><b>Lit487</b>  <math>IC_{50} = 0,010 \mu M</math>  Domínguez et al., 2008</p>
 <p><b>Lit488</b>  <math>IC_{50} = 0,010 \mu M</math>  Domínguez et al., 2008</p>	 <p><b>Lit489</b>  <math>IC_{50} = 0,020 \mu M</math>  Domínguez et al., 2008</p>

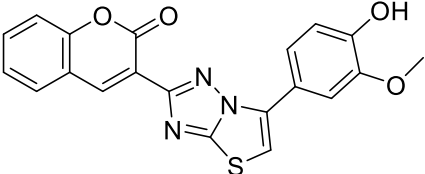
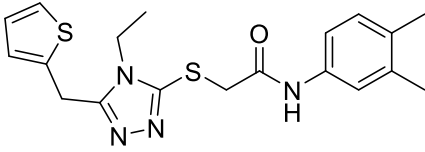
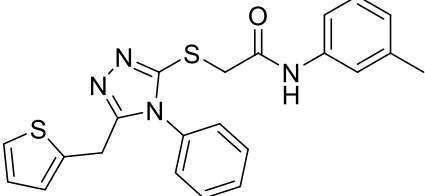
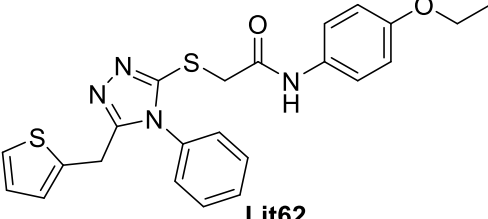
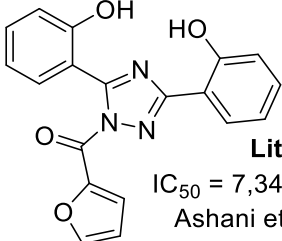
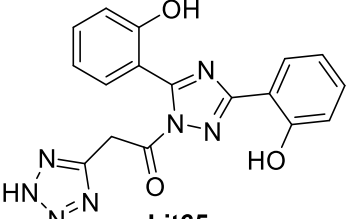
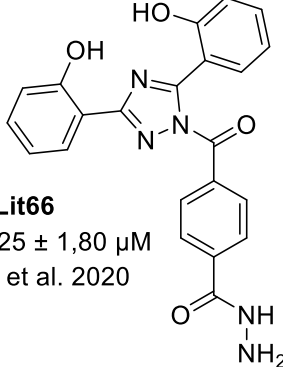
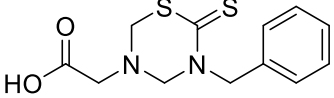
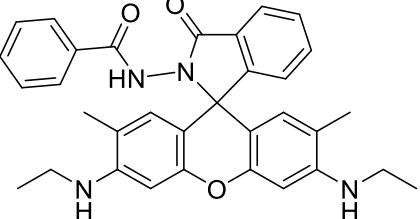
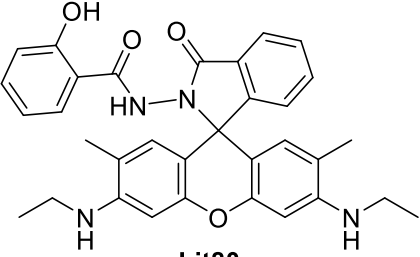
 <p><b>Lit490</b>  <math>IC_{50} = 0,0028 \pm 0,00035 \mu M</math>  Gholivand et al., 2019  <b>(GHOLIVAND <i>et al.</i>, 2019)</b></p>	 <p><b>Lit491</b>  <math>IC_{50} = 0,0029 \pm 0,00055 \mu M</math>  Gholivand et al., 2019</p>
 <p><b>Lit492</b>  <math>IC_{50} = 0,00175 \pm 0,00007 \mu M</math>  Gholivand et al., 2019</p>	 <p><b>Lit493</b>  <math>IC_{50} = 0,0302 \pm 0,0005 \mu M</math>  Gholivand et al., 2019</p>
 <p><b>Lit494</b>  <math>IC_{50} = 0,0348 \pm 0,003 \mu M</math>  Gholivand et al., 2019</p>	 <p><b>Lit495</b>  <math>IC_{50} = 0,0220 \pm 0,0029 \mu M</math>  Gholivand et al., 2019</p>
 <p><b>Lit496</b>  <math>IC_{50} = 0,0256 \pm 0,016 \mu M</math>  Gholivand et al., 2019</p>	 <p><b>Lit497</b>  <math>IC_{50} = 0,0146 \pm 0,0011 \mu M</math>  Gholivand et al., 2019</p>

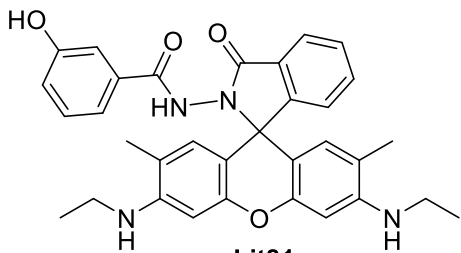
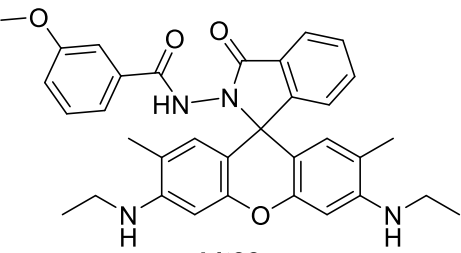
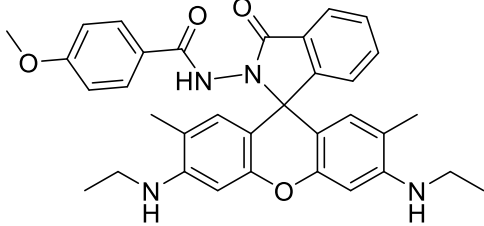
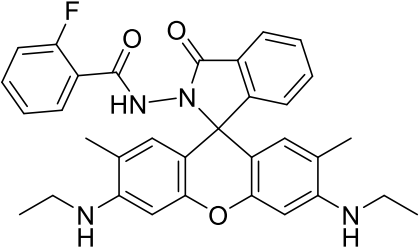
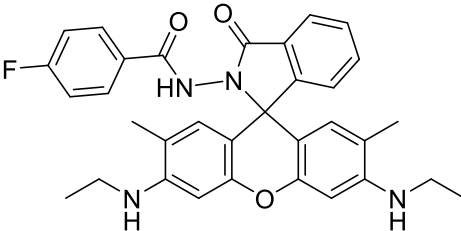
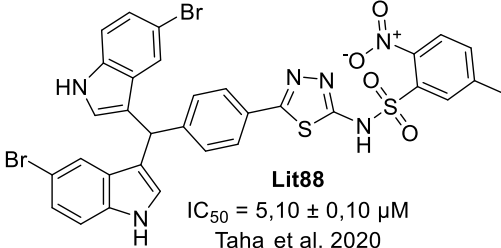
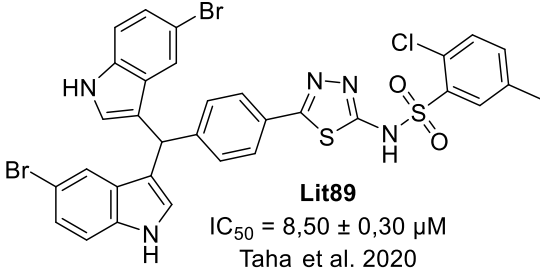
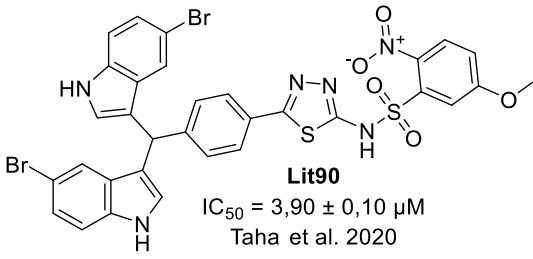
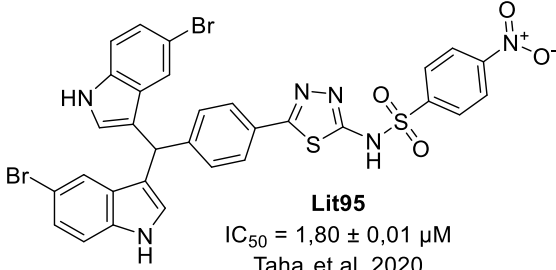
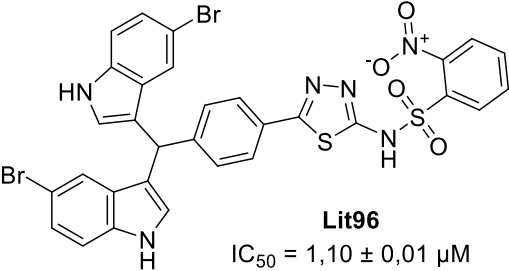
 <p><b>Lit498</b>  <math>IC_{50} = 0,027 \pm 0,0021 \mu\text{M}</math>  Gholivand et al., 2019</p>	 <p><b>Lit499</b>  <math>IC_{50} = 0,029 \pm 0,010 \mu\text{M}</math>  Gholivand et al., 2019</p>
 <p><b>Lit500</b>  <math>IC_{50} = 0,0323 \pm 0,018 \mu\text{M}</math>  Gholivand et al., 2019</p>	 <p><b>Lit501</b>  <math>IC_{50} = 0,028 \pm 0,016 \mu\text{M}</math>  Gholivand et al., 2019</p>
 <p><b>Lit502</b>  <math>IC_{50} = 0,029 \pm 0,012 \mu\text{M}</math>  Gholivand et al., 2019</p>	 <p><b>Lit503</b>  <math>IC_{50} = 0,0035 \pm 0,0187 \mu\text{M}</math>  Gholivand et al., 2019</p>
 <p><b>Lit504</b>  <math>IC_{50} = 0,0308 \pm 0,0017 \mu\text{M}</math>  Gholivand et al., 2019</p>	 <p><b>Lit505</b>  <math>IC_{50} = 0,026 \pm 0,0039 \mu\text{M}</math>  Gholivand et al., 2019</p>

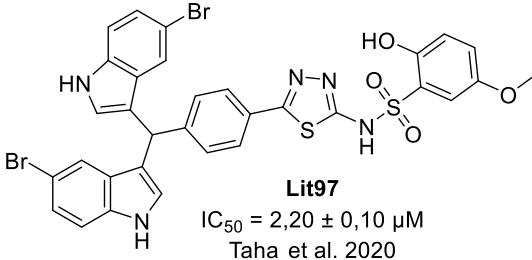
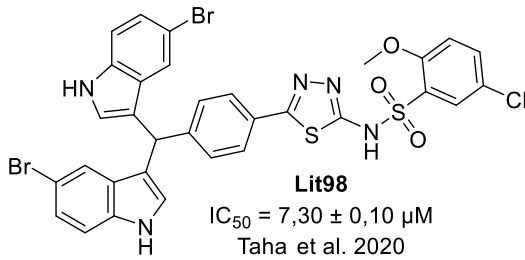
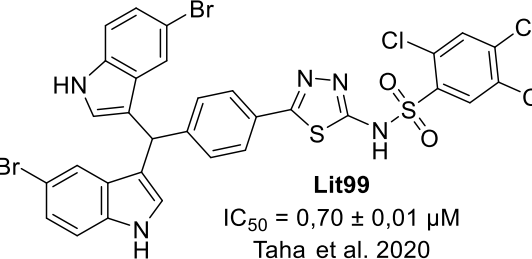
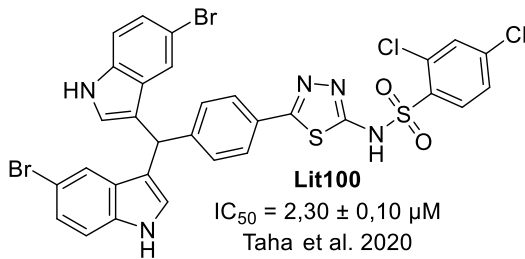
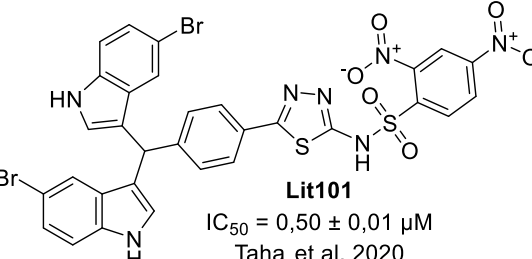
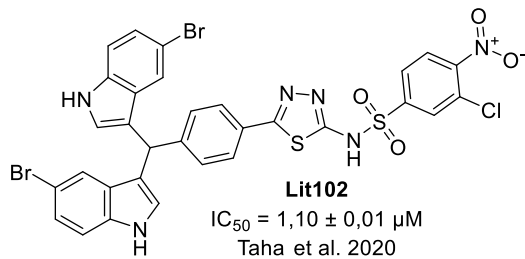
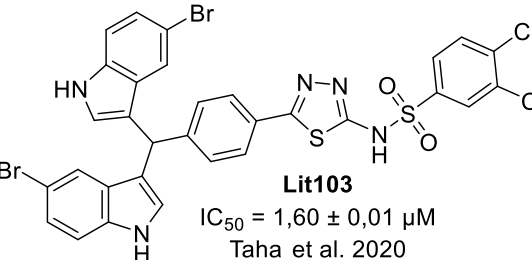
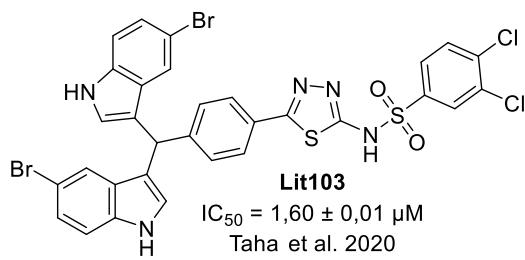
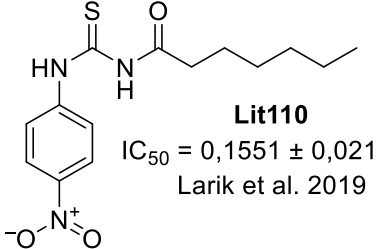
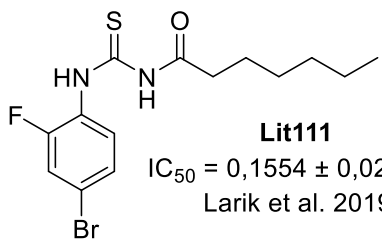
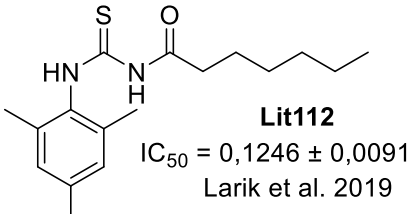
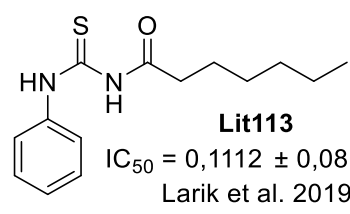


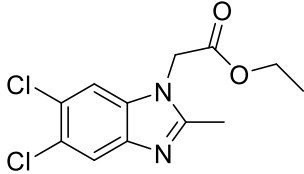
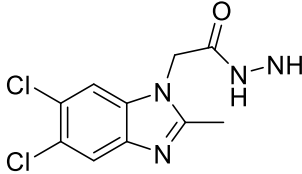
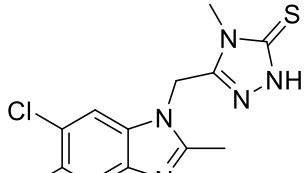
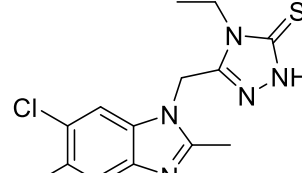
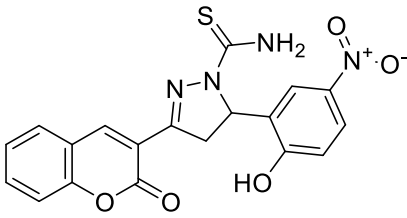
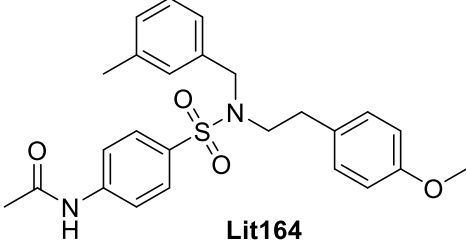
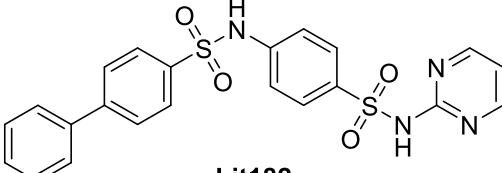
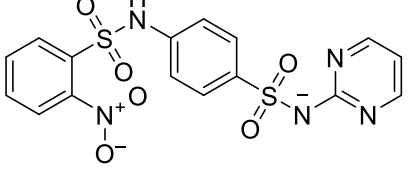
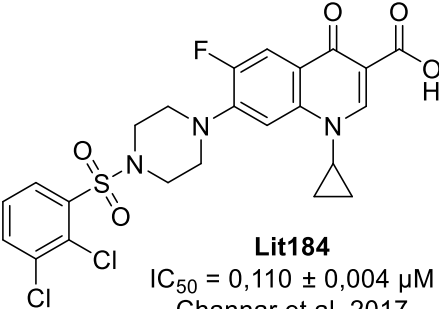
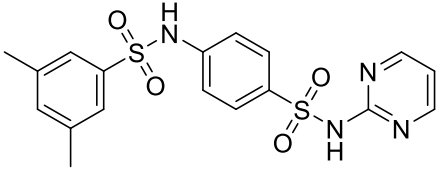
**Quadro D2 – Substâncias da literatura que compõem a faixa 2 de inibição da CEU ( $IC_{50} = 0,1 - 10 \mu M$ )**

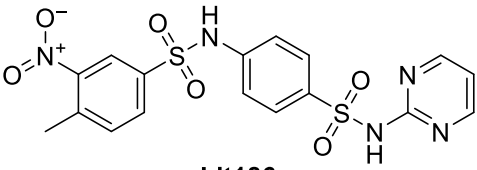
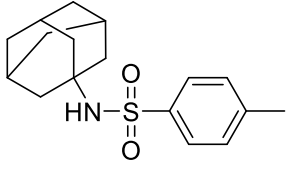
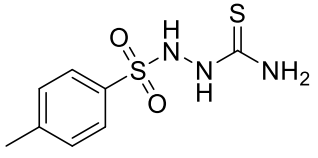
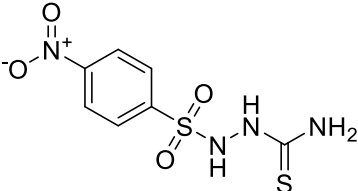
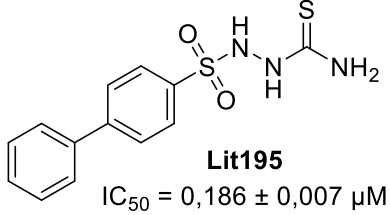
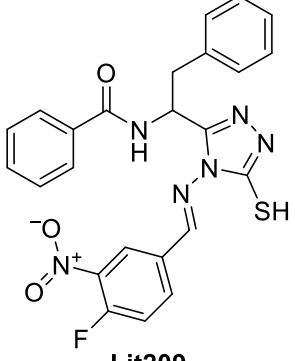
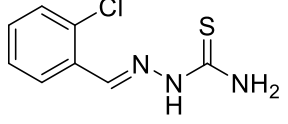
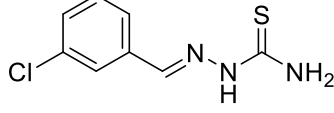
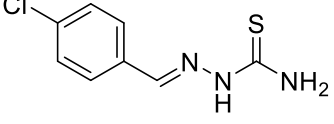
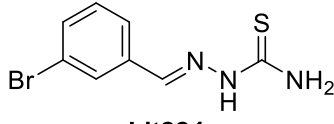
 <p><b>Lit07</b>  <math>IC_{50} = 0,33 \pm 0,03 \mu M</math>            Channar et al., 2020</p>	 <p><b>Lit09</b>  <math>IC_{50} = 0,16 \pm 0,004 \mu M</math>            Channar et al., 2020  <b>(CHANNAR et al., 2021)</b></p>
 <p><b>Lit08</b>  <math>IC_{50} = 0,44 \pm 0,02 \mu M</math>            Channar et al., 2020</p>	 <p><b>Lit10</b>  <math>IC_{50} = 0,26 \pm 0,02 \mu M</math>            Channar et al., 2020</p>
 <p><b>Lit11</b>  <math>IC_{50} = 0,21 \pm 0,01 \mu M</math>            Channar et al., 2020</p>	 <p><b>Lit12</b>  <math>IC_{50} = 0,12 \pm 0,003 \mu M</math>            Channar et al., 2020</p>
 <p><b>Lit13</b>  <math>IC_{50} = 0,20 \pm 0,002 \mu M</math>            Channar et al., 2020</p>	 <p><b>Lit14</b>  <math>IC_{50} = 0,13 \pm 0,002 \mu M</math>            Channar et al., 2020</p>
 <p><b>Lit15</b>  <math>IC_{50} = 0,11 \pm 0,003 \mu M</math>            Channar et al., 2020</p>	 <p><b>Lit16</b>  <math>IC_{50} = 0,28 \pm 0,01 \mu M</math>            Channar et al., 2020</p>
 <p><b>Lit17</b>  <math>IC_{50} = 0,11 \pm 0,005 \mu M</math>            Channar et al., 2020</p>	 <p><b>Lit40</b>  <math>IC_{50} = 4,35 \pm 0,18 \mu M</math>            Khan et al., 2020</p>

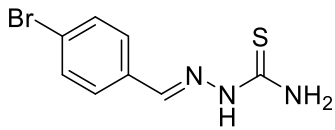
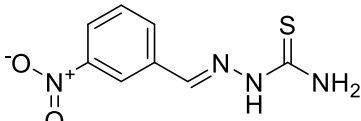
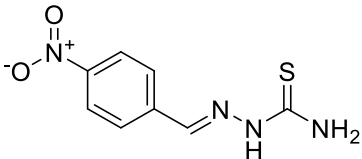
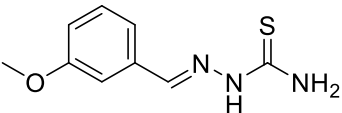
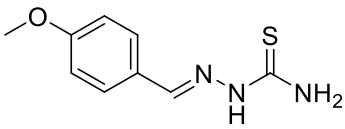
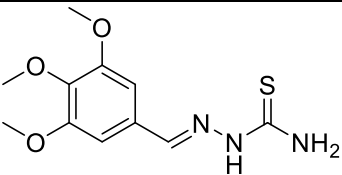
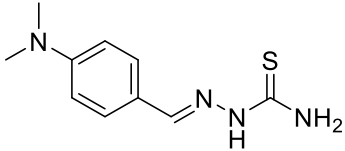
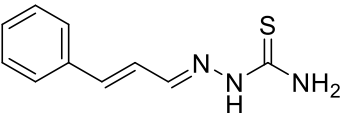
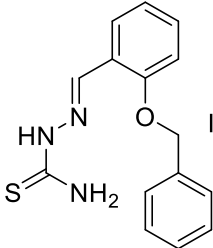
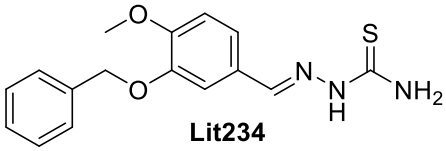
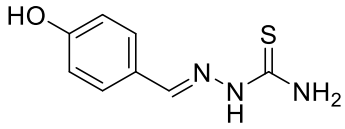
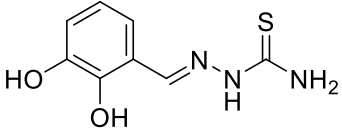
 <p><b>Lit43</b>  <math>IC_{50} = 9,24 \pm 0,42 \mu M</math>  Khan et al., 2020  <b>(KHAN, I. et al., 2020)</b></p>	 <p><b>Lit60</b>  <math>IC_{50} = 8,79 \pm 0,057 \mu M</math>  Riaz et al. 2020  <b>(RIAZ et al., 2020)</b></p>
 <p><b>Lit61</b>  <math>IC_{50} = 7,27 \pm 0,05 \mu M</math>  Riaz et al. 2020</p>	 <p><b>Lit62</b>  <math>IC_{50} = 7,35 \pm 0,04 \mu M</math>  Riaz et al. 2020</p>
 <p><b>Lit64</b>  <math>IC_{50} = 7,34 \pm 2,19 \mu M</math>  Ashani et al. 2020  <b>(ASHANI et al., 2020)</b></p>	 <p><b>Lit65</b>  <math>IC_{50} = 1,27 \pm 2,03 \mu M</math>  Ashani et al. 2020</p>
 <p><b>Lit66</b>  <math>IC_{50} = 3,25 \pm 1,80 \mu M</math>  Ashani et al. 2020</p>	 <p><b>Lit67</b>  <math>IC_{50} = 9,8 \pm 0,5 \mu M</math>  Shah et al. 2019  <b>(SHAH et al., 2019)</b></p>
 <p><b>Lit79</b>  <math>IC_{50} = 0,111 \pm 0,004 \mu M</math>  Vanjare et al 2020  <b>(VANJARE et al., 2020)</b></p>	 <p><b>Lit80</b>  <math>IC_{50} = 0,143 \pm 0,061 \mu M</math>  Vanjare et al 2020</p>

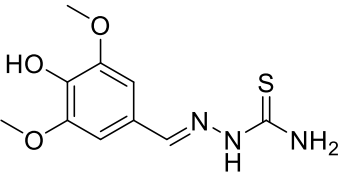
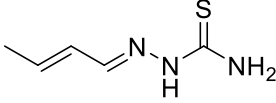
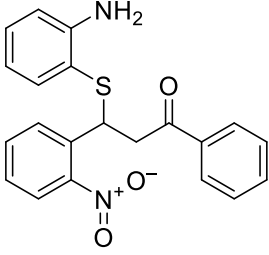
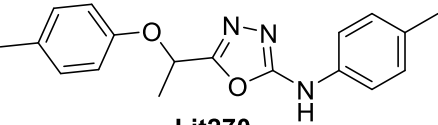
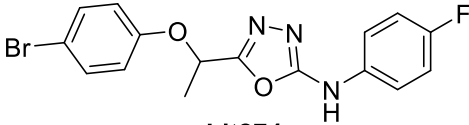
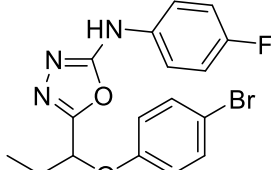
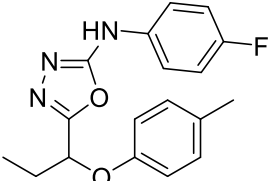
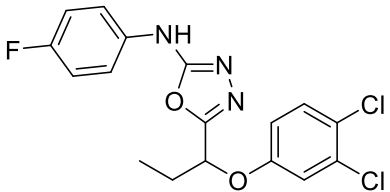
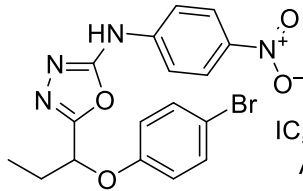
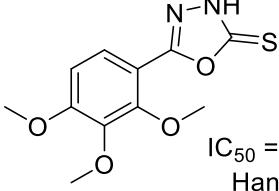
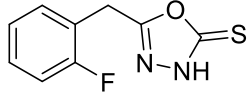
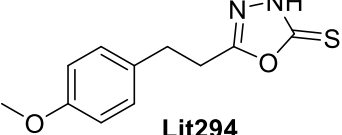
 <p><b>Lit81</b>  <math>IC_{50} = 0,114 \pm 0,029 \mu M</math>  Vanjare et al 2020</p>	 <p><b>Lit82</b>  <math>IC_{50} = 0,146 \pm 0,019 \mu M</math>  Vanjare et al 2020</p>
 <p><b>Lit83</b>  <math>IC_{50} = 0,864 \pm 0,083 \mu M</math>  Vanjare et al 2020</p>	 <p><b>Lit84</b>  <math>IC_{50} = 0,152 \pm 0,020 \mu M</math>  Vanjare et al 2020</p>
 <p><b>Lit85</b>  <math>IC_{50} = 0,149 \pm 0,034 \mu M</math>  Vanjare et al 2020</p>	 <p><b>Lit88</b>  <math>IC_{50} = 5,10 \pm 0,10 \mu M</math>  Taha et al. 2020  <b>(TAHA et al., 2020)</b></p>
 <p><b>Lit89</b>  <math>IC_{50} = 8,50 \pm 0,30 \mu M</math>  Taha et al. 2020</p>	 <p><b>Lit90</b>  <math>IC_{50} = 3,90 \pm 0,10 \mu M</math>  Taha et al. 2020</p>
 <p><b>Lit95</b>  <math>IC_{50} = 1,80 \pm 0,01 \mu M</math>  Taha et al. 2020</p>	 <p><b>Lit96</b>  <math>IC_{50} = 1,10 \pm 0,01 \mu M</math>  Taha et al. 2020</p>

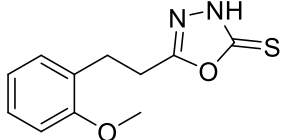
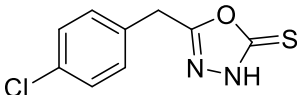
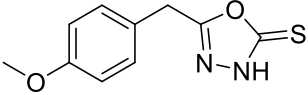
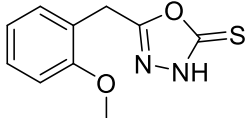
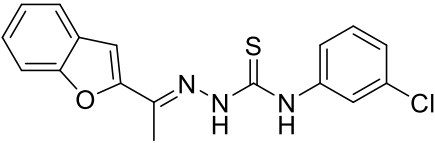
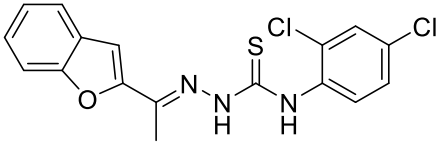
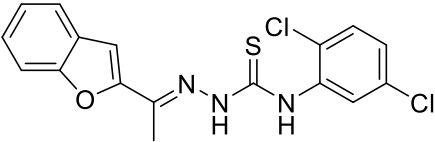
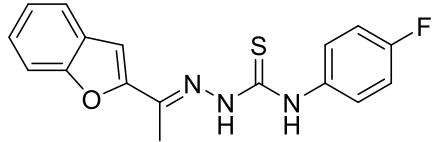
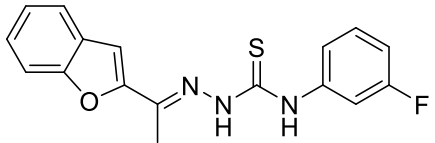
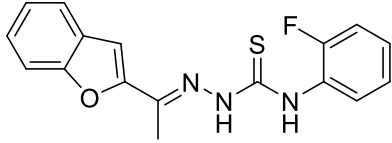
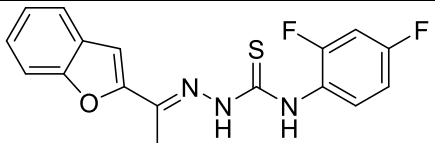
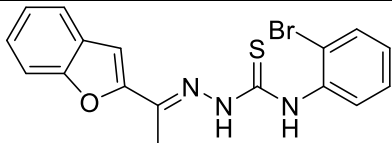
 <p><b>Lit97</b>  <math>IC_{50} = 2,20 \pm 0,10 \mu M</math>  Taha et al. 2020</p>	 <p><b>Lit98</b>  <math>IC_{50} = 7,30 \pm 0,10 \mu M</math>  Taha et al. 2020</p>
 <p><b>Lit99</b>  <math>IC_{50} = 0,70 \pm 0,01 \mu M</math>  Taha et al. 2020</p>	 <p><b>Lit100</b>  <math>IC_{50} = 2,30 \pm 0,10 \mu M</math>  Taha et al. 2020</p>
 <p><b>Lit101</b>  <math>IC_{50} = 0,50 \pm 0,01 \mu M</math>  Taha et al. 2020</p>	 <p><b>Lit102</b>  <math>IC_{50} = 1,10 \pm 0,01 \mu M</math>  Taha et al. 2020</p>
 <p><b>Lit103</b>  <math>IC_{50} = 1,60 \pm 0,01 \mu M</math>  Taha et al. 2020</p>	 <p><b>Lit103</b>  <math>IC_{50} = 1,60 \pm 0,01 \mu M</math>  Taha et al. 2020</p>
 <p><b>Lit110</b>  <math>IC_{50} = 0,1551 \pm 0,021 \mu M</math>  Larik et al. 2019</p>	 <p><b>Lit111</b>  <math>IC_{50} = 0,1554 \pm 0,024 \mu M</math>  Larik et al. 2019</p>
 <p><b>Lit112</b>  <math>IC_{50} = 0,1246 \pm 0,0091 \mu M</math>  Larik et al. 2019</p>	 <p><b>Lit113</b>  <math>IC_{50} = 0,1112 \pm 0,081 \mu M</math>  Larik et al. 2019</p>

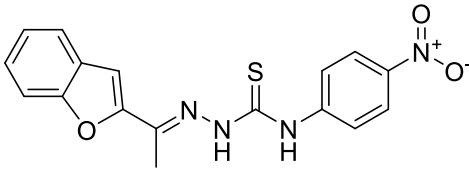
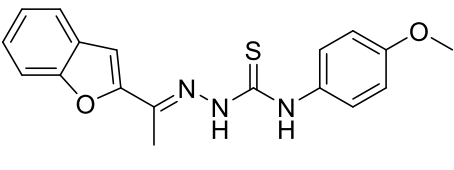
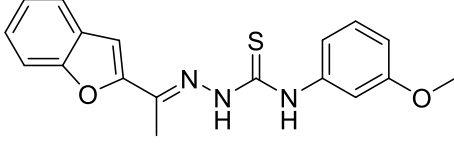
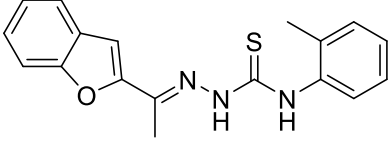
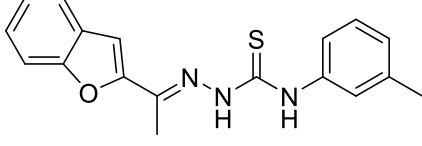
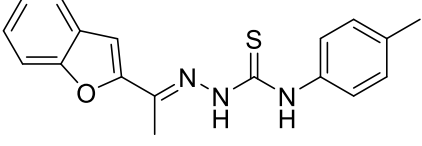
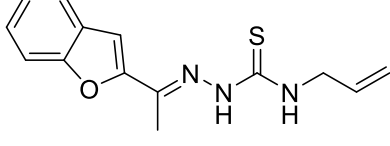
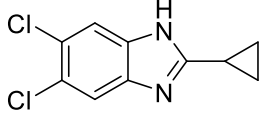
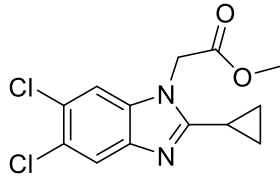
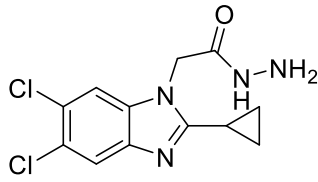
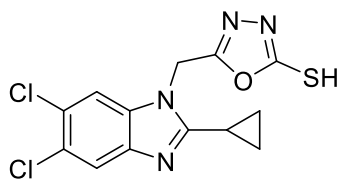
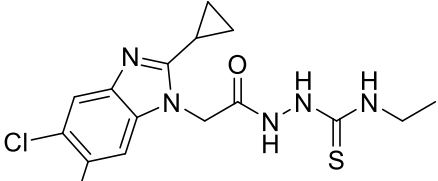
 <p><b>Lit114</b>  <math>IC_{50} = 0,1222 \pm 0,028 \mu M</math>  Mentese et al. 2019</p>	 <p><b>Lit115</b>  <math>IC_{50} = 0,1299 \pm 0,0018 \mu M</math>  Mentese et al. 2019</p>
 <p><b>Lit122</b>  <math>IC_{50} = 0,1081 \pm 0,0042 \mu M</math>  Mentese et al. 2019</p>	 <p><b>Lit125</b>  <math>IC_{50} = 0,1384 \pm 0,0048 \mu M</math>  Mentese et al. 2019</p>
 <p><b>Lit142</b>  <math>IC_{50} = 0,1287 \pm 0,0064 \mu M</math>  Saeed et al. 2017</p>	 <p><b>Lit164</b>  <math>IC_{50} = 0,1285 \pm 0,0419 \mu M</math>  Abbasi et al. 2019</p>
 <p><b>Lit182</b>  <math>IC_{50} = 0,141 \pm 0,007 \mu M</math>  Channar et al. 2017</p>	 <p><b>Lit183</b>  <math>IC_{50} = 0,223 \pm 0,011 \mu M</math>  Channar et al. 2017</p>
 <p><b>Lit184</b>  <math>IC_{50} = 0,110 \pm 0,004 \mu M</math>  Channar et al. 2017</p>	 <p><b>Lit185</b>  <math>IC_{50} = 0,174 \pm 0,009 \mu M</math>  Channar et al. 2017</p>

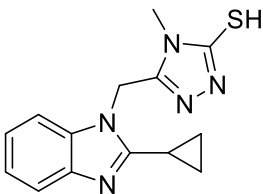
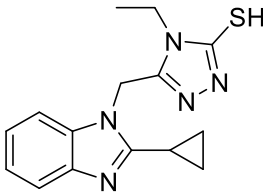
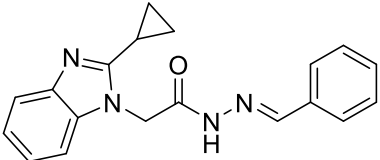
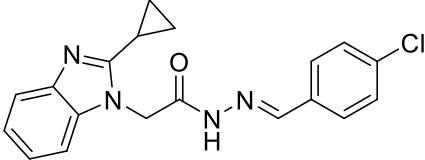
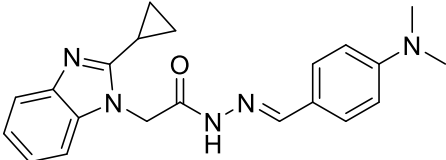
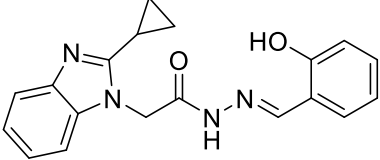
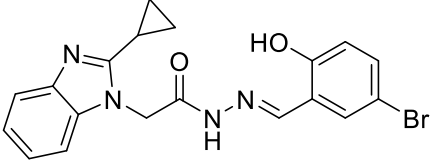
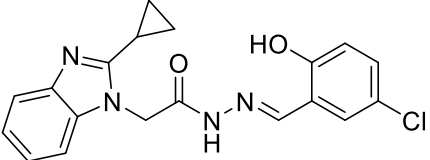
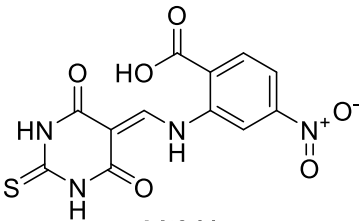
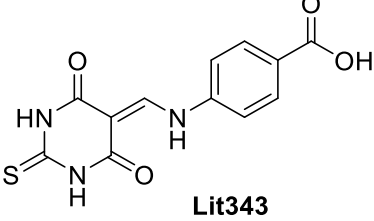
 <p><b>Lit186</b>  <math>IC_{50} = 0,127 \pm 0,0076 \mu\text{M}</math>  Channar et al. 2017</p>	 <p><b>Lit187</b>  <math>IC_{50} = 0,2888 \pm 0,015 \mu\text{M}</math>  Channar et al. 2017</p>
 <p><b>Lit193</b>  <math>IC_{50} = 0,2254 \pm 0,006 \mu\text{M}</math>  Channar et al. 2017</p>	 <p><b>Lit194</b>  <math>IC_{50} = 0,141 \pm 0,004 \mu\text{M}</math>  Channar et al. 2017</p>
 <p><b>Lit195</b>  <math>IC_{50} = 0,186 \pm 0,007 \mu\text{M}</math>  Channar et al. 2017</p>	 <p><b>Lit209</b>  <math>IC_{50} = 0,113 \pm 0,0044 \mu\text{M}</math>  Saeed et al. 2017</p>
 <p><b>Lit221</b>  <math>IC_{50} = 0,215 \pm 0,09 \mu\text{M}</math>  Aslam et al. 2011</p>	 <p><b>Lit222</b>  <math>IC_{50} = 0,670 \pm 0,04 \mu\text{M}</math>  Aslam et al. 2011</p>
 <p><b>Lit223</b>  <math>IC_{50} = 0,410 \pm 0,07 \mu\text{M}</math>  Aslam et al. 2011</p>	 <p><b>Lit224</b>  <math>IC_{50} = 0,767 \pm 0,08 \mu\text{M}</math>  Aslam et al. 2011</p>

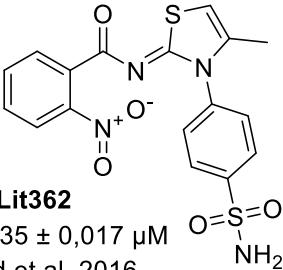
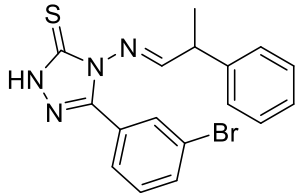
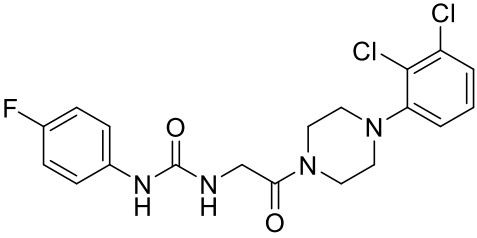
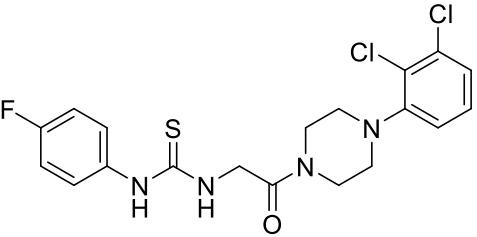
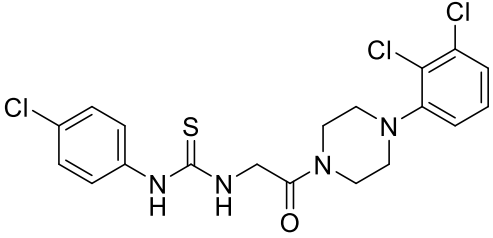
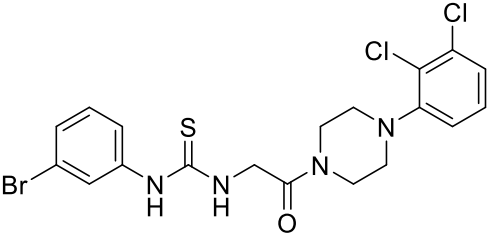
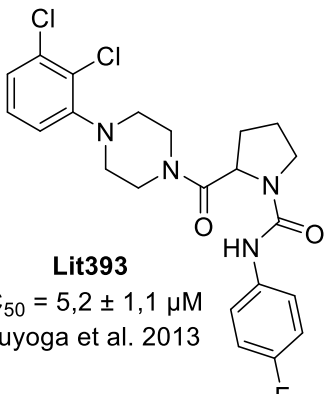
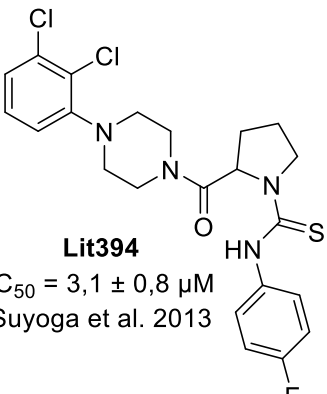
 <p><b>Lit225</b>  <math>IC_{50} = 0,707 \pm 0,09 \mu M</math>  Aslam et al. 2011</p>	 <p><b>Lit226</b>  <math>IC_{50} = 0,102 \pm 0,50 \mu M</math>  Aslam et al. 2011</p>
 <p><b>Lit227</b>  <math>IC_{50} = 0,547 \pm 0,06 \mu M</math>  Aslam et al. 2011</p>	 <p><b>Lit228</b>  <math>IC_{50} = 0,177 \pm 0,03 \mu M</math>  Aslam et al. 2011  (ASLAM et al., 2011)</p>
 <p><b>Lit229</b>  <math>IC_{50} = 0,887 \pm 0,01 \mu M</math>  Aslam et al. 2011</p>	 <p><b>Lit230</b>  <math>IC_{50} = 0,989 \pm 0,09 \mu M</math>  Aslam et al. 2011</p>
 <p><b>Lit231</b>  <math>IC_{50} = 0,127 \pm 0,01 \mu M</math>  Aslam et al. 2011</p>	 <p><b>Lit232</b>  <math>IC_{50} = 0,457 \pm 0,01 \mu M</math>  Aslam et al. 2011</p>
 <p><b>Lit233</b>  <math>IC_{50} = 0,263 \pm 0,006 \mu M</math>  Aslam et al. 2011</p>	 <p><b>Lit234</b>  <math>IC_{50} = 0,330 \pm 0,15 \mu M</math>  Aslam et al. 2011</p>
 <p><b>Lit235</b>  <math>IC_{50} = 0,682 \pm 0,04 \mu M</math>  Aslam et al. 2011</p>	 <p><b>Lit236</b>  <math>IC_{50} = 0,220 \pm 0,02 \mu M</math>  Aslam et al. 2011</p>

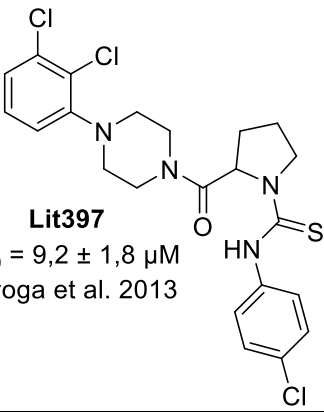
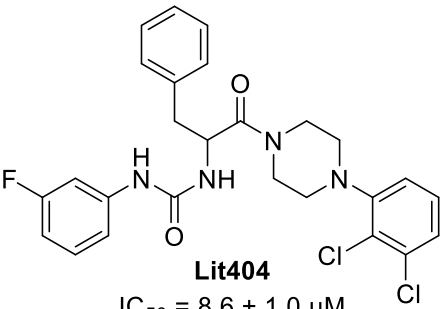
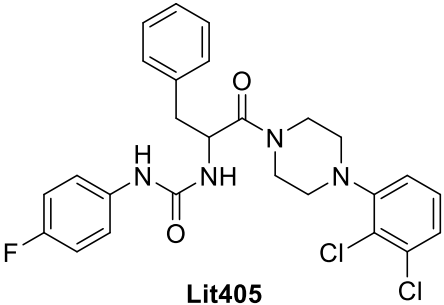
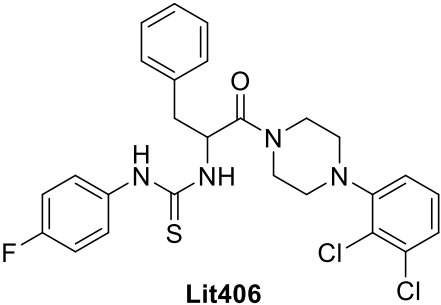
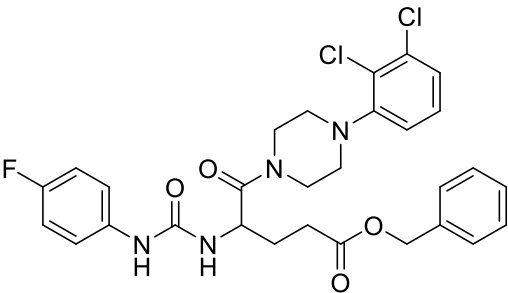
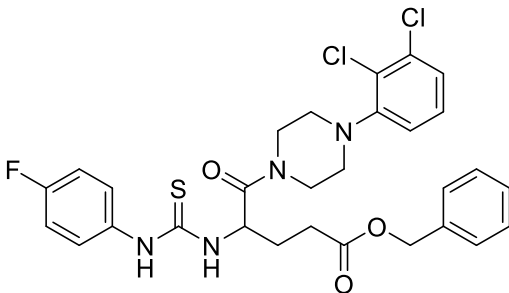
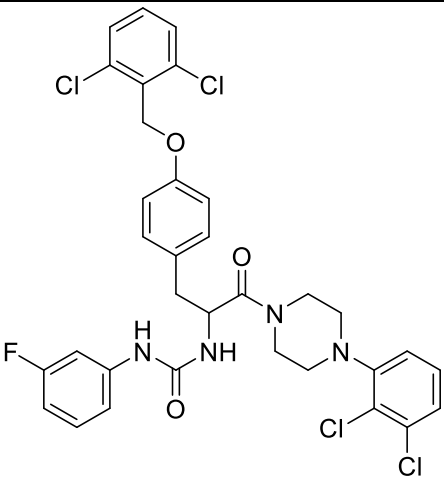
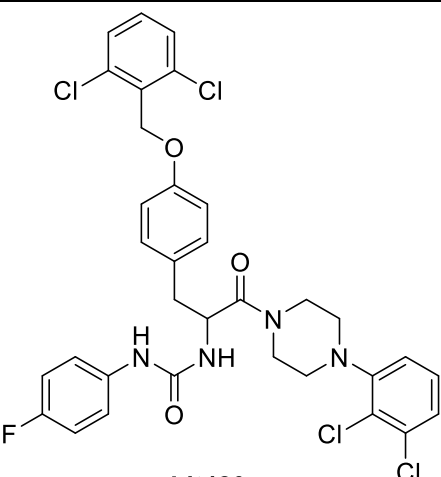
 <p><b>Lit237</b>  <math>IC_{50} = 0,233 \pm 0,06 \mu M</math>  Aslam et al. 2011</p>	 <p><b>Lit238</b>  <math>IC_{50} = 0,746 \pm 0,01 \mu M</math>  Aslam et al. 2011</p>
 <p><b>Lit248</b>  <math>IC_{50} = 6 \mu M</math>  Ahari-Mostafavi et al. 2014</p>	 <p><b>Lit270</b>  <math>IC_{50} = 9,82 \pm 0,08 \mu M</math>  Akhtar et al. 2014  <b>(AKHTAR et al., 2014)</b></p>
 <p><b>Lit274</b>  <math>IC_{50} = 6,21 \pm 0,04 \mu M</math>  Akhtar et al. 2014</p>	 <p><b>Lit285</b>  <math>IC_{50} = 7,65 \pm 0,06 \mu M</math>  Akhtar et al. 2014</p>
 <p><b>Lit286</b>  <math>IC_{50} = 7,42 \pm 0,03 \mu M</math>  Akhtar et al. 2014</p>	 <p><b>Lit287</b>  <math>IC_{50} = 8,02 \pm 0,07 \mu M</math>  Akhtar et al. 2014</p>
 <p><b>Lit288</b>  <math>IC_{50} = 6,03 \pm 0,02 \mu M</math>  Akhtar et al. 2014</p>	 <p><b>Lit289</b>  <math>IC_{50} = 5,79 \pm 0,3 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>
 <p><b>Lit290</b>  <math>IC_{50} = 3,27 \pm 0,3 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>	 <p><b>Lit294</b>  <math>IC_{50} = 5,61 \pm 0,3 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>

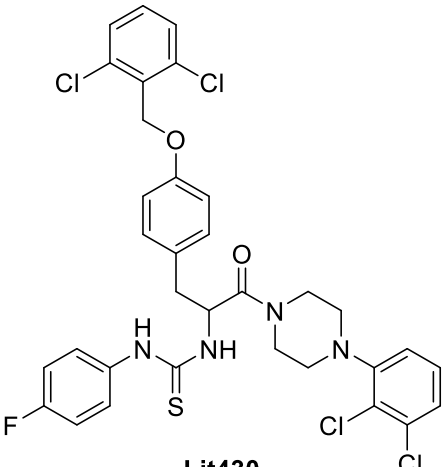
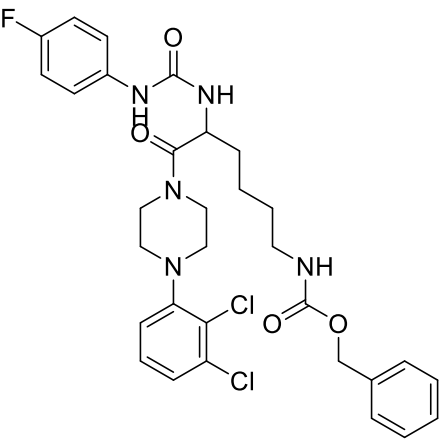
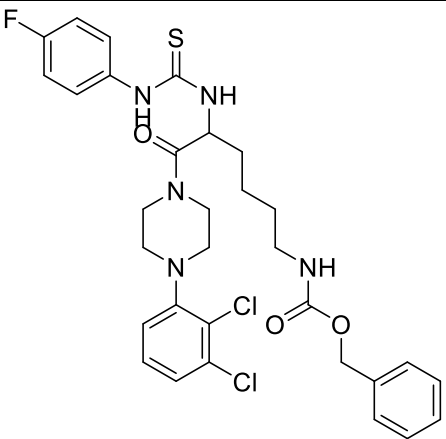
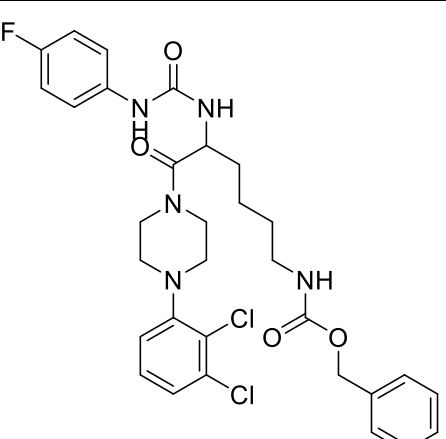
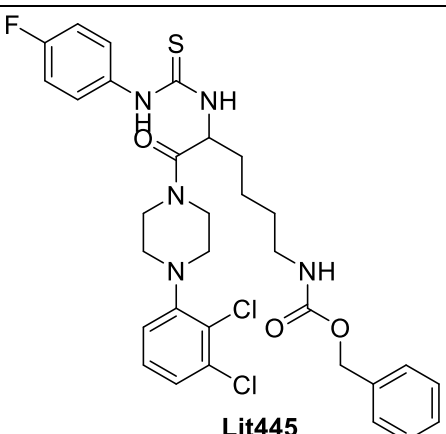
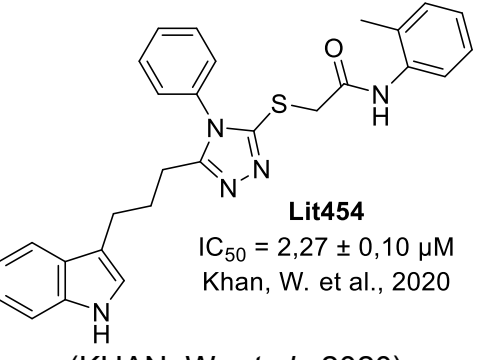
 <p><b>Lit296</b>  <math>IC_{50} = 6,22 \pm 0,4 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>	 <p><b>Lit297</b>  <math>IC_{50} = 1,15 \pm 0,2 \mu M</math>  Hanif et al. 2012  <b>(HANIF <i>et al.</i>, 2012)</b></p>
 <p><b>Lit299</b>  <math>IC_{50} = 5,83 \pm 0,08 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>	 <p><b>Lit300</b>  <math>IC_{50} = 5,60 \pm 0,6 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>
 <p><b>Lit305</b>  <math>IC_{50} = 1,13 \pm 2,11 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>	 <p><b>Lit306</b>  <math>IC_{50} = 0,592 \pm 0,24 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>
 <p><b>Lit307</b>  <math>IC_{50} = 2,01 \pm 1,78 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>	 <p><b>Lit308</b>  <math>IC_{50} = 0,177 \pm 0,07 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>
 <p><b>Lit309</b>  <math>IC_{50} = 1,15 \pm 0,87 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>	 <p><b>Lit310</b>  <math>IC_{50} = 0,321 \pm 0,01 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>
 <p><b>Lit311</b>  <math>IC_{50} = 0,387 \pm 0,04 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>	 <p><b>Lit313</b>  <math>IC_{50} = 0,564 \pm 0,08 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>

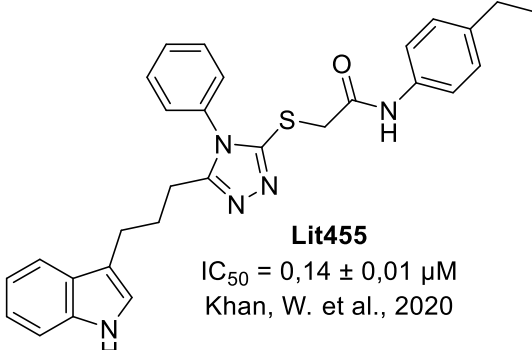
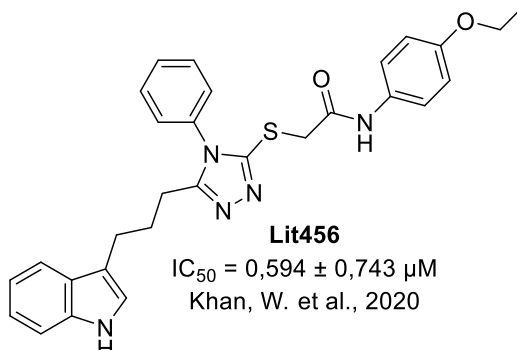
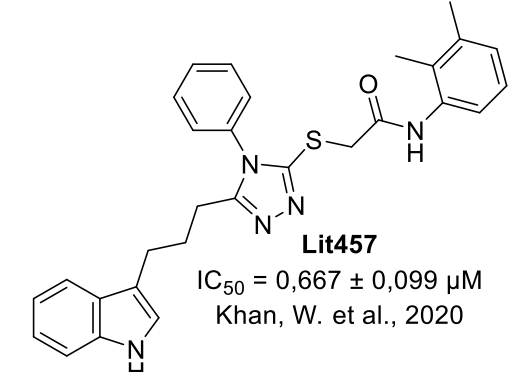
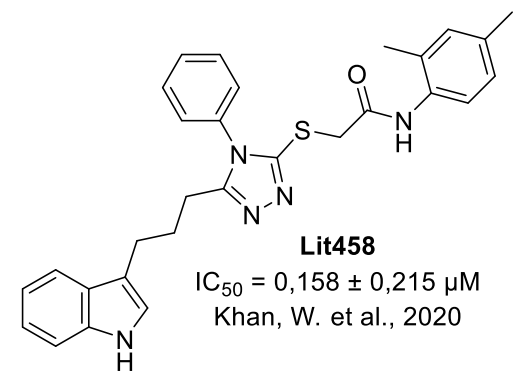
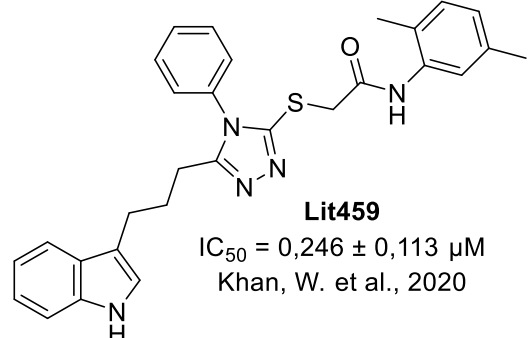
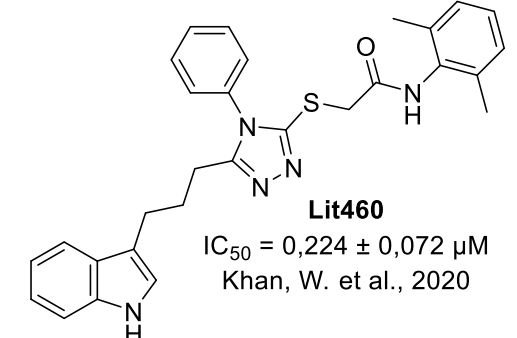
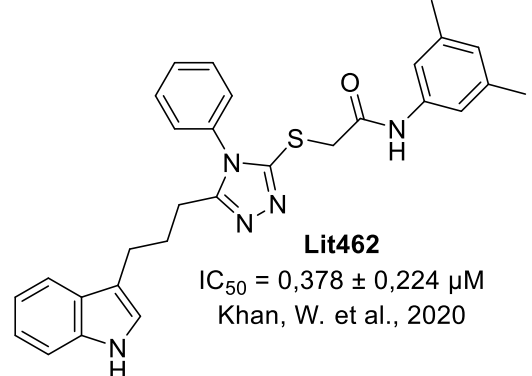
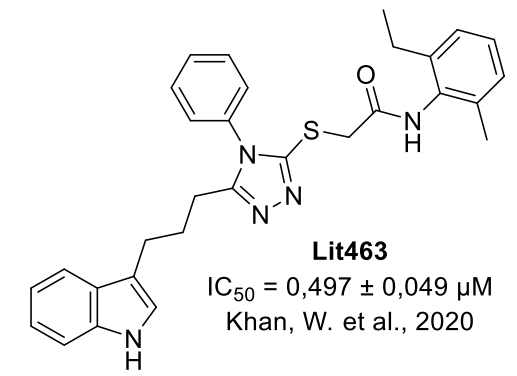
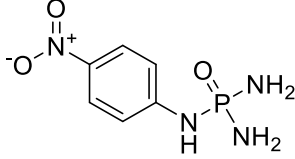
 <p><b>Lit315</b>  <math>IC_{50} = 0,181 \pm 0,06 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>	 <p><b>Lit316</b>  <math>IC_{50} = 2,61 \pm 0,12 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>
 <p><b>Lit317</b>  <math>IC_{50} = 0,102 \pm 0,076 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>	 <p><b>Lit319</b>  <math>IC_{50} = 0,314 \pm 0,017 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>
 <p><b>Lit320</b>  <math>IC_{50} = 0,283 \pm 0,021 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>	 <p><b>Lit321</b>  <math>IC_{50} = 3,47 \pm 1,24 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>
 <p><b>Lit322</b>  <math>IC_{50} = 0,694 \pm 0,21 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>	 <p><b>Lit323</b>  <math>IC_{50} = 0,17 \pm 0,011 \mu M</math>  Mentese et al. 2017</p>
 <p><b>Lit324</b>  <math>IC_{50} = 1,12 \pm 0,08 \mu M</math>  Mentese et al. 2017</p>	 <p><b>Lit325</b>  <math>IC_{50} = 1,92 \pm 0,33 \mu M</math>  Mentese et al. 2017</p>
 <p><b>Lit326</b>  <math>IC_{50} = 1,34 \pm 0,28 \mu M</math>  Mentese et al. 2017</p>	 <p><b>Lit328</b>  <math>IC_{50} = 0,28 \pm 0,006 \mu M</math>  Mentese et al. 2017</p>

 <p><b>Lit329</b>  <math>IC_{50} = 0,17 \pm 0,072 \mu M</math>  Mentese et al. 2017</p>	 <p><b>Lit330</b>  <math>IC_{50} = 0,38 \pm 0,083 \mu M</math>  Mentese et al. 2017</p>
 <p><b>Lit331</b>  <math>IC_{50} = 2,07 \pm 0,31 \mu M</math>  Mentese et al. 2017</p>	 <p><b>Lit332</b>  <math>IC_{50} = 0,29 \pm 0,03 \mu M</math>  Mentese et al. 2017</p>
 <p><b>Lit333</b>  <math>IC_{50} = 1,49 \pm 0,29 \mu M</math>  Mentese et al. 2017</p>	 <p><b>Lit335</b>  <math>IC_{50} = 0,22 \pm 0,089 \mu M</math>  Mentese et al. 2017</p>
 <p><b>Lit336</b>  <math>IC_{50} = 0,14 \pm 0,034 \mu M</math>  Mentese et al. 2017</p>	 <p><b>Lit337</b>  <math>IC_{50} = 0,15 \pm 0,019 \mu M</math>  Mentese et al. 2017</p>
 <p><b>Lit341</b>  <math>IC_{50} = 8,53 \pm 0,027 \mu M</math>  Rauf et al. 2015</p>	 <p><b>Lit343</b>  <math>IC_{50} = 8,93 \pm 0,027 \mu M</math>  Rauf et al. 2015  (RAUF <i>et al.</i>, 2015)</p>

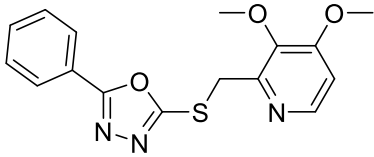
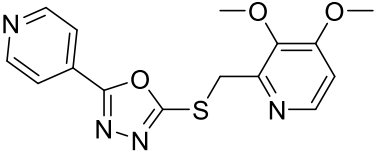
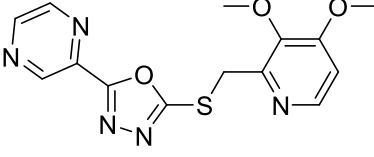
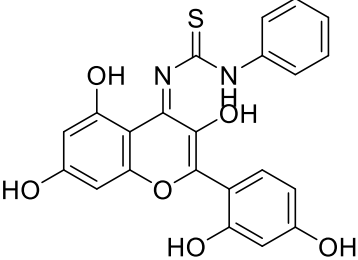
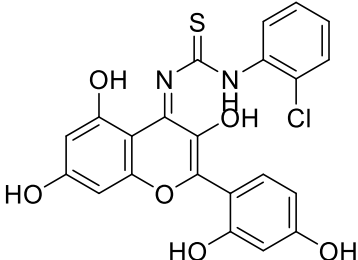
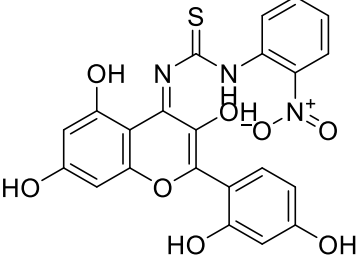
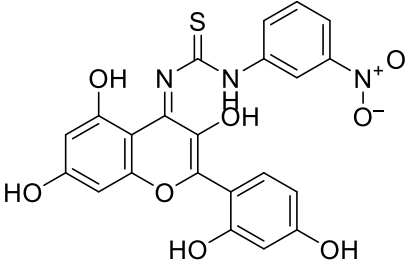
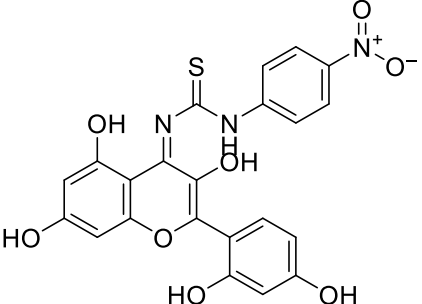
 <p><b>Lit362</b>  <math>IC_{50} = 0,35 \pm 0,017 \mu M</math>  Saeed et al. 2016</p>	 <p><b>Lit373</b>  <math>IC_{50} = 8,02 \pm 0,59 \mu M</math>  Rafiq et al. 2017</p>
 <p><b>Lit381</b>  <math>IC_{50} = 6,2 \pm 1,9 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit382</b>  <math>IC_{50} = 2,6 \pm 0,9 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013  (SUYOGA et al., 2013)</p>
 <p><b>Lit385</b>  <math>IC_{50} = 8,6 \pm 1,1 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit388</b>  <math>IC_{50} = 8,61 \pm 1,3 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>
 <p><b>Lit393</b>  <math>IC_{50} = 5,2 \pm 1,1 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit394</b>  <math>IC_{50} = 3,1 \pm 0,8 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>

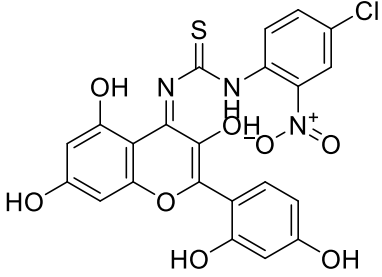
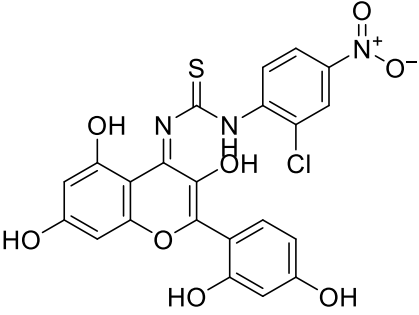
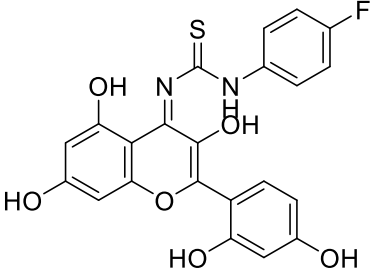
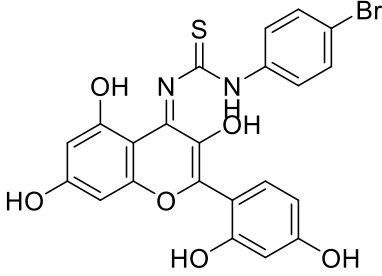
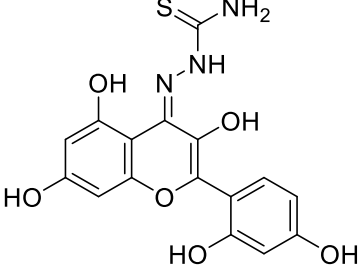
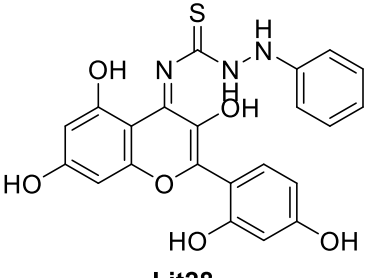
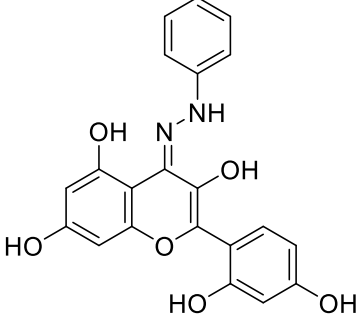
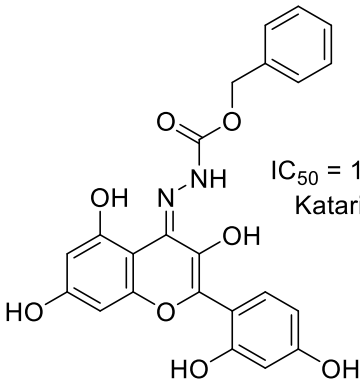
 <p><b>Lit397</b>  <math>IC_{50} = 9,2 \pm 1,8 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit404</b>  <math>IC_{50} = 8,6 \pm 1,0 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>
 <p><b>Lit405</b>  <math>IC_{50} = 6,1 \pm 0,9 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit406</b>  <math>IC_{50} = 4,2 \pm 0,7 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>
 <p><b>Lit417</b>  <math>IC_{50} = 6,4 \pm 1,2 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit418</b>  <math>IC_{50} = 4,2 \pm 0,9 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>
 <p><b>Lit428</b>  <math>IC_{50} = 9,5 \pm 1,5 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit429</b>  <math>IC_{50} = 5,0 \pm 0,8 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>

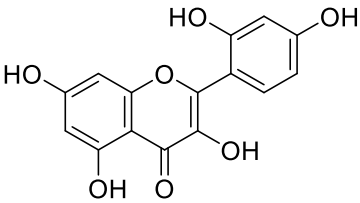
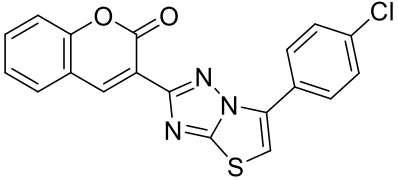
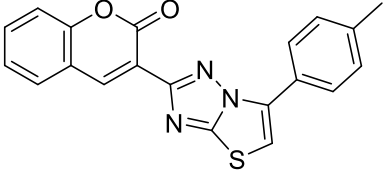
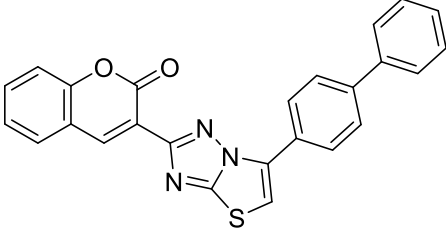
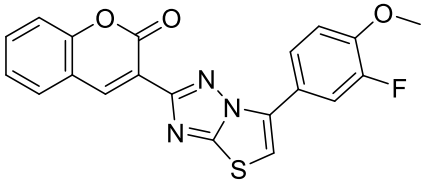
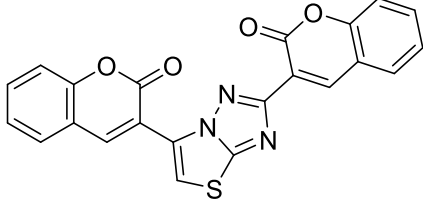
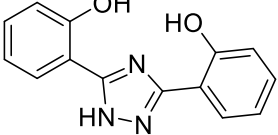
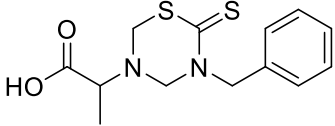
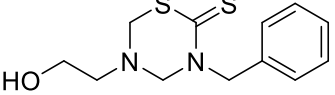
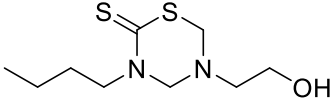
 <p><b>Lit430</b>  <math>IC_{50} = 2,9 \pm 0,6 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit441</b>  <math>IC_{50} = 5,6 \pm 0,8 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>
 <p><b>Lit442</b>  <math>IC_{50} = 3,2 \pm 0,9 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit444</b>  <math>IC_{50} = 5,6 \pm 0,8 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>
 <p><b>Lit445</b>  <math>IC_{50} = 3,2 \pm 0,9 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit454</b>  <math>IC_{50} = 2,27 \pm 0,10 \mu M</math>  Khan, W. et al., 2020  (KHAN, W. et al., 2020)</p>

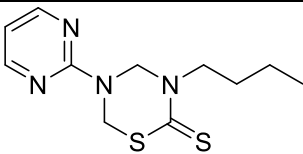
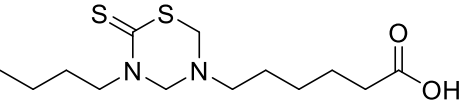
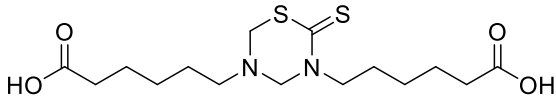
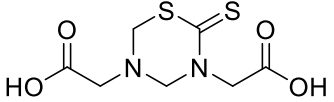
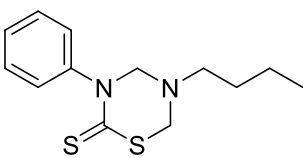
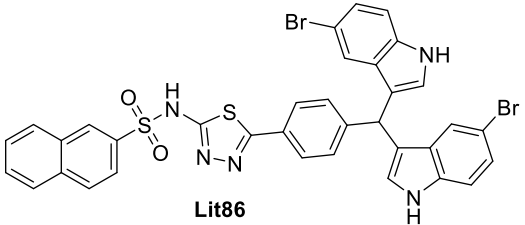
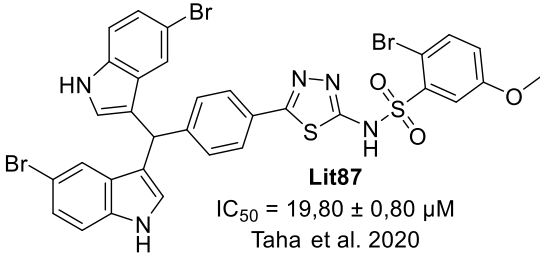
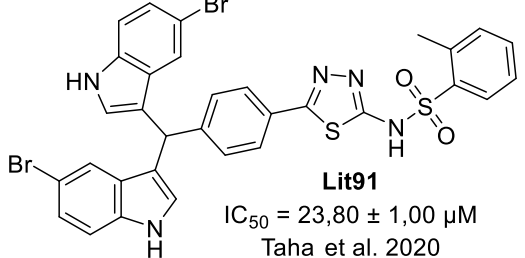
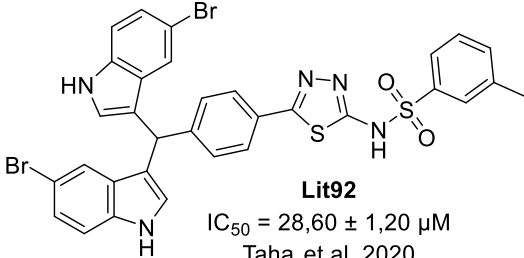
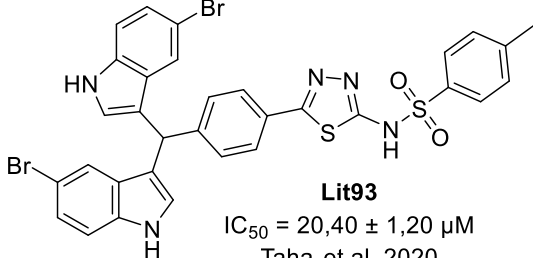
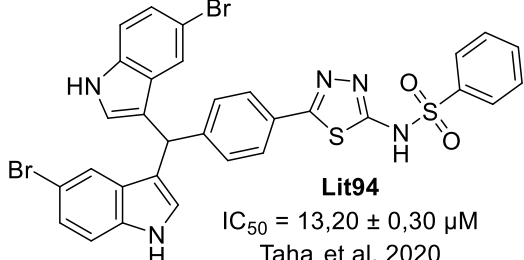
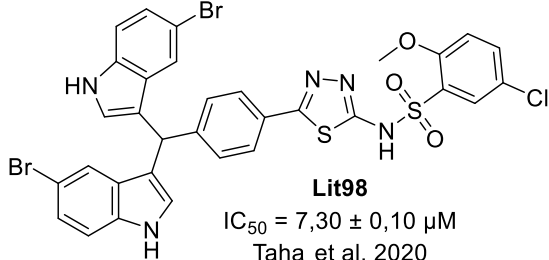
 <p><b>Lit455</b>  <math>IC_{50} = 0,14 \pm 0,01 \mu M</math>  Khan, W. et al., 2020</p>	 <p><b>Lit456</b>  <math>IC_{50} = 0,594 \pm 0,743 \mu M</math>  Khan, W. et al., 2020</p>
 <p><b>Lit457</b>  <math>IC_{50} = 0,667 \pm 0,099 \mu M</math>  Khan, W. et al., 2020</p>	 <p><b>Lit458</b>  <math>IC_{50} = 0,158 \pm 0,215 \mu M</math>  Khan, W. et al., 2020</p>
 <p><b>Lit459</b>  <math>IC_{50} = 0,246 \pm 0,113 \mu M</math>  Khan, W. et al., 2020</p>	 <p><b>Lit460</b>  <math>IC_{50} = 0,224 \pm 0,072 \mu M</math>  Khan, W. et al., 2020</p>
 <p><b>Lit462</b>  <math>IC_{50} = 0,378 \pm 0,224 \mu M</math>  Khan, W. et al., 2020</p>	 <p><b>Lit463</b>  <math>IC_{50} = 0,497 \pm 0,049 \mu M</math>  Khan, W. et al., 2020</p>
 <p><b>Lit481</b>  <math>IC_{50} = 0,300 \mu M</math>  Domínguez et al., 2008</p>	

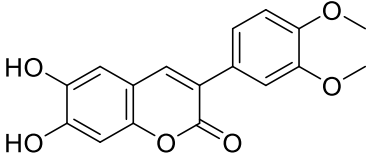
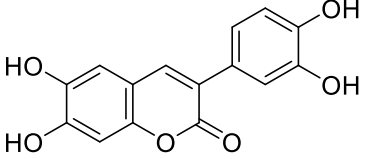
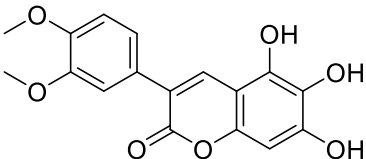
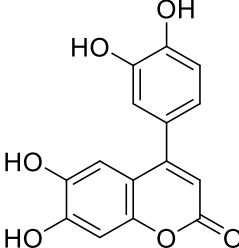
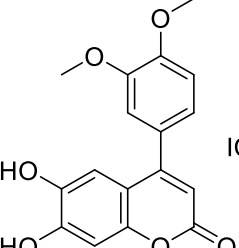
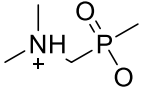
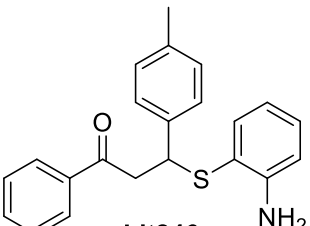
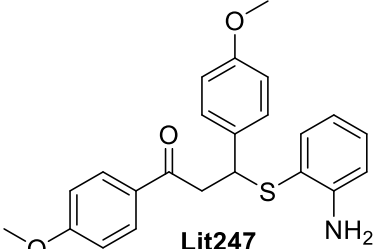
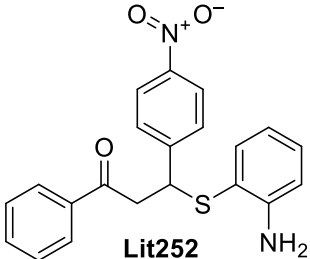
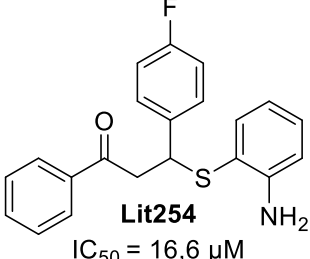
**Quadro D3** – Substâncias da literatura que compõem a faixa 3 de inibição da CEU ( $IC_{50} = 10 - 50 \mu M$ )

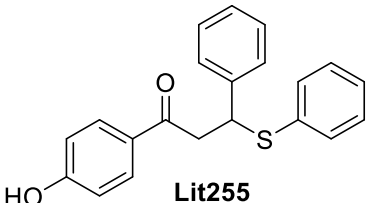
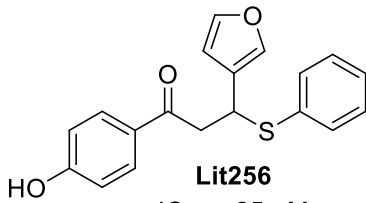
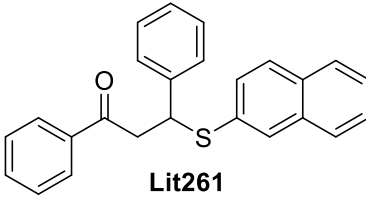
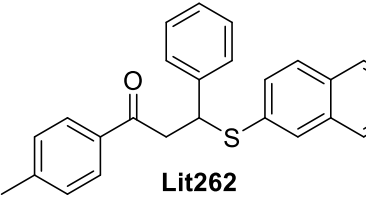
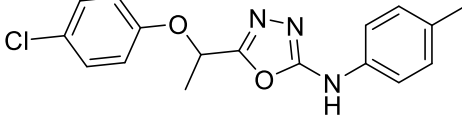
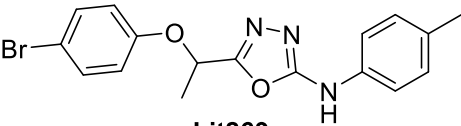
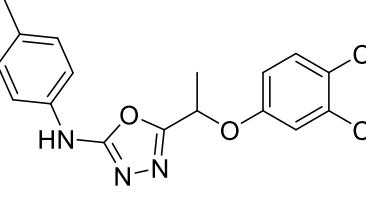
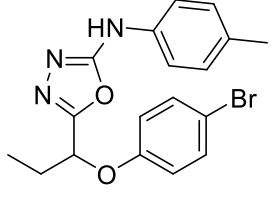
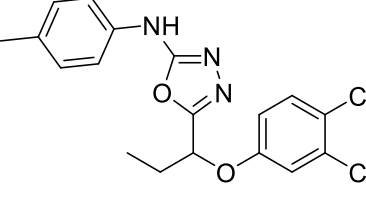
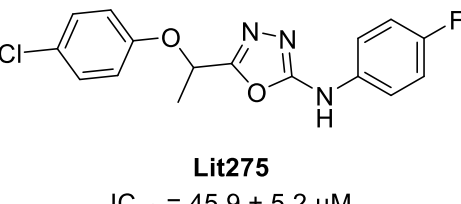
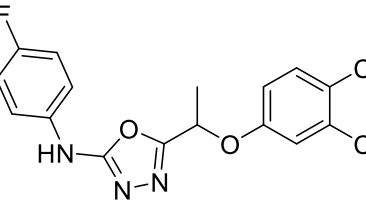
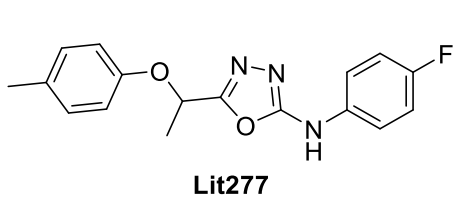
 <p><b>Lit03</b>  <math>IC_{50} = 37,14 \pm 3,02 \mu M</math>  Azizian et al., 2020</p>	 <p><b>Lit04</b>  <math>IC_{50} = 30,27 \pm 1,46 \mu M</math>  Azizian et al., 2020</p>
 <p><b>Lit05</b>  <math>IC_{50} = 25,85 \pm 1,21 \mu M</math>  Azizian et al., 2020  (AZIZIAN <i>et al.</i>, 2020)</p>	 <p><b>Lit18</b>  <math>IC_{50} = 12,71 \pm 0,03 \mu M</math>  Kataria et al., 2019</p>
 <p><b>Lit19</b>  <math>IC_{50} = 10,74 \pm 0,02 \mu M</math>  Kataria et al., 2019</p>	 <p><b>Lit20</b>  <math>IC_{50} = 19,5 \pm 0,005 \mu M</math>  Kataria et al., 2019</p>
 <p><b>Lit21</b>  <math>IC_{50} = 20,41 \pm 0,03 \mu M</math>  Kataria et al., 2019</p>	 <p><b>Lit22</b>  <math>IC_{50} = 20,20 \pm 0,01 \mu M</math>  Kataria et al., 2019</p>

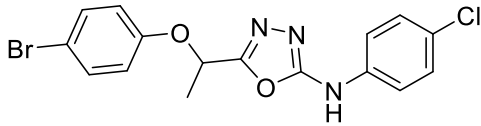
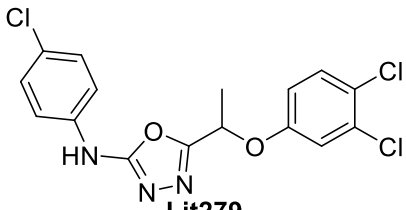
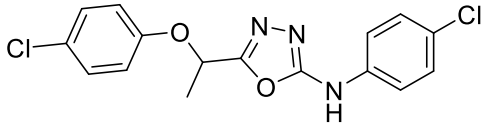
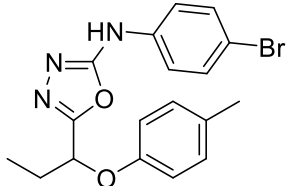
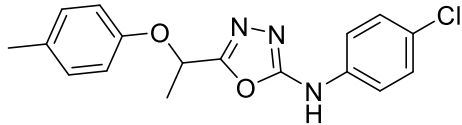
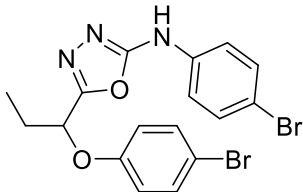
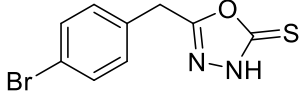
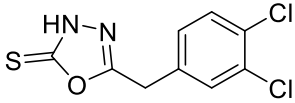
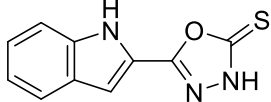
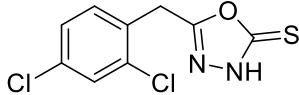
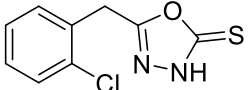
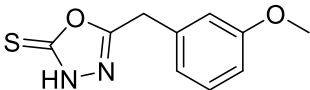
 <p><b>Lit23</b>  <math>IC_{50} = 19,06 \pm 0,02 \mu M</math>  Kataria et al., 2019</p>	 <p><b>Lit24</b>  <math>IC_{50} = 20,48 \pm 0,03 \mu M</math>  Kataria et al., 2019</p>
 <p><b>Lit25</b>  <math>IC_{50} = 16,55 \pm 0,01 \mu M</math>  Kataria et al., 2019</p>	 <p><b>Lit26</b>  <math>IC_{50} = 11,12 \pm 0,03 \mu M</math>  Kataria et al., 2019</p>
 <p><b>Lit27</b>  <math>IC_{50} = 17,90 \pm 0,007 \mu M</math>  Kataria et al., 2019</p>	 <p><b>Lit28</b>  <math>IC_{50} = 18,96 \pm 0,01 \mu M</math>  Kataria et al., 2019</p>
 <p><b>Lit29</b>  <math>IC_{50} = 17,68 \pm 0,08 \mu M</math>  Kataria et al., 2019</p>	 <p><b>Lit30</b>  <math>IC_{50} = 17,66 \pm 0,02 \mu M</math>  Kataria et al., 2019</p>

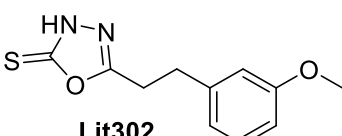
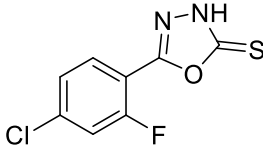
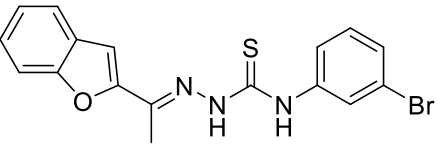
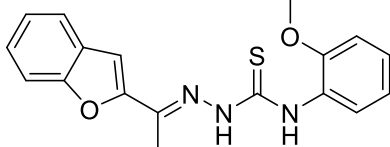
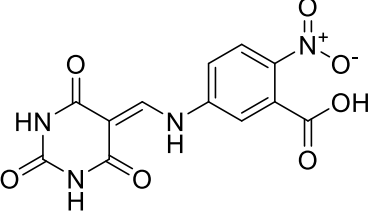
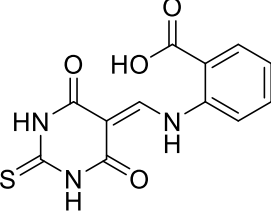
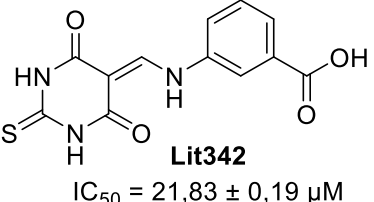
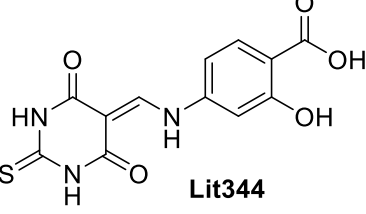
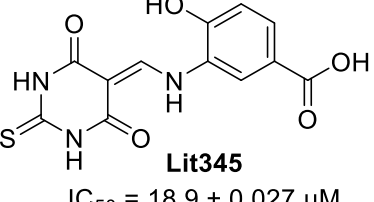
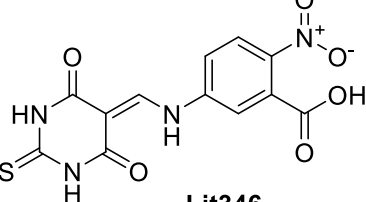
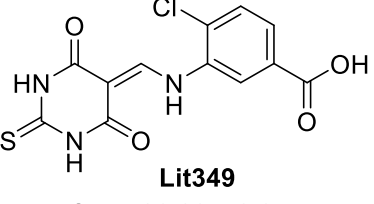
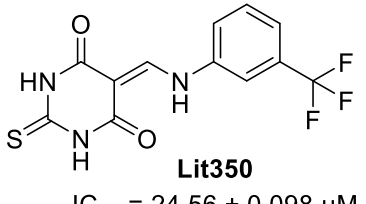
 <p><b>Lit31</b>  <math>IC_{50} = 21,77 \pm 0,02 \mu M</math>  Kataria et al., 2019  <b>(KATARIA; KHATKAR, 2019)</b></p>	 <p><b>Lit36</b>  <math>IC_{50} = 16,91 \pm 0,76 \mu M</math>  Khan et al., 2020  <b>(KHAN, I. et al., 2020)</b></p>
 <p><b>Lit37</b>  <math>IC_{50} = 16,45 \pm 0,064 \mu M</math>  Khan et al., 2020</p>	 <p><b>Lit41</b>  <math>IC_{50} = 10,26 \pm 0,23 \mu M</math>  Khan et al., 2020</p>
 <p><b>Lit44</b>  <math>IC_{50} = 12,26 \pm 0,22 \mu M</math>  Khan et al., 2020</p>	 <p><b>Lit47</b>  <math>IC_{50} = 14,20 \pm 0,61 \mu M</math>  Khan et al., 2020</p>
 <p><b>Lit63</b>  <math>IC_{50} = 48,35 \pm 0,23 \mu M</math>  Ashani et al. 2020</p>	 <p><b>Lit68</b>  <math>IC_{50} = 11,0 \pm 0,6 \mu M</math>  Shah et al 2019</p>
 <p><b>Lit69</b>  <math>IC_{50} = 16,0 \pm 1,5 \mu M</math>  Shah et al 2019</p>	 <p><b>Lit73</b>  <math>IC_{50} = 19,7 \pm 0,4 \mu M</math>  Shah et al 2019</p>

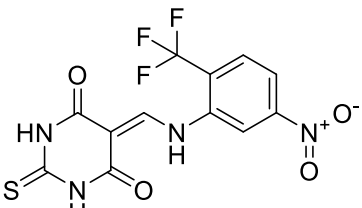
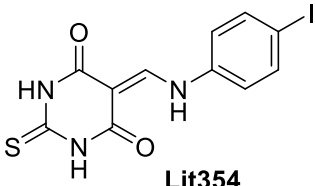
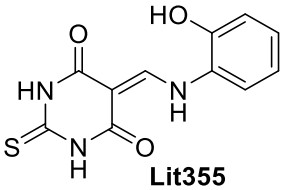
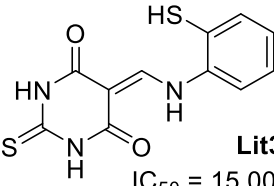
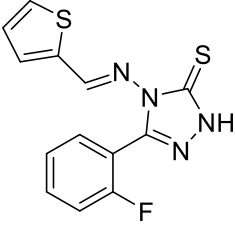
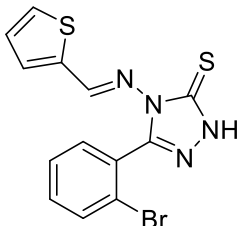
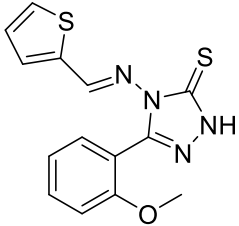
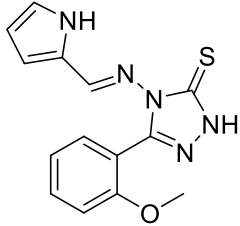
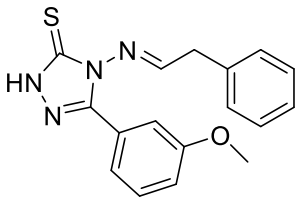
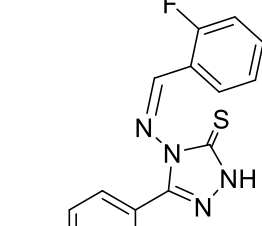
 <p><b>Lit74</b>  <math>IC_{50} = 22,9 \pm 0,3 \mu M</math>            Shah et al 2019</p>	 <p><b>Lit75</b>  <math>IC_{50} = 15,8 \pm 0,2 \mu M</math>            Shah et al 2019</p>
 <p><b>Lit76</b>  <math>IC_{50} = 35,08 \pm 0,2 \mu M</math>            Shah et al 2019</p>	 <p><b>Lit77</b>  <math>IC_{50} = 28,08 \pm 0,2 \mu M</math>            Shah et al 2019</p>
 <p><b>Lit78</b>  <math>IC_{50} = 46,30 \pm 0,35 \mu M</math>            Shah et al 2019</p>	 <p><b>Lit86</b>  <math>IC_{50} = 33,20 \pm 1,20 \mu M</math>            Taha et al. 2020</p>
 <p><b>Lit87</b>  <math>IC_{50} = 19,80 \pm 0,80 \mu M</math>            Taha et al. 2020</p>	 <p><b>Lit91</b>  <math>IC_{50} = 23,80 \pm 1,00 \mu M</math>            Taha et al. 2020</p>
 <p><b>Lit92</b>  <math>IC_{50} = 28,60 \pm 1,20 \mu M</math>            Taha et al. 2020</p>	 <p><b>Lit93</b>  <math>IC_{50} = 20,40 \pm 1,20 \mu M</math>            Taha et al. 2020</p>
 <p><b>Lit94</b>  <math>IC_{50} = 13,20 \pm 0,30 \mu M</math>            Taha et al. 2020</p>	 <p><b>Lit98</b>  <math>IC_{50} = 7,30 \pm 0,10 \mu M</math>            Taha et al. 2020</p>

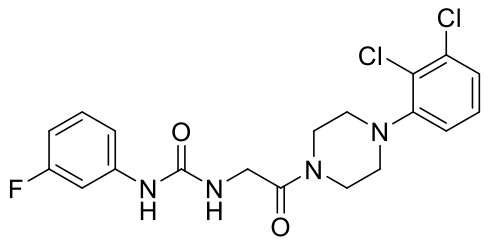
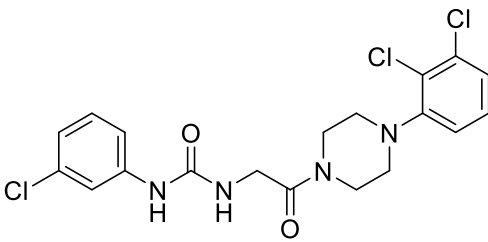
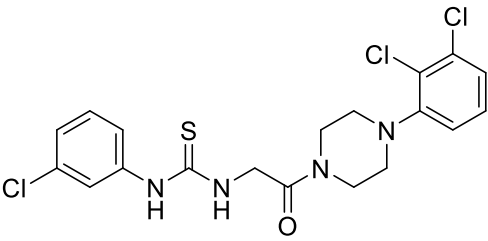
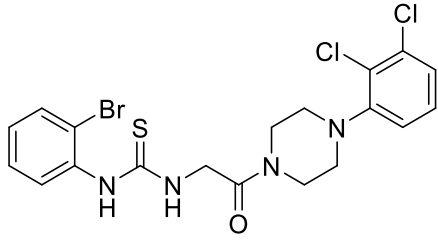
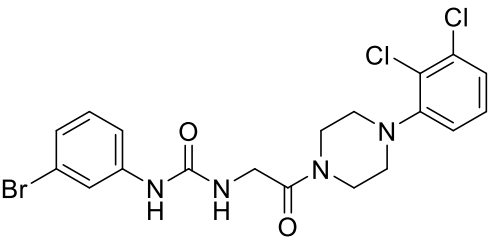
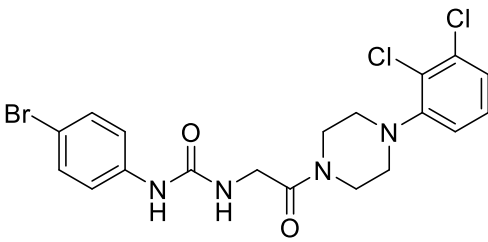
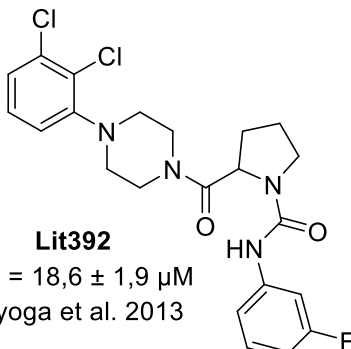
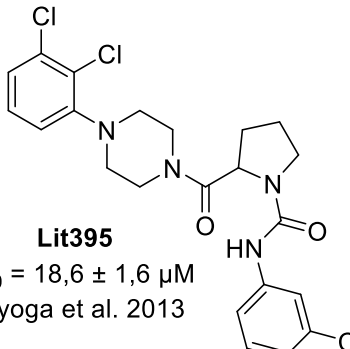
 <p><b>Lit137</b>  <math>IC_{50} = 39,00 \pm 0,01 \mu M</math>  Aygul et al. 2018</p>	 <p><b>Lit138</b>  <math>IC_{50} = 24,60 \pm 0,01 \mu M</math>  Aygul et al. 2018</p>
 <p><b>Lit139</b>  <math>IC_{50} = 22,30 \pm 0,01 \mu M</math>  Aygul et al. 2018  <b>(AYGUL et al., 2018)</b></p>	 <p><b>Lit140</b>  <math>IC_{50} = 28,90 \pm 0,01 \mu M</math>  Aygul et al. 2018</p>
 <p><b>Lit141</b>  <math>IC_{50} = 30,40 \pm 0,05 \mu M</math>  Aygul et al. 2018</p>	 <p><b>Lit243</b>  <math>IC_{50} = 14,4 \pm 4,8 \mu M</math>  Berlicki et al. 2012  <b>(BERLICKI et al., 2012)</b></p>
 <p><b>Lit246</b>  <math>IC_{50} = 28 \mu M</math>  Ahari-Mostafavi et al. 2014</p>	 <p><b>Lit247</b>  <math>IC_{50} = 12 \mu M</math>  Ahari-Mostafavi et al. 2014</p>
 <p><b>Lit252</b>  <math>IC_{50} = 18 \mu M</math>  Ahari-Mostafavi et al. 2014</p>	 <p><b>Lit254</b>  <math>IC_{50} = 16,6 \mu M</math>  Ahari-Mostafavi et al. 2014  <b>(AHARI-MOSTAFAVI et al., 2014)</b></p>

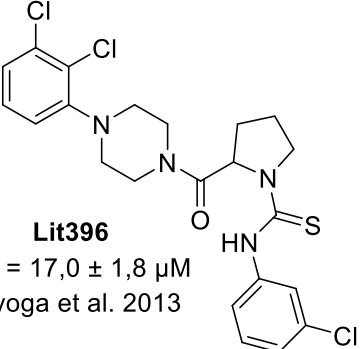
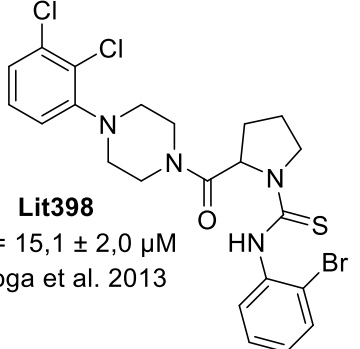
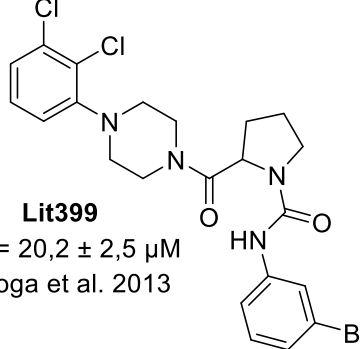
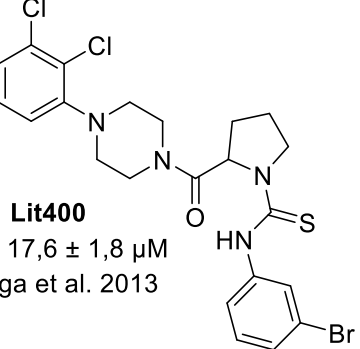
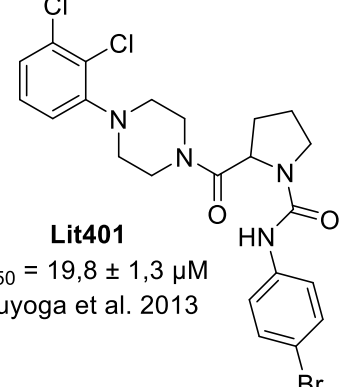
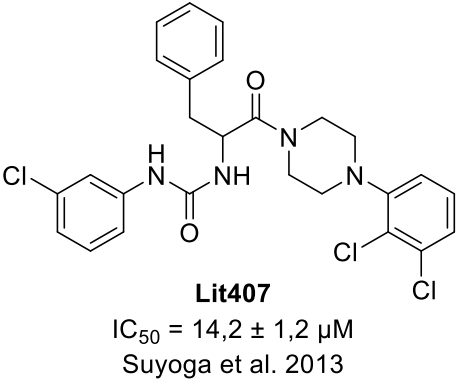
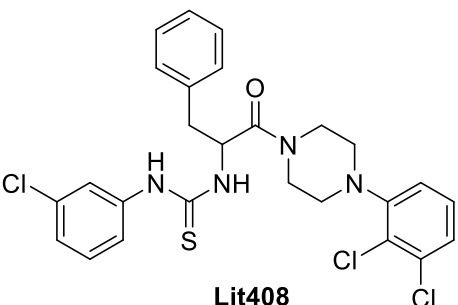
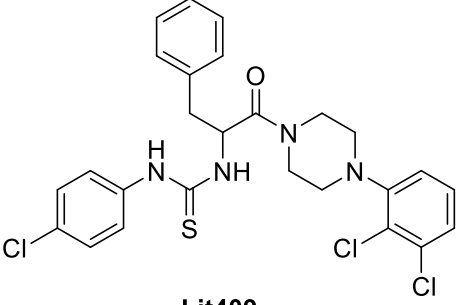
 <p><b>Lit255</b>  <math>IC_{50} = 35 \mu M</math>  Ahari-Mostafavi et al. 2014</p>	 <p><b>Lit256</b>  <math>IC_{50} = 25 \mu M</math>  Ahari-Mostafavi et al. 2014</p>
 <p><b>Lit261</b>  <math>IC_{50} = 16,3 \mu M</math>  Ahari-Mostafavi et al. 2014</p>	 <p><b>Lit262</b>  <math>IC_{50} = 14 \mu M</math>  Ahari-Mostafavi et al. 2014</p>
 <p><b>Lit268</b>  <math>IC_{50} = 26,2 \pm 2,2 \mu M</math>  Akhtar et al. 2014</p>	 <p><b>Lit269</b>  <math>IC_{50} = 33,5 \pm 1,4 \mu M</math>  Akhtar et al. 2014</p>
 <p><b>Lit271</b>  <math>IC_{50} = 41,0 \pm 1,3 \mu M</math>  Akhtar et al. 2014</p>	 <p><b>Lit272</b>  <math>IC_{50} = 47,4 \pm 3,4 \mu M</math>  Akhtar et al. 2014</p>
 <p><b>Lit273</b>  <math>IC_{50} = 47,4 \pm 2,2 \mu M</math>  Akhtar et al. 2014</p>	 <p><b>Lit275</b>  <math>IC_{50} = 45,9 \pm 5,2 \mu M</math>  Akhtar et al. 2014  (AKHATAR <i>et al.</i>, 2014)</p>
 <p><b>Lit276</b>  <math>IC_{50} = 45,3 \pm 8,1 \mu M</math>  Akhtar et al. 2014</p>	 <p><b>Lit277</b>  <math>IC_{50} = 12,4 \pm 0,06 \mu M</math>  Akhtar et al. 2014</p>

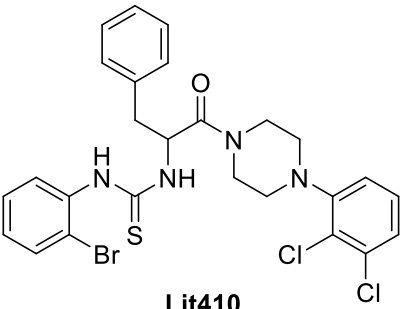
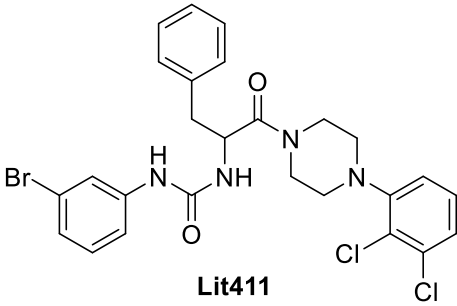
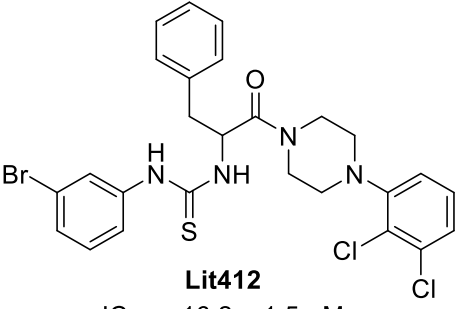
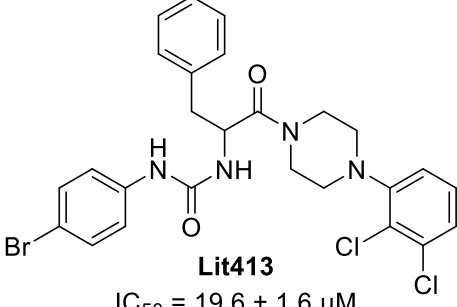
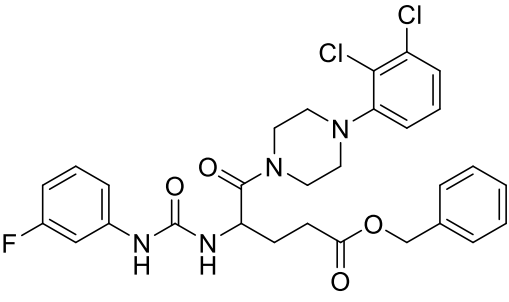
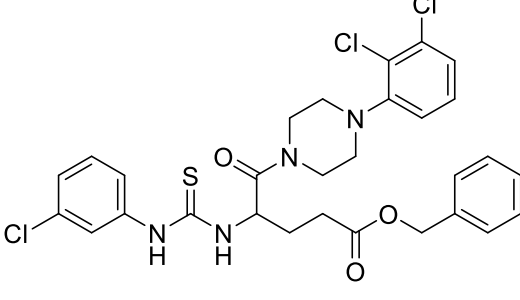
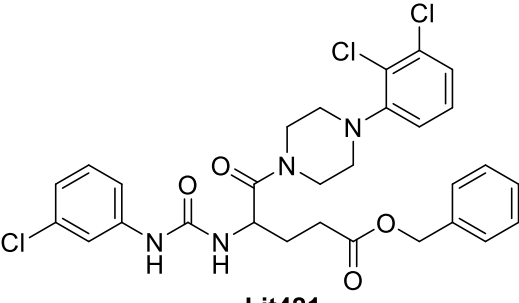
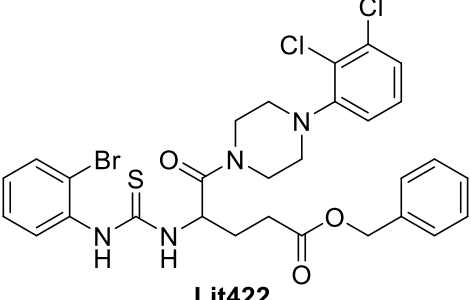
 <p><b>Lit278</b>  <math>IC_{50} = 11,6 \pm 0,05 \mu M</math>  Akhtar et al. 2014</p>	 <p><b>Lit279</b>  <math>IC_{50} = 42,8 \pm 6,7 \mu M</math>  Akhtar et al. 2014</p>
 <p><b>Lit280</b>  <math>IC_{50} = 33,2 \pm 2,7 \mu M</math>  Akhtar et al. 2014</p>	 <p><b>Lit281</b>  <math>IC_{50} = 35,8 \pm 1,2 \mu M</math>  Akhtar et al. 2014</p>
 <p><b>Lit282</b>  <math>IC_{50} = 11,5 \pm 0,07 \mu M</math>  Akhtar et al. 2014</p>	 <p><b>Lit284</b>  <math>IC_{50} = 45,5 \pm 4,2 \mu M</math>  Akhtar et al. 2014</p>
 <p><b>Lit291</b>  <math>IC_{50} = 11,8 \pm 0,4 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>	 <p><b>Lit292</b>  <math>IC_{50} = 11,3 \pm 0,6 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>
 <p><b>Lit293</b>  <math>IC_{50} = 21,3 \pm 0,7 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>	 <p><b>Lit295</b>  <math>IC_{50} = 42,4 \pm 1,2 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>
 <p><b>Lit298</b>  <math>IC_{50} = 12,9 \pm 0,6 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>	 <p><b>Lit301</b>  <math>IC_{50} = 12,2 \pm 0,05 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>

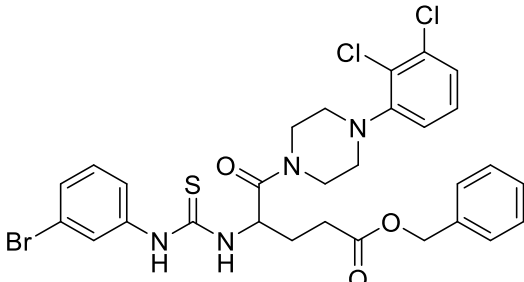
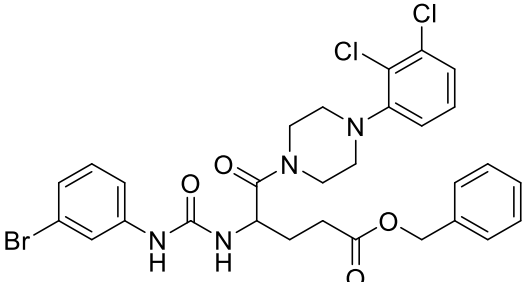
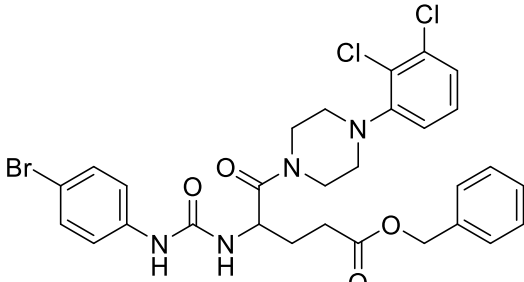
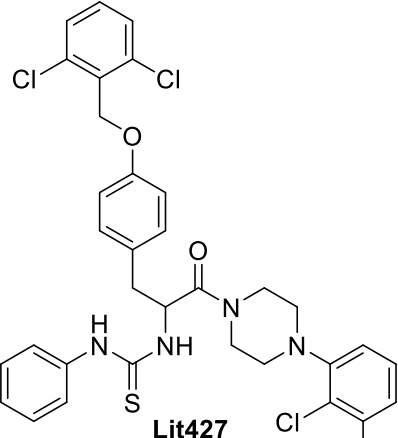
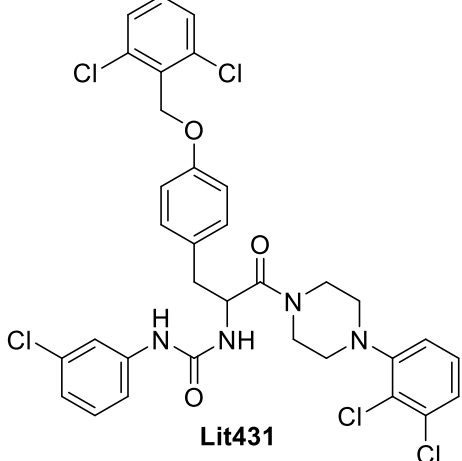
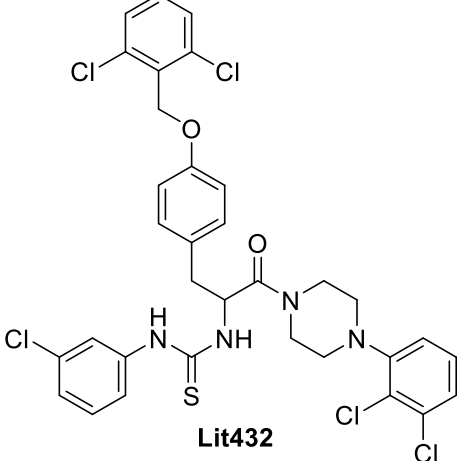
 <p><b>Lit302</b>  <math>IC_{50} = 15,1 \pm 0,8 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>	 <p><b>Lit303</b>  <math>IC_{50} = 39,0 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>
 <p><b>Lit312</b>  <math>IC_{50} = 10,9 \pm 2,26 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>	 <p><b>Lit318</b>  <math>IC_{50} = 24,04 \pm 0,14 \mu M</math>  Hanif et al. 2012</p>
 <p><b>Lit339</b>  <math>IC_{50} = 25,8 \pm 0,47 \mu M</math>  Rauf et al. 2015</p>	 <p><b>Lit340</b>  <math>IC_{50} = 12,96 \pm 0,13 \mu M</math>  Rauf et al. 2015</p>
 <p><b>Lit342</b>  <math>IC_{50} = 21,83 \pm 0,19 \mu M</math>  Rauf et al. 2015</p>	 <p><b>Lit344</b>  <math>IC_{50} = 32,3 \pm 0,16 \mu M</math>  Rauf et al. 2015</p>
 <p><b>Lit345</b>  <math>IC_{50} = 18,9 \pm 0,027 \mu M</math>  Rauf et al. 2015  (RAUF <i>et al.</i>, 2015)</p>	 <p><b>Lit346</b>  <math>IC_{50} = 39,76 \pm 0,072 \mu M</math>  Rauf et al. 2015</p>
 <p><b>Lit349</b>  <math>IC_{50} = 26,66 \pm 0,95 \mu M</math>  Rauf et al. 2015</p>	 <p><b>Lit350</b>  <math>IC_{50} = 24,56 \pm 0,098 \mu M</math>  Rauf et al. 2015</p>

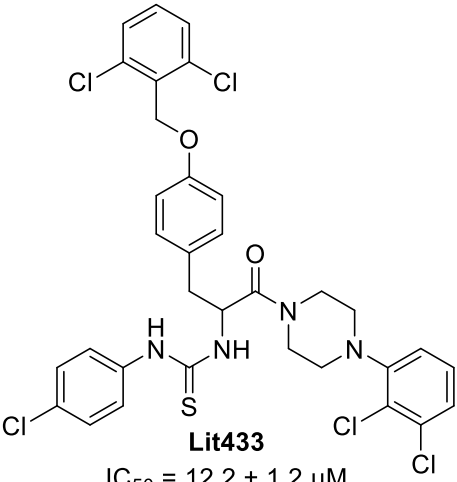
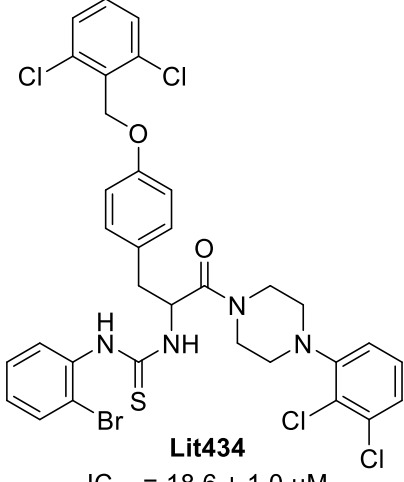
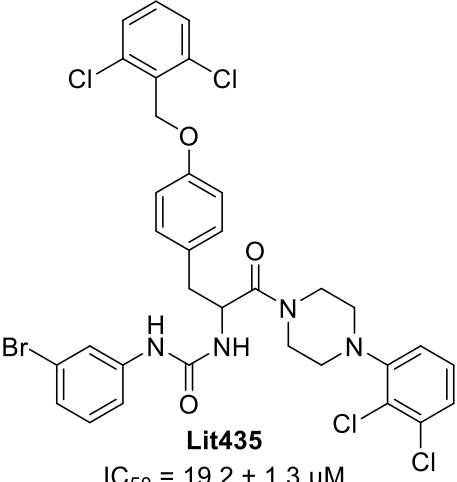
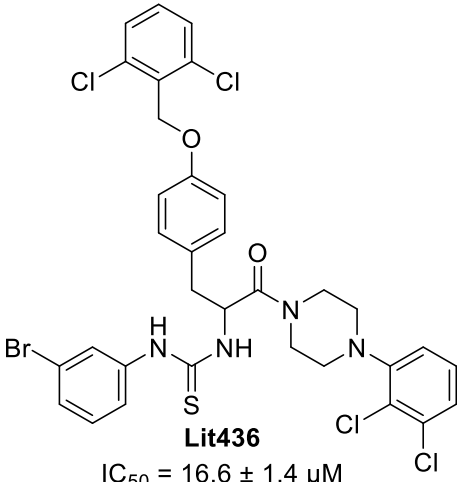
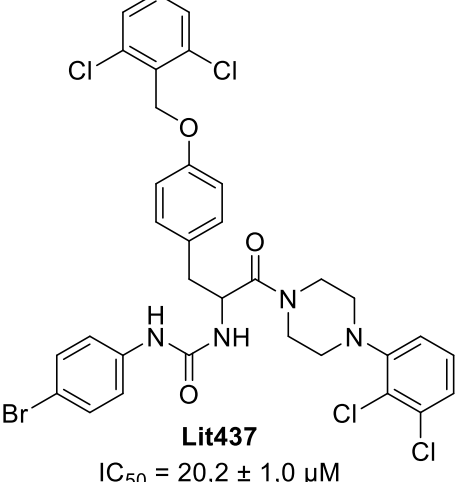
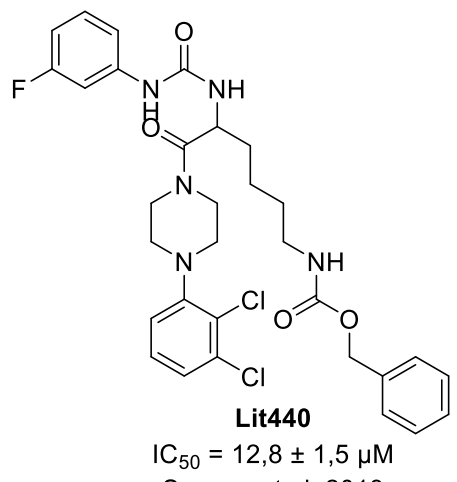
 <p><b>Lit352</b>  <math>IC_{50} = 28,7 \pm 0,32 \mu\text{M}</math>  Rauf et al. 2015</p>	 <p><b>Lit354</b>  <math>IC_{50} = 41,33 \pm 0,29 \mu\text{M}</math>  Rauf et al. 2015</p>
 <p><b>Lit355</b>  <math>IC_{50} = 19,7 \pm 0,63 \mu\text{M}</math>  Rauf et al. 2015</p>	 <p><b>Lit356</b>  <math>IC_{50} = 15,00 \pm 0,098 \mu\text{M}</math>  Rauf et al. 2015</p>
 <p><b>Lit367</b>  <math>IC_{50} = 42,59 \pm 4,35 \mu\text{M}</math>  Rafiq et al. 2017</p>	 <p><b>Lit368</b>  <math>IC_{50} = 17,02 \pm 4,63 \mu\text{M}</math>  Rafiq et al. 2017</p>
 <p><b>Lit369</b>  <math>IC_{50} = 39,30 \pm 5,03 \mu\text{M}</math>  Rafiq et al. 2017</p>	 <p><b>Lit371</b>  <math>IC_{50} = 35,71 \pm 6,28 \mu\text{M}</math>  Rafiq et al. 2017</p>
 <p><b>Lit374</b>  <math>IC_{50} = 20,29 \pm 2,76 \mu\text{M}</math>  Rafiq et al. 2017  (RAFIQ <i>et al.</i>, 2017)</p>	 <p><b>Lit376</b>  <math>IC_{50} = 25,45 \pm 3,09 \mu\text{M}</math>  Rafiq et al. 2017</p>

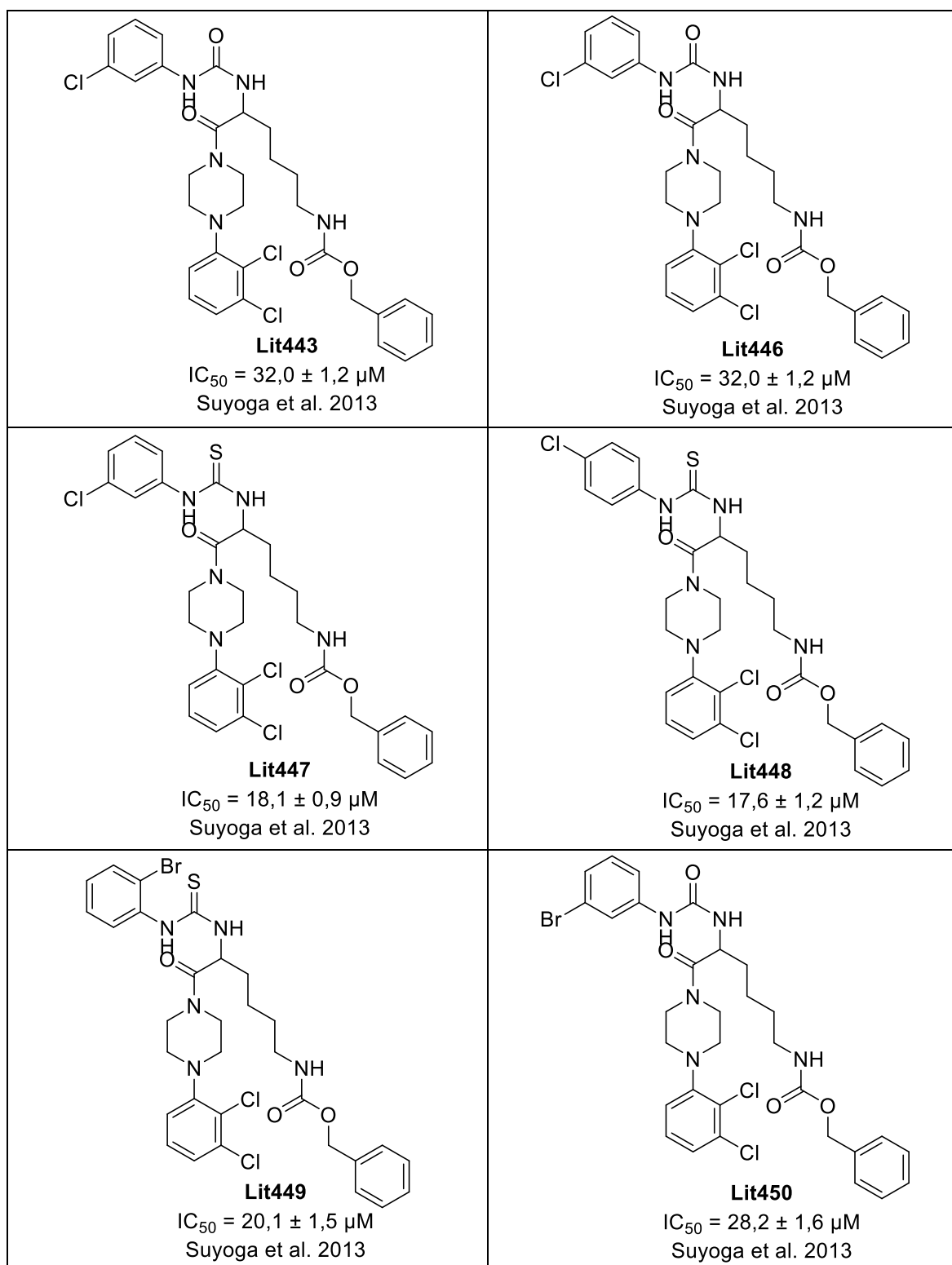
 <p><b>Lit380</b> <math>IC_{50} = 15,4 \pm 1,5 \mu M</math> Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit383</b> <math>IC_{50} = 16,2 \pm 1,4 \mu M</math> Suyoga et al. 2013</p>
 <p><b>Lit384</b> <math>IC_{50} = 12,6 \pm 2,0 \mu M</math> Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit386</b> <math>IC_{50} = 16,7 \pm 2,3 \mu M</math> Suyoga et al. 2013</p>
 <p><b>Lit387</b> <math>IC_{50} = 19,2 \pm 1,8 \mu M</math> Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit389</b> <math>IC_{50} = 20,9 \pm 2,0 \mu M</math> Suyoga et al. 2013</p>
 <p><b>Lit392</b> <math>IC_{50} = 18,6 \pm 1,9 \mu M</math> Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit395</b> <math>IC_{50} = 18,6 \pm 1,6 \mu M</math> Suyoga et al. 2013</p>

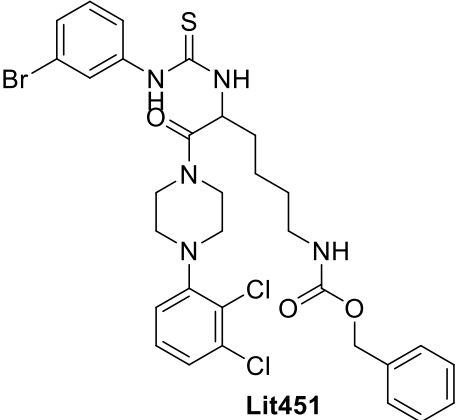
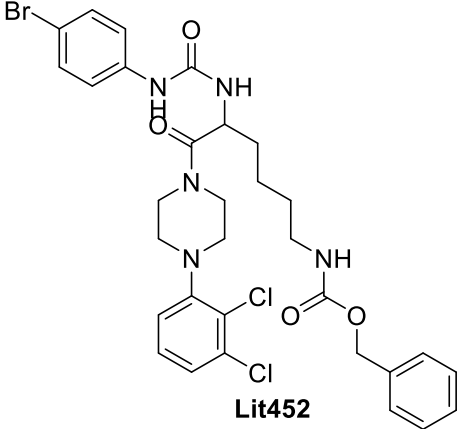
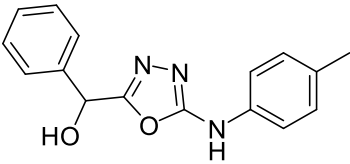
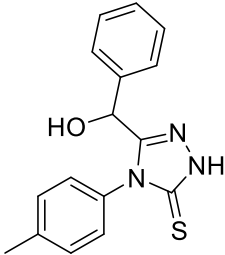
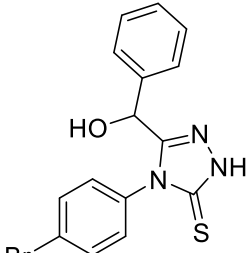
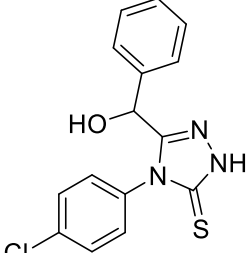
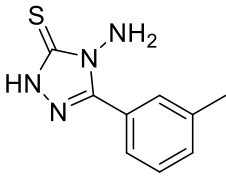
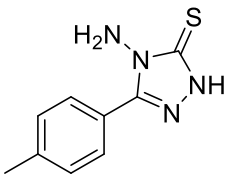
 <p><b>Lit396</b>  <math>IC_{50} = 17,0 \pm 1,8 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit398</b>  <math>IC_{50} = 15,1 \pm 2,0 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>
 <p><b>Lit399</b>  <math>IC_{50} = 20,2 \pm 2,5 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit400</b>  <math>IC_{50} = 17,6 \pm 1,8 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>
 <p><b>Lit401</b>  <math>IC_{50} = 19,8 \pm 1,3 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit407</b>  <math>IC_{50} = 14,2 \pm 1,2 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>
 <p><b>Lit408</b>  <math>IC_{50} = 13,1 \pm 1,5 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit409</b>  <math>IC_{50} = 10,2 \pm 1,1 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>

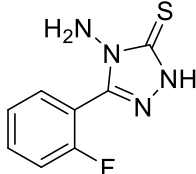
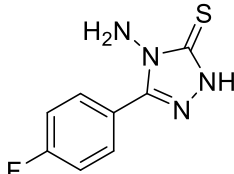
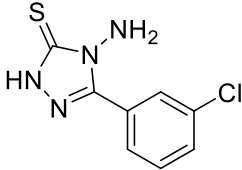
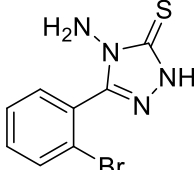
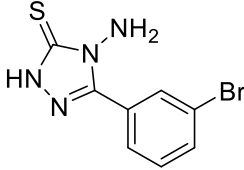
 <p><b>Lit410</b>  <math>IC_{50} = 16,2 \pm 1,4 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit411</b>  <math>IC_{50} = 17,6 \pm 1,8 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>
 <p><b>Lit412</b>  <math>IC_{50} = 16,2 \pm 1,5 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit413</b>  <math>IC_{50} = 19,6 \pm 1,6 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>
 <p><b>Lit416</b>  <math>IC_{50} = 18,2 \pm 1,5 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit419</b>  <math>IC_{50} = 13,4 \pm 1,0 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>
 <p><b>Lit421</b>  <math>IC_{50} = 12,1 \pm 1,0 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit422</b>  <math>IC_{50} = 15,4 \pm 1,2 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>

 <p><b>Lit423</b>  <math>IC_{50} = 18,0 \pm 1,5 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit424</b>  <math>IC_{50} = 16,2 \pm 1,4 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>
 <p><b>Lit425</b>  <math>IC_{50} = 14,1 \pm 1,2 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013  (SUYOGA <i>et al.</i>, 2013)</p>	 <p><b>Lit427</b>  <math>IC_{50} = 38,4 \pm 2,1 S \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>
 <p><b>Lit431</b>  <math>IC_{50} = 14,1 \pm 1,0 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit432</b>  <math>IC_{50} = 12,2 \pm 1,2 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>

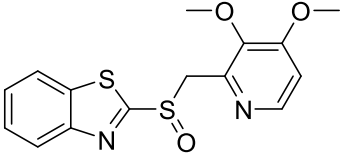
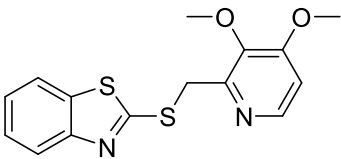
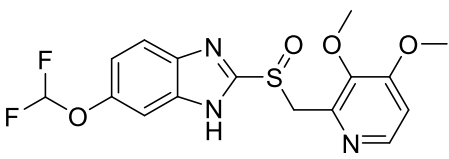
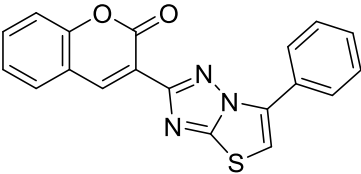
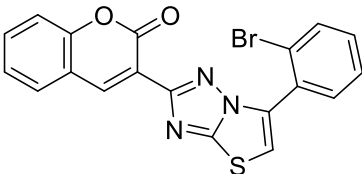
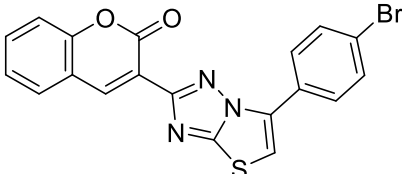
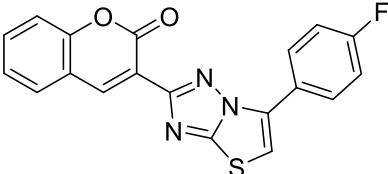
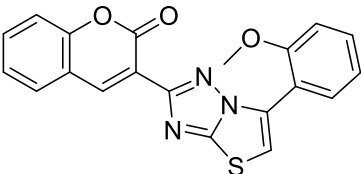
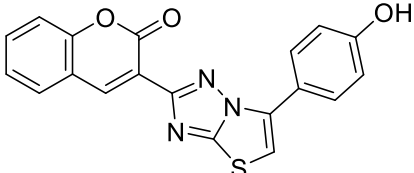
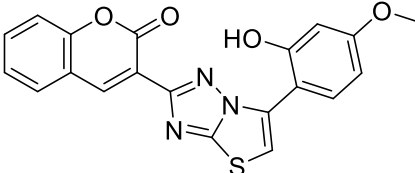
 <p><b>Lit433</b>  <math>IC_{50} = 12,2 \pm 1,2 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit434</b>  <math>IC_{50} = 18,6 \pm 1,0 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>
 <p><b>Lit435</b>  <math>IC_{50} = 19,2 \pm 1,3 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit436</b>  <math>IC_{50} = 16,6 \pm 1,4 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>
 <p><b>Lit437</b>  <math>IC_{50} = 20,2 \pm 1,0 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit440</b>  <math>IC_{50} = 12,8 \pm 1,5 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>

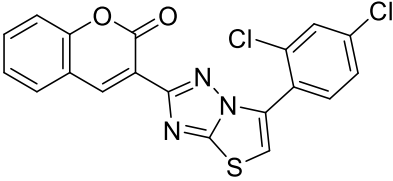
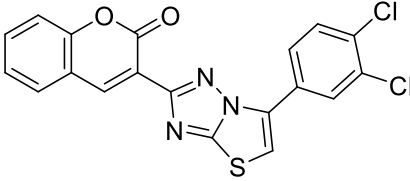
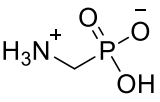
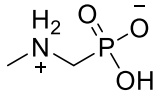
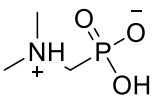
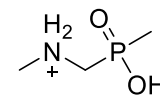
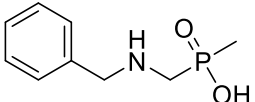
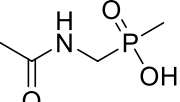
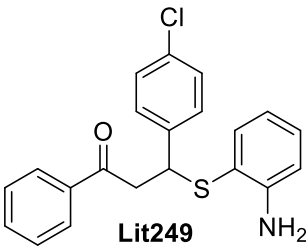
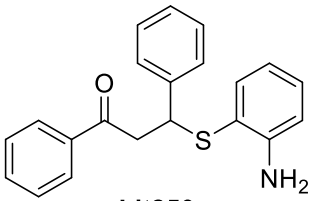
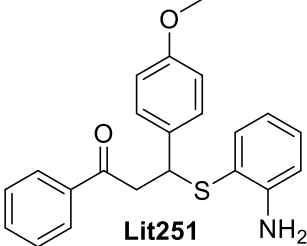
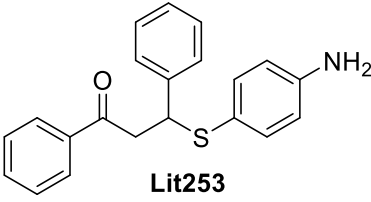
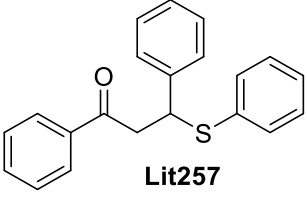
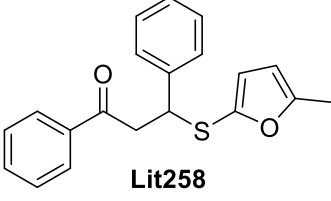


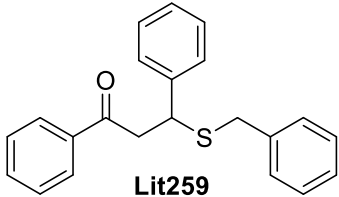
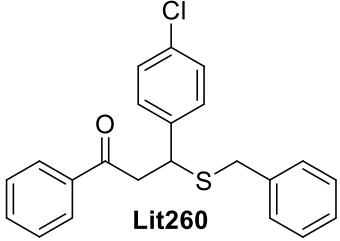
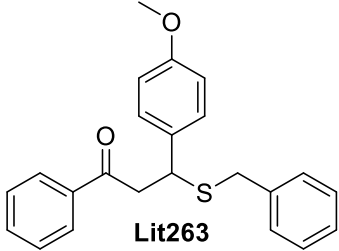
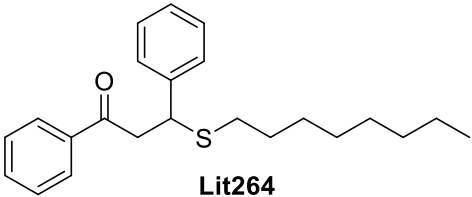
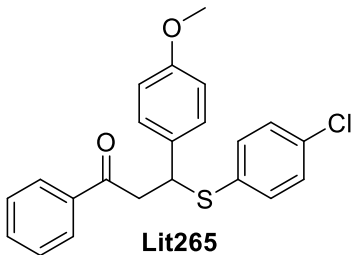
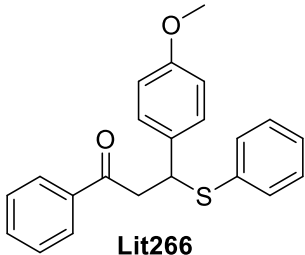
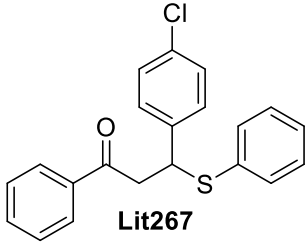
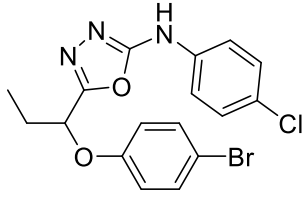
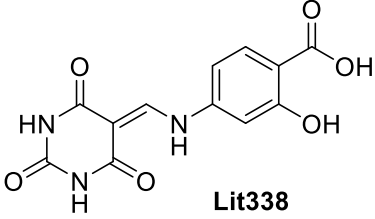
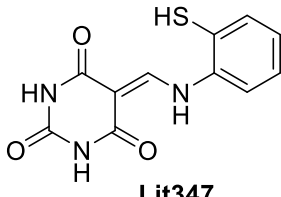
 <p><b>Lit451</b>  <math>IC_{50} = 18,5 \pm 1,4 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit452</b>  <math>IC_{50} = 38,6 \pm 1,7 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>
 <p><b>Lit464</b>  <math>IC_{50} = 16,1 \pm 0,120 \mu M</math>  Akhtar et al., 2010</p>	 <p><b>Lit465</b>  <math>IC_{50} = 16,7 \pm 0,178 \mu M</math>  Akhtar et al., 2010</p>
 <p><b>Lit466</b>  <math>IC_{50} = 32,0 \pm 0,0272 \mu M</math>  Akhtar et al., 2010</p>	 <p><b>Lit467</b>  <math>IC_{50} = 18,9 \pm 0,188 \mu M</math>  Akhtar et al., 2010</p>
 <p><b>Lit468</b>  <math>IC_{50} = 44,96 \pm 1,82 \mu M</math>  Khan et al., 2010</p>	 <p><b>Lit469</b>  <math>IC_{50} = 25,90 \pm 0,65 \mu M</math>  Khan et al., 2010</p>

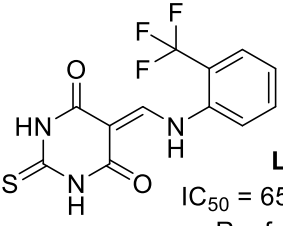
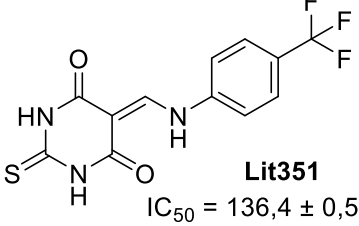
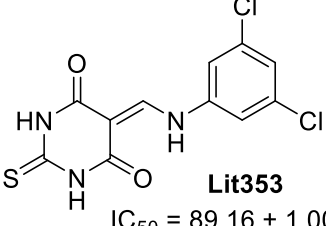
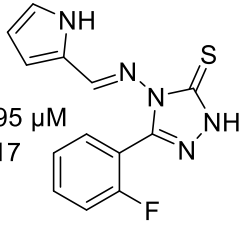
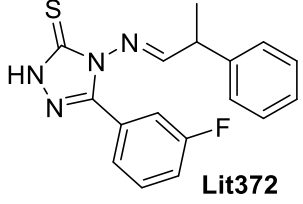
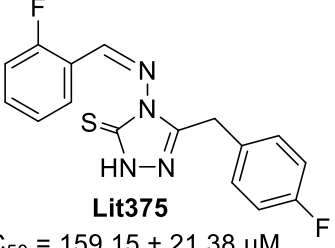
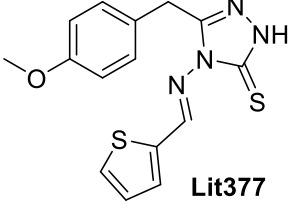
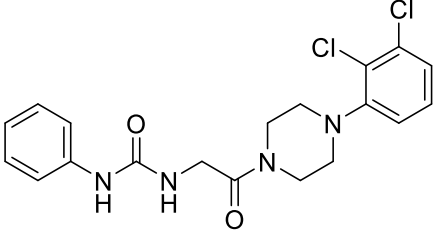
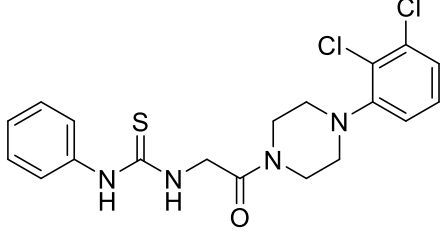
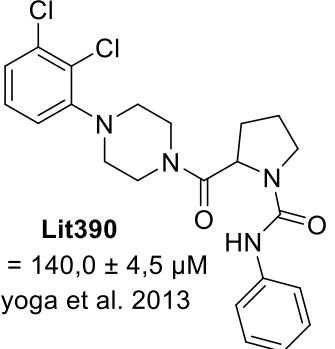
 <p><b>Lit470</b> <math>IC_{50} = 44,90 \pm 0,74 \mu M</math> Khan et al., 2010</p>	 <p><b>Lit471</b> <math>IC_{50} = 41,70 \pm 0,081 \mu M</math> Khan et al., 2010</p>
 <p><b>Lit472</b> <math>IC_{50} = 26,70 \pm 0,027 \mu M</math> Khan et al., 2010</p>	 <p><b>Lit473</b> <math>IC_{50} = 17,50 \pm 0,52 \mu M</math> Khan et al., 2010</p>
 <p><b>Lit474</b> <math>IC_{50} = 29,10 \pm 0,92 \mu M</math> Khan et al., 2010</p>	

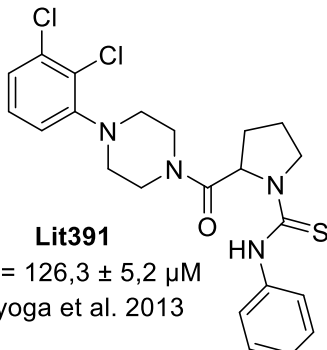
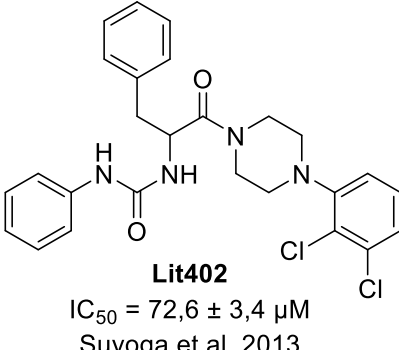
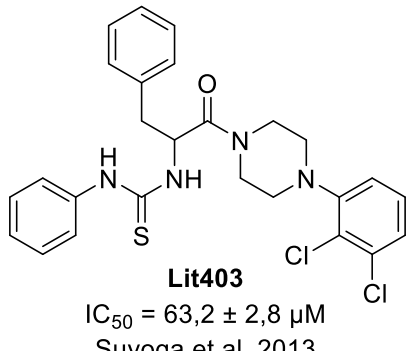
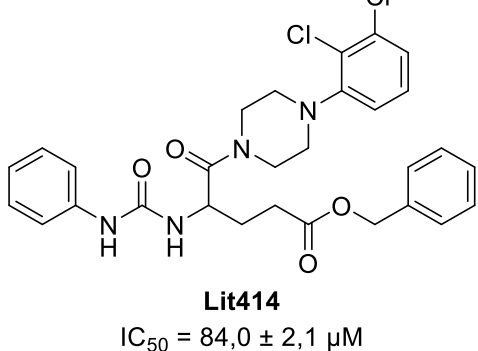
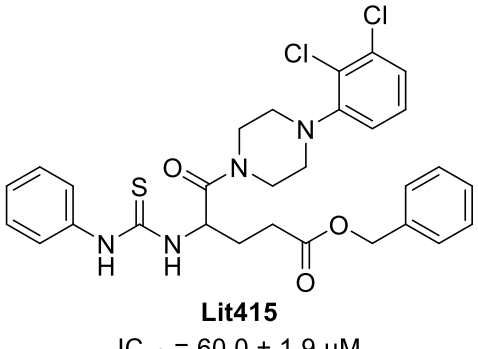
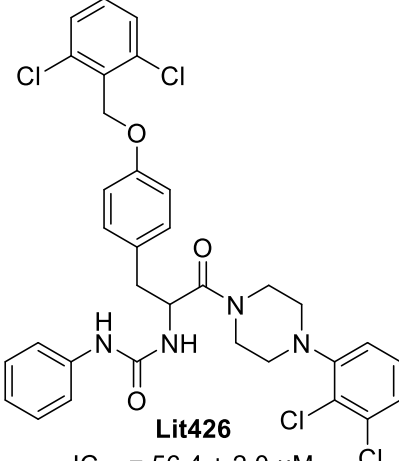
**Quadro D4** – Substâncias da literatura que compõem a faixa 4 de inibição da CEU ( $IC_{50} > 50 \mu M$ )

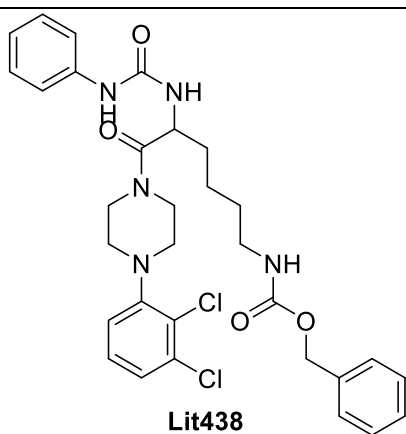
 <p><b>Lit01</b>  <math>IC_{50} = 147,9 \pm 0,92 \mu M</math>            Azizian et al., 2020</p>	 <p><b>Lit02</b>  <math>IC_{50} = 181,0 \pm 1,79 \mu M</math>            Azizian et al., 2020</p>
 <p><b>Lit06</b>  <math>IC_{50} = 62,94 \pm 2,44 \mu M</math>            Azizian et al., 2020</p>	 <p><b>Lit32</b>  <math>IC_{50} = 113,43 \pm 1,66 \mu M</math>            Khan et al., 2020</p>
 <p><b>Lit33</b>  <math>IC_{50} = 57,71 \pm 3,52 \mu M</math>            Khan et al., 2020</p>	 <p><b>Lit34</b>  <math>IC_{50} = 160,8 \pm 2,21 \mu M</math>            Khan et al., 2020</p>
 <p><b>Lit35</b>  <math>IC_{50} = 112,4 \pm 1,60 \mu M</math>            Khan et al., 2020</p>	 <p><b>Lit38</b>  <math>IC_{50} = 120,12 \pm 1,5 \mu M</math>            Khan et al., 2020</p>
 <p><b>Lit39</b>  <math>IC_{50} = 55,96 \pm 0,71 \mu M</math>            Khan et al., 2020</p>	 <p><b>Lit42</b>  <math>IC_{50} = 426,13 \pm 3,4 \mu M</math>            Khan et al., 2020</p>

 <p><b>Lit45</b>  <math>IC_{50} = 151,14 \pm 1,44 \mu\text{M}</math>  Khan et al., 2020</p>	 <p><b>Lit46</b>  <math>IC_{50} = 52,97 \pm 0,16 \mu\text{M}</math>  Khan et al., 2020</p>
 <p><b>Lit239</b>  <math>IC_{50} = 432 \pm 37,8 \mu\text{M}</math>  Berlicki et al. 2012</p>	 <p><b>Lit240</b>  <math>IC_{50} = 678 \pm 48 \mu\text{M}</math>  Berlicki et al. 2012</p>
 <p><b>Lit241</b>  <math>IC_{50} = 82 \pm 26 \mu\text{M}</math>  Berlicki et al. 2012</p>	 <p><b>Lit242</b>  <math>IC_{50} = 884 \pm 14 \mu\text{M}</math>  Berlicki et al. 2012</p>
 <p><b>Lit244</b>  <math>IC_{50} = 1632 \pm 226 \mu\text{M}</math>  Berlicki et al. 2012</p>	 <p><b>Lit245</b>  <math>IC_{50} = 1455 \pm 189 \mu\text{M}</math>  Berlicki et al. 2012</p>
 <p><b>Lit249</b>  <math>IC_{50} = 102 \mu\text{M}</math>  Ahari-Mostafavi et al. 2014</p>	 <p><b>Lit250</b>  <math>IC_{50} = 56 \mu\text{M}</math>  Ahari-Mostafavi et al. 2014</p>
 <p><b>Lit251</b>  <math>IC_{50} = 63 \mu\text{M}</math>  Ahari-Mostafavi et al. 2014</p>	 <p><b>Lit253</b>  <math>IC_{50} = 127 \mu\text{M}</math>  Ahari-Mostafavi et al. 2014</p>
 <p><b>Lit257</b>  <math>IC_{50} = 85 \mu\text{M}</math>  Ahari-Mostafavi et al. 2014</p>	 <p><b>Lit258</b>  <math>IC_{50} = 83 \mu\text{M}</math>  Ahari-Mostafavi et al. 2014</p>

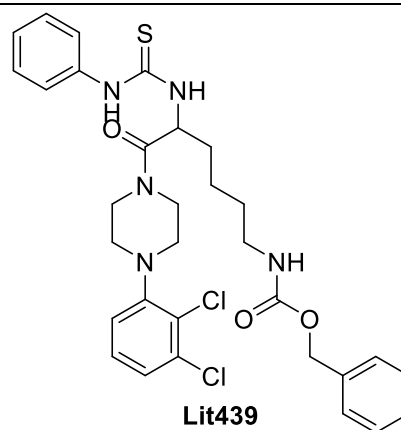
 <p><b>Lit259</b>  <math>IC_{50} = 151 \mu M</math>  Ahari-Mostafavi et al. 2014</p>	 <p><b>Lit260</b>  <math>IC_{50} = 97 \mu M</math>  Ahari-Mostafavi et al. 2014</p>
 <p><b>Lit263</b>  <math>IC_{50} = 167 \mu M</math>  Ahari-Mostafavi et al. 2014</p>	 <p><b>Lit264</b>  <math>IC_{50} = 125 \mu M</math>  Ahari-Mostafavi et al. 2014</p>
 <p><b>Lit265</b>  <math>IC_{50} = 71 \mu M</math>  Ahari-Mostafavi et al. 2014</p>	 <p><b>Lit266</b>  <math>IC_{50} = 135 \mu M</math>  Ahari-Mostafavi et al. 2014</p>
 <p><b>Lit267</b>  <math>IC_{50} = 181 \mu M</math>  Ahari-Mostafavi et al. 2014</p>	 <p><b>Lit283</b>  <math>IC_{50} = 57,2 \pm 6,3 \mu M</math>  Akhtar et al. 2014</p>
 <p><b>Lit338</b>  <math>IC_{50} = 88,3 \pm 1,22 \mu M</math>  Rauf et al. 2015</p>	 <p><b>Lit347</b>  <math>IC_{50} = 52,6 \pm 0,29 \mu M</math>  Rauf et al. 2015</p>

 <p><b>Lit348</b>  <math>IC_{50} = 65,3 \pm 0,57 \mu M</math>  Rauf et al. 2015</p>	 <p><b>Lit351</b>  <math>IC_{50} = 136,4 \pm 0,50 \mu M</math>  Rauf et al. 2015</p>
 <p><b>Lit353</b>  <math>IC_{50} = 89,16 \pm 1,00 \mu M</math>  Rauf et al. 2015</p>	 <p><b>Lit370</b>  <math>IC_{50} = 186,8 \pm 16,95 \mu M</math>  Rafiq et al. 2017</p>
 <p><b>Lit372</b>  <math>IC_{50} = 77,34 \pm 7,92 \mu M</math>  Rafiq et al. 2017</p>	 <p><b>Lit375</b>  <math>IC_{50} = 159,15 \pm 21,38 \mu M</math>  Rafiq et al. 2017</p>
 <p><b>Lit377</b>  <math>IC_{50} = 52,54 \pm 3,21 \mu M</math>  Rafiq et al. 2017</p>	 <p><b>Lit378</b>  <math>IC_{50} = 114,7 \pm 4,2 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>
 <p><b>Lit379</b>  <math>IC_{50} = 100,1 \pm 3,2 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit390</b>  <math>IC_{50} = 140,0 \pm 4,5 \mu M</math>  Suyoga et al. 2013</p>

 <p><b>Lit391</b> <math>IC_{50} = 126,3 \pm 5,2 \mu M</math> Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit402</b> <math>IC_{50} = 72,6 \pm 3,4 \mu M</math> Suyoga et al. 2013</p>
 <p><b>Lit403</b> <math>IC_{50} = 63,2 \pm 2,8 \mu M</math> Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit414</b> <math>IC_{50} = 84,0 \pm 2,1 \mu M</math> Suyoga et al. 2013</p>
 <p><b>Lit415</b> <math>IC_{50} = 60,0 \pm 1,9 \mu M</math> Suyoga et al. 2013</p>	 <p><b>Lit426</b> <math>IC_{50} = 56,4 \pm 2,0 \mu M</math> Suyoga et al. 2013</p>

**Lit438**

$IC_{50} = 98,0 \pm 2,1 \mu M$   
Suyoga et al. 2013

**Lit439**

$IC_{50} = 82,6 \pm 1,9 \mu M$   
Suyoga et al. 2013

## APÊNDICE E

Interações observadas na docagem molecular das substâncias da quimioteca do LaSMMed com a urease de *Canavalia ensiformis*

**Quadro E1 – Interações das substâncias LaSMMed 1-10 com a CEU**

	LMed 01	LMed 02	LMed 03	LMed 04	LMed 05	LMed 06	LMed 07	LMed 08	LMed 09	LMed 10
<b>Score</b>	21,6	25,1	27,2	25,9	23,4	24,8	27,9	26,7	26,2	29,2
<b>H409</b>										
<b>R439</b>										
<b>A440</b>										
<b>H492</b>										
<b>E493</b>										
<b>D494</b>										
<b>H519</b>										
<b>L523</b>										
<b>C592</b>										
<b>H593</b>										
<b>F605</b>										
<b>R609</b>										
<b>D633</b>										
<b>A636</b>										
<b>M637</b>										
<b>Ni902</b>										

*Legenda das cores de acordo com os tipos de interações:*

	Interação de hidrogênio		Empilhamento $\pi$ -- $\pi$		$\pi$ – ânion
	Hidrogênio não-convencional		Empilhamento $\pi$ - $\pi$ em T		$\pi$ – cátion
	Carga atrativa (O-+N)		$\pi$ – alquila		Enxofre – X (O,N,S)
	Metal – aceptor		Alquila		Interação de halogênio
	Interação $\pi$ - hidrogênio		$\pi$ – Enxofre		$\pi$ – $\sigma$

















**Quadro E10 – Interações das substâncias LAPSSO 168-189 com a CEU**

	LAPSSO 168	LAPSSO 169	LAPSSO 170	LAPSSO 171	LAPSSO 172	LAPSSO 173	LAPSSO 174
<b>Score</b>	23,57	30,74	27,78	19,86	24,73	25,36	23,29
<b>H407</b>							
<b>H409</b>							
<b>A440</b>							
<b>K490</b>							
<b>H492</b>							
<b>H519</b>							
<b>H545</b>							
<b>G550</b>							
<b>H593</b>							
<b>R609</b>							
<b>D633</b>							
<b>A636</b>							
<b>Ni901</b>							
<b>Ni902</b>							

**Quadro E11 – Interações das substâncias LAPSSO 175-181 com a CEU**

	LAPSSO 175	LAPSSO 176	LAPSSO 177	LAPSSO 178	LAPSSO 179	LAPSSO 180	LAPSSO 181
<b>Score</b>	21,23	21,16	21,07	22,82	29,80	26,19	28,98
<b>H407</b>							
<b>H409</b>							
<b>A440</b>							
<b>K490</b>							
<b>H492</b>							
<b>D494</b>							
<b>H519</b>							
<b>G550</b>							
<b>C592</b>							
<b>H593</b>							
<b>R609</b>							
<b>D633</b>							
<b>Ni901</b>							
<b>Ni902</b>							

**Quadro E12 – Interações das substâncias LAPSSO 182-188 com a CEU**

	LAPSSO 182	LAPSSO 183	LAPSSO 184	LAPSSO 185	LAPSSO 186	LAPSSO 187	LAPSSO 188
<b>Score</b>	28,16	28,61	29,96	24,37	21,17	22,53	24,24
H407							
H409							
A440							
K490							
H492							
D494							
H519							
G550							
C592							
H593							
R609							
D633							
A636							
M637							
Ni901							
Ni902							

**Quadro E13 – Interações das substâncias LAPSSO 189-195 com a CEU**

	LAPSSO 189	LAPSSO 190	LAPSSO 191	LAPSSO 192	LAPSSO 193	LAPSSO 194	LAPSSO 195
<b>Score</b>	21,97	22,07	23,62	25,50	28,32	29,05	18,28
R439							
A440							
H492							
H519							
G550							
C592							
H593							
R609							
D633							
A636							

Ni901							
Ni902							

**Quadro E14 – Interações das substâncias LAPSSO 196-201 com a CEU**

	LAPSSO 196	LAPSSO 197	LAPSSO 198	LAPSSO 199	LAPSSO 200	LAPSSO 201
<b>Score</b>	21,83	27,18	20,45	26,43	28,41	24,92
H407						
H409						
A440						
K490						
H492						
D494						
H519						
G550						
H593						
R609						
D633						
A636						
M637						
Ni901						
Ni902						

**Quadro E15 – Interações das substâncias LAPSSO 203-208 com a CEU**

	LAPSSO 203	LAPSSO 204	LAPSSO 205	LAPSSO 206	LAPSSO 207	LAPSSO 208
<b>Score</b>	27,74	29,32	27,48	29,7	24,88	27,81
H407						
H409						
R439						
A440						
K490						
H492						
E493						
D494						
H519						
L523						
G550						
C592						
H593						
F605						
R609						
D633						
A636						
M637						
Ni901						
Ni902						

**Quadro E16 – Interações das substâncias LAPSSO 209-212 com a CEU**

	<b>LAPSSO 209</b>	<b>LAPSSO 210</b>	<b>LAPSSO 211</b>	<b>LAPSSO 212</b>
<b>Score</b>	31,56	30,66	29,98	29,74
<b>A440</b>				
<b>H492</b>				
<b>E493</b>				
<b>D494</b>				
<b>H519</b>				
<b>L523</b>				
<b>C592</b>				
<b>H593</b>				
<b>F605</b>				
<b>R609</b>				
<b>A636</b>				
<b>M637</b>				

## APÊNDICE F

Interações observadas na docagem molecular das substâncias da quimioteca do LaSMMed na urease de *Helicobacter pylori*

**Quadro F1 – Interações das substâncias LaSMMed 1-10 com a HPU**

	LMed 01	LMed 02	LMed 03	LMed 04	LMed 05	LMed 06	LMed 07	LMed 08	LMed 09	LMed 10
<b>Score</b>	20,9	29,6	27,9	28,7	30,5	26,6	28,7	29,9	26,7	28,9
<b>G47(R)</b>										
<b>H221</b>										
<b>E222</b>										
<b>H248</b>										
<b>T251</b>										
<b>G280</b>										
<b>H314</b>										
<b>M317</b>										
<b>L318</b>										
<b>C321</b>										
<b>H322</b>										
<b>R338</b>										
<b>I339</b>										
<b>M366</b>										
<b>I467</b>										

*Legenda das cores de acordo com os tipos de interações:*

	Interação de hidrogênio		Empilhamento $\pi$ -- $\pi$		$\pi$ – ânion
	Hidrogênio não-convencional		Empilhamento $\pi$ - $\pi$ em T		$\pi$ – cátion
	Carga atrativa (O-+N)		$\pi$ – alquila		Enxofre – X (O,N,S)
	Metal – aceptor		Alquila		Interação de halogênio
	Interação $\pi$ - hidrogênio		$\pi$ – Enxofre		$\pi$ – $\sigma$



















**Quadro F11 – Interações das substâncias LAPSSO 176-183 com a HPU**

	LAPSSO 176	LAPSSO 177	LAPSSO 178	LAPSSO 179	LAPSSO 180	LAPSSO 181	LAPSSO 182	LAPSSO 183
<b>Score</b>	17,93	19,57	19,43	28,81	23,79	25,46	30,05	28,69
<b>G47R</b>								
<b>H136</b>								
<b>H138</b>								
<b>A169</b>								
<b>K219</b>								
<b>H221</b>								
<b>E222</b>								
<b>D223</b>								
<b>H248</b>								
<b>H274</b>								
<b>G279</b>								
<b>G280</b>								
<b>H322</b>								
<b>R338</b>								
<b>D362</b>								
<b>A365</b>								
<b>Ni601</b>								
<b>Ni602</b>								

**Quadro F12 – Interações das substâncias LAPSSO 184-191 com a HPU**

	LAPSSO 184	LAPSSO 185	LAPSSO 186	LAPSSO 187	LAPSSO 188	LAPSSO 189	LAPSSO 190	LAPSSO 191
<b>Score</b>	29,00	27,06	20,27	22,96	21,62	21,62	21,13	22,35
<b>G47R</b>								
<b>H136</b>								
<b>H138</b>								
<b>A169</b>								
<b>K219</b>								
<b>H221</b>								
<b>D223</b>								
<b>H248</b>								
<b>H274</b>								
<b>G279</b>								
<b>M317</b>								
<b>L318</b>								
<b>C321</b>								
<b>H322</b>								
<b>R338</b>								
<b>D362</b>								
<b>A365</b>								
<b>M366</b>								
<b>Ni601</b>								
<b>Ni602</b>								



**Quadro F14 – Interações das substâncias LAPSSO 201-206 com a HPU**

	LAPSSO 200	LAPSSO 201	LAPSSO 203	LAPSSO 204	LAPSSO 205	LAPSSO 206
<b>Score</b>	27,83	22,46	32,05	33,57	36,29	39,61
H136						
H138						
A169						
K219						
H221						
D223						
H248						
H274						
G279						
M317						
L318						
C321						
H322						
D362						
A365						
M366						
Ni601						
Ni602						

**Quadro F15 – Interações das substâncias LAPSSO 207-227 com a HPU**

	LAPSSO 207	LAPSSO 208	LAPSSO 209	LAPSSO 210	LAPSSO 211	LAPSSO 212
<b>Score</b>	33,95	28,10	34,34	39,69	37,37	37,07
<b>H136</b>						
<b>H138</b>						
<b>A169</b>						
<b>K219</b>						
<b>H221</b>						
<b>E222</b>						
<b>D223</b>						
<b>H248</b>						
<b>H274</b>						
<b>G279</b>						
<b>M317</b>						
<b>L318</b>						
<b>C321</b>						
<b>H322</b>						
<b>D362</b>						
<b>A365</b>						
<b>M366</b>						
<b>Ni601</b>						
<b>Ni602</b>						

*Legenda das cores de acordo com os tipos de interações:*

	Interação de hidrogênio		Empilhamento $\pi$ -- $\pi$		$\pi$ – ânion
	Hidrogênio não-convencional		Empilhamento $\pi$ - $\pi$ em T		$\pi$ – cátion
	Carga atrativa (O-+N)		$\pi$ – alquila		Enxofre – X (O,N,S)
	Metal – aceptor		Alquila		Interação de halogênio
	Interação $\pi$ - hidrogênio		$\pi$ – Enxofre		$\pi$ – $\sigma$

## APÊNDICE G

Interação das substâncias da literatura com a urease de *Canavalia ensiformis*

**Quadro G1** – Interações das substâncias da literatura (**Lit48-57**) que compõem a faixa 1 de inibição ( $IC_{50} < 0,1 \mu M$ ) com a CEU

	Lit48	Lit49	Lit50	Lit51	Lit52	Lit53	Lit54	Lit55	Lit56	Lit57
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	0,013	0,018	0,017	0,033	0,016	0,021	0,019	0,008	0,013	0,027
<b>Score</b>	38,44	37,54	38,02	35,96	35,79	36,69	39,46	35,32	37,35	42,75
<b>D439</b>										
<b>A440</b>										
<b>H492</b>										
<b>E493</b>										
<b>D494</b>										
<b>H519</b>										
<b>L523</b>										
<b>G550</b>										
<b>C592</b>										
<b>H593</b>										
<b>L595</b>										
<b>E601</b>										
<b>D602</b>										
<b>F605</b>										
<b>R609</b>										
<b>D633</b>										
<b>Q635</b>										
<b>A636</b>										
<b>M637</b>										
<b>Ni901</b>										







**Quadro G5** – Interações das substâncias da literatura (Lit134-143) que compõem a faixa 1 de inibição ( $IC_{50} < 0,1 \mu M$ ) com a CEU

	Lit134R	Lit134S	Lit135R	Lit135S	Lit136R	Lit136S	Lit143R	Lit143S
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	0,0816	0,0816	0,0061	0,0061	0,0987	0,0987	0,0441	0,0441
<b>Score</b>	38,03	32,57	33,7	33,33	37,28	35,26	37,3	36,31
<b>I411</b>								
<b>A436</b>								
<b>D439</b>								
<b>A440</b>								
<b>H492</b>								
<b>E493</b>								
<b>D494</b>								
<b>H519</b>								
<b>L523</b>								
<b>G550</b>								
<b>C592</b>								
<b>H593</b>								
<b>L595</b>								
<b>F605</b>								
<b>R609</b>								
<b>D633</b>								
<b>Q635</b>								
<b>A636</b>								
<b>M637</b>								



**Quadro G7** – Interações das substâncias da literatura (**Lit148-151**) que compõem a faixa 1 de inibição ( $IC_{50} < 0,1 \mu M$ ) com a CEU

	Lit148R	Lit148S	Lit149R	Lit149S	Lit150R	Lit150S	Lit15R	Lit151S
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	0,0085	0,0085	0,007	0,007	0,0946	0,0946	0,0437	0,0437
<b>Score</b>	35,16	32,04	37,56	32,83	37,75	36,16	38,04	40,63
<b>I411</b>								
<b>A436</b>								
<b>D439</b>								
<b>A440</b>								
<b>H492</b>								
<b>E493</b>								
<b>D494</b>								
<b>W495</b>								
<b>H519</b>								
<b>C592</b>								
<b>H593</b>								
<b>H594</b>								
<b>R609</b>								
<b>Q635</b>								
<b>A636</b>								
<b>M637</b>								
<b>Ni902</b>								

**Quadro G8** – Interações das substâncias da literatura (**Lit152-158**) que compõem a faixa 1 de inibição ( $IC_{50} < 0,1 \mu M$ ) com a CEU

	Lit152	Lit153	Lit154	Lit155	Lit156	Lit157R	Lit157S	Lit158
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	0,0269	0,0623	0,0698	0,0333	0,0582	0,0171	0,0171	0,054
<b>Score</b>	34,08	34,01	30,83	34,3	34,3	37,93	37,35	41,02
<b>D439</b>								
<b>A440</b>								
<b>H492</b>								
<b>D494</b>								
<b>H519</b>								
<b>G550</b>								
<b>C592</b>								
<b>H593</b>								
<b>H594</b>								
<b>R609</b>								
<b>Q635</b>								
<b>A636</b>								
<b>M637</b>								

*Legenda das cores de acordo com os tipos de interações:*

	Interação de hidrogênio		Empilhamento $\pi - \pi$		$\pi - \text{ânion}$
	Hidrogênio não-convencional		Empilhamento $\pi - \pi$ em T		$\pi - \text{cátion}$
	Carga atrativa (O-+N)		$\pi - \text{alquila}$		Enxofre – X (O,N,S)
	Metal – acceptor		Alquila		Interação de halogênio
	Interação $\pi - \text{hidrogênio}$		$\pi - \text{Enxofre}$		$\pi - \sigma$











**Quadro G14** – Interações das substâncias da literatura (**Lit200-203**) que compõem a faixa 1 de inibição ( $IC_{50} < 0,1 \mu M$ ) com a CEU

	Lit200R	Lit200S	Lit201R	Lit201S	Lit202R	Lit202S	Lit203R	Lit203S
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	0,0856	0,0856	0,0137	0,0137	0,0202	0,0202	0,0183	0,0183
<b>Score</b>	34,73	35,74	34,56	36,66	40,22	43,92	38,53	38,98
<b>I411</b>								
<b>A436</b>								
<b>D439</b>								
<b>A440</b>								
<b>H492</b>								
<b>D494</b>								
<b>H519</b>								
<b>L523</b>								
<b>C592</b>								
<b>H593</b>								
<b>H594</b>								
<b>R609</b>								
<b>Q635</b>								
<b>A636</b>								
<b>M637</b>								
<b>Ni901</b>								
<b>Ni902</b>								

*Legenda das cores de acordo com os tipos de interações:*

	Interação de hidrogênio		Empilhamento π -- π		π – ânion
	Hidrogênio não-convencional		Empilhamento π-π em T		π – cátion
	Carga atrativa (O-+N)		π – alquila		Enxofre – X (O,N,S)
	Metal – aceptor		Alquila		Interação de halogênio
	Interação π - hidrogênio		π – Enxofre		π – σ

**Quadro G15** – Interações das substâncias da literatura (**Lit204-208**) que compõem a faixa 1 de inibição ( $IC_{50} < 0,1 \mu M$ ) com a CEU

	Lit204R	Lit204S	Lit206R	Lit206S	Lit207R	Lit207S	Lit208R	Lit208S
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	0,0551	0,0551	0,07	0,07	0,0191	0,0191	0,00866	0,00866
<b>Score</b>	37,16	38,07	33,26	37,02	36,86	35,91	34,73	35,54
<b>I411</b>								
<b>A436</b>								
<b>D439</b>								
<b>A440</b>								
<b>H492</b>								
<b>D494</b>								
<b>W495</b>								
<b>H519</b>								
<b>L523</b>								
<b>G550</b>								
<b>V591</b>								
<b>C592</b>								
<b>H593</b>								
<b>H594</b>								
<b>R609</b>								
<b>D633</b>								
<b>Q635</b>								
<b>A636</b>								
<b>M637</b>								
<b>Ni901</b>								
<b>Ni902</b>								











**Quadro G21** – Interações das substâncias da literatura (**Lit497-502**) que compõem a faixa 1 de inibição ( $IC_{50} < 0,1 \mu M$ ) com a CEU

	Lit497	Lit498	Lit499	Lit500	Lit501	Lit502R	Lit502S
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	0,0146	0,027	0,029	0,0323	0,028	0,029	0,029
<b>Score</b>	49,83	40,29	37,19	40,76	39,56	37,86	37,92
<b>I411</b>							
<b>D439</b>							
<b>A440</b>							
<b>D494</b>							
<b>L523</b>							
<b>M588</b>							
<b>C592</b>							
<b>H593</b>							
<b>L595</b>							
<b>F605</b>							
<b>R609</b>							
<b>Q635</b>							
<b>A636</b>							
<b>M637</b>							

**Quadro G22** – Interações das substâncias da literatura (**Lit503-508**) que compõem a faixa 1 de inibição ( $IC_{50} < 0,1 \mu M$ ) com a CEU

	<b>Lit503</b>	<b>Lit504</b>	<b>Lit505</b>	<b>Lit506</b>	<b>Lit507</b>	<b>Lit508</b>
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	0,0035	0,0308	0,026	0,0372	0,0256	0,0237
<b>Score</b>	31,37	45,79	45,52	42,64	43,16	44,00
<b>I411</b>						
<b>D439</b>						
<b>A440</b>						
<b>D494</b>						
<b>L523</b>						
<b>M588</b>						
<b>C592</b>						
<b>H593</b>						
<b>L595</b>						
<b>F605</b>						
<b>R609</b>						
<b>Q635</b>						
<b>A636</b>						
<b>M637</b>						

*Legenda das cores de acordo com os tipos de interações:*

	Interação de hidrogênio		Empilhamento π -- π		π – ânion
	Hidrogênio não-convencional		Empilhamento π-π em T		π – cátion
	Carga atrativa (O-+N)		π – alquila		Enxofre – X (O,N,S)
	Metal – acceptor		Alquila		Interação de halogênio
	Interação π - hidrogênio		π – Enxofre		π – σ













**Quadro G29** – Interações das substâncias da literatura (**Lit193-221**) que compõem a faixa 2 de inibição ( $0,1 < IC_{50} < 10 \mu M$ ) com a CEU

	Lit193	Lit194	Lit195	Lit205R	Lit205S	Lit209R	Lit209S	Lit221
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	0,2254	0,141	0,186	0,75	0,75	0,113	0,113	0,215
<b>Score</b>	31,26	32,74	36,76	32,66	35,86	40,09	38,93	27,38
<b>H407</b>								
<b>H409</b>								
<b>A436</b>								
<b>R439</b>								
<b>A440</b>								
<b>K490</b>								
<b>H492</b>								
<b>G493</b>								
<b>D494</b>								
<b>W495</b>								
<b>H519</b>								
<b>G550</b>								
<b>V591</b>								
<b>C592</b>								
<b>H593</b>								
<b>H594</b>								
<b>R609</b>								
<b>D633</b>								
<b>A636</b>								
<b>M637</b>								
<b>Ni901</b>								
<b>Ni902</b>								

**Quadro G30** – Interações das substâncias da literatura (Lit222-230) que compõem a faixa 2 de inibição ( $0,1 < IC_{50} < 10 \mu M$ ) com a CEU

	Lit222	Lit223	Lit224	Lit225	Lit226	Lit227	Lit228	Lit229	Lit230
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	0,67	0,41	0,767	0,707	0,102	0,547	0,177	0,887	0,989
<b>Score</b>	27,02	26,94	26,56	26,43	29,80	28,36	28,69	28,79	32,19
<b>H407</b>									
<b>R439</b>									
<b>A440</b>									
<b>K490</b>									
<b>H492</b>									
<b>D494</b>									
<b>H519</b>									
<b>G550</b>									
<b>C592</b>									
<b>H593</b>									
<b>D633</b>									
<b>A636</b>									
<b>Ni901</b>									

Legenda das cores de acordo com os tipos de interações:

	Interação de hidrogênio		Empilhamento π -- π		π – ânion
	Hidrogênio não-convencional		Empilhamento π-π em T		π – cátion
	Carga atrativa (O-+N)		π – alquila		Enxofre – X (O,N,S)
	Metal – acceptor		Alquila		Interação de halogênio
	Interação π - hidrogênio		π – Enxofre		π – σ

























L523								
H545								
G550								
M588								
V591								
C592								
H593								
L595								
F605								
R609								
D633								
Q635								
A636								
M637								
Ni901								
Ni902								

**Quadro G43** – Interações das substâncias da literatura (**Lit453-458**) que compõem a faixa 2 de inibição ( $0,1 < IC_{50} < 10 \mu M$ ) com a CEU

	Lit453	Lit454	Lit455	Lit456	Lit457	Lit458
IC <sub>50</sub> (μM)	1,450	2,270	0,140	0,594	0,667	0,158
Score	40,71	40,37	41,63	44,38	39,69	41,32
A440						
D494						
M588						
C592						
H593						
L595						

<b>F605</b>						
<b>R609</b>						
<b>A636</b>						
<b>M637</b>						

**Quadro G44** – Interações das substâncias da literatura (**Lit459-481**) que compõem a faixa 2 de inibição ( $0,1 < IC_{50} < 10 \mu M$ ) com a CEU

	<b>Lit459</b>	<b>Lit460</b>	<b>Lit462</b>	<b>Lit463</b>	<b>Lit481</b>
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	0,246	0,224	0,378	0,497	0,300
<b>Score</b>	40,08	37,48	43,70	38,09	30,78
<b>H409</b>					
<b>I411</b>					
<b>R439</b>					
<b>A440</b>					
<b>D494</b>					
<b>H519</b>					
<b>L523</b>					
<b>H593</b>					
<b>L595</b>					
<b>R609</b>					
<b>D633</b>					
<b>A636</b>					
<b>Ni901</b>					

*Legenda das cores de acordo com os tipos de interações:*

	Interação de hidrogênio		Empilhamento π -- π		π – ânion
	Hidrogênio não-convencional		Empilhamento π-π em T		π – cátion
	Carga atrativa (O-+N)		π – alquila		Enxofre – X (O,N,S)
	Metal – acceptor		Alquila		Interação de halogênio
	Interação π - hidrogênio		π – Enxofre		π – σ











**Quadro G50** – Interações das substâncias da literatura (**Lit247-255**) que compõem a faixa 3 de inibição ( $10 < IC_{50} < 50 \mu M$ ) com a CEU

	Lit247R	Lit247S	Lit252R	Lit252S	Lit254R	Lit254S	Lit255R	Lit255S
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	12,00	12,00	18,00	18,00	16,60	16,60	35,00	35,00
<b>Score</b>	33,38	33,93	33,41	34,62	31,33	32,48	34,45	33,67
<b>R439</b>								
<b>A440</b>								
<b>K490</b>								
<b>H492</b>								
<b>D494</b>								
<b>H519</b>								
<b>H545</b>								
<b>G550</b>								
<b>H593</b>								
<b>R609</b>								
<b>D633</b>								
<b>Q635</b>								
<b>A636</b>								
<b>M637</b>								
<b>Ni901</b>								
<b>Ni902</b>								













**Quadro G57** – Interações das substâncias da literatura (**Lit350-369**) que compõem a faixa 3 de inibição ( $10 < IC_{50} < 50 \mu M$ ) com a CEU

	Lit350	Lit352	Lit354	Lit355	Lit356	Lit367	Lit368	Lit369
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	24,56	28,70	41,33	19,70	15,00	42,59	17,02	39,30
<b>Score</b>	33,01	36,30	31,32	31,93	30,64	29,02	27,01	29,98
<b>H407</b>								
<b>H409</b>								
<b>A436</b>								
<b>R439</b>								
<b>A440</b>								
<b>K490</b>								
<b>H492</b>								
<b>D494</b>								
<b>H519</b>								
<b>H545</b>								
<b>G550</b>								
<b>C592</b>								
<b>H593</b>								
<b>H594</b>								
<b>R609</b>								
<b>D633</b>								
<b>A636</b>								
<b>M637</b>								
<b>Ni901</b>								







**Quadro G61** – Interações das substâncias da literatura (**Lit408-411**) que compõem a faixa 3 de inibição ( $10 < IC_{50} < 50 \mu M$ ) com a CEU

	Lit408R	Lit408S	Lit409R	Lit409S	Lit410R	Lit410S	Lit411R	Lit411S
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	13,10	13,10	10,20	10,20	16,20	16,20	17,60	17,60
<b>Score</b>	35,03	33,76	33,45	33,07	33,03	34,88	34,42	34,48
<b>I411</b>								
<b>A436</b>								
<b>R439</b>								
<b>A440</b>								
<b>H492</b>								
<b>D494</b>								
<b>W495</b>								
<b>H519</b>								
<b>L523</b>								
<b>C592</b>								
<b>H593</b>								
<b>H594</b>								
<b>L595</b>								
<b>F605</b>								
<b>R609</b>								
<b>Q635</b>								
<b>A636</b>								
<b>M637</b>								







M637								
G638								
R639								

**Quadro G65** – Interações das substâncias da literatura (Lit432-435) que compõem a faixa 3 de inibição ( $10 < IC_{50} < 50 \mu M$ ) com a CEU

	Lit432R	Lit432S	Lit433R	Lit433S	Lit434R	Lit434S	Lit435R	Lit435S
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	12,20	12,20	12,20	12,20	18,60	18,60	19,20	19,20
<b>Score</b>	40,23	39,47	38,77	38,71	38,44	39,25	41,32	38,97
<b>A436</b>								
<b>R439</b>								
<b>A440</b>								
<b>H492</b>								
<b>D494</b>								
<b>W495</b>								
<b>H519</b>								
<b>L523</b>								
<b>H545</b>								
<b>P573</b>								
<b>M588</b>								
<b>C592</b>								
<b>H593</b>								
<b>H594</b>								
<b>L595</b>								
<b>F605</b>								
<b>R609</b>								
<b>Q635</b>								



H593								
H594								
L595								
F605								
R609								
D633								
Q635								
A636								
M637								
R639								
Ni901								
Ni902								

**Quadro G67** – Interações das substâncias da literatura (Lit446-449) que compõem a faixa 3 de inibição ( $10 < IC_{50} < 50 \mu M$ ) com a CEU

	Lit446R	Lit446S	Lit447R	Lit447S	Lit448R	Lit448S	Lit449R	Lit449S
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	32,00	32,00	18,10	18,10	17,60	17,60	20,10	20,10
<b>Score</b>	41,19	42,82	40,78	40,14	41,21	39,35	41,63	39,76
<b>H409</b>								
<b>A436</b>								
<b>R439</b>								
<b>A440</b>								
<b>H492</b>								
<b>G493</b>								
<b>D494</b>								

W495								
H519								
L523								
M588								
C592								
H593								
H594								
L595								
F605								
R609								
D633								
Q635								
A636								
M637								
Ni901								

**Quadro G68** – Interações das substâncias da literatura (**Lit450-464**) que compõem a faixa 3 de inibição ( $10 < IC_{50} < 50 \mu M$ ) com a CEU

	Lit450R	Lit450S	Lit451R	Lit451S	Lit452R	Lit452S	Lit464R	Lit464S
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	28,20	28,20	18,50	18,50	38,60	38,60	16,10	16,10
<b>Score</b>	41,38	40,51	40,13	41,88	41,66	39,98	31,70	30,93
H409								
A436								
R439								
A440								
H492								

<b>G493</b>									
<b>D494</b>									
<b>W495</b>									
<b>H519</b>									
<b>L523</b>									
<b>M588</b>									
<b>C592</b>									
<b>H593</b>									
<b>H594</b>									
<b>F605</b>									
<b>R609</b>									
<b>Q635</b>									
<b>A636</b>									
<b>M637</b>									
<b>R639</b>									

**Quadro G69** – Interações das substâncias da literatura (**Lit465-468**) que compõem a faixa 3 de inibição ( $10 < IC_{50} < 50 \mu M$ ) com a CEU

	Lit465R	Lit465S	Lit466R	Lit466S	Lit467R	Lit467S	Lit468
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	16,70	16,70	32,00	32,00	18,90	18,90	44,96
<b>Score</b>	26,87	28,09	25,75	27,51	26,37	27,86	27,44
<b>H407</b>							
<b>H409</b>							
<b>R439</b>							
<b>A440</b>							
<b>K490</b>							
<b>H492</b>							
<b>H519</b>							
<b>H545</b>							
<b>C592</b>							
<b>H593</b>							
<b>R609</b>							
<b>D633</b>							
<b>A636</b>							
<b>M637</b>							
<b>Ni901</b>							
<b>Ni902</b>							



**Quadro G71** – Interações das substâncias da literatura (**Lit01-45**) que compõem a faixa 4 de inibição ( $IC_{50} > 50 \mu M$ ) com a CEU

	Lit01	Lit02	Lit06	Lit32	Lit33	Lit34	Lit35	Lit38	Lit39	Lit45
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	147,90	181,00	62,94	113,43	57,71	160,80	112,40	120,12	55,96	151,14
<b>Score</b>	30,42	30,55	38,76	34,65	32,95	31,35	36,03	37,26	39,79	31,68
<b>H407</b>										
<b>H409</b>										
<b>R439</b>										
<b>A440</b>										
<b>K490</b>										
<b>H492</b>										
<b>E493</b>										
<b>D494</b>										
<b>H519</b>										
<b>H545</b>										
<b>G550</b>										
<b>H593</b>										
<b>H594</b>										
<b>R609</b>										
<b>D633</b>										
<b>A636</b>										
<b>M637</b>										
<b>Ni901</b>										
<b>Ni902</b>										

**Quadro G72** – Interações das substâncias da literatura (Lit46-253) que compõem a faixa 4 de inibição ( $IC_{50} > 50 \mu M$ ) com a CEU

	Lit46	Lit249R	Lit249S	Lit250R	Lit250S	Lit251R	Lit251S	Lit253R	Lit253S
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	52,97	102,00	102,00	56,00	56,00	63,00	63,00	127,00	127,00
<b>Score</b>	32,51	33,73	34,65	32,31	33,81	35,63	35,69	33,5	34,5
<b>H409</b>									
<b>R439</b>									
<b>A440</b>									
<b>K490</b>									
<b>D494</b>									
<b>G550</b>									
<b>M588</b>									
<b>C592</b>									
<b>H593</b>									
<b>R609</b>									
<b>D633</b>									
<b>Q635</b>									
<b>A636</b>									
<b>M637</b>									
<b>R639</b>									

**Quadro G73** – Interações das substâncias da literatura (Lit258-263) que compõem a faixa 4 de inibição ( $IC_{50} > 50 \mu M$ ) com a CEU

	Lit258R	Lit258S	Lit259R	Lit259S	Lit260R	Lit260S	Lit263R	Lit263S
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	83,00	83,00	151,00	151,00	97,00	97,00	167,00	167,00
<b>Score</b>	30,57	31,27	33,87	33,31	34,12	34,32	35,18	35,8
<b>R439</b>								
<b>A440</b>								
<b>H492</b>								
<b>D494</b>								
<b>H519</b>								
<b>C592</b>								
<b>H593</b>								
<b>R609</b>								

<b>Q635</b>								
<b>A636</b>								
<b>M637</b>								

**Quadro G74** – Interações das substâncias da literatura (**Lit264-267**) que compõem a faixa 4 de inibição ( $IC_{50} > 50 \mu M$ ) com a CEU

	<b>Lit264R</b>	<b>Lit264S</b>	<b>Lit265R</b>	<b>Lit265S</b>	<b>Lit266R</b>	<b>Lit266S</b>	<b>Lit267R</b>	<b>Lit267S</b>
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	125,00	125,00	71,00	71,00	135,00	135,00	181,00	181,00
<b>Score</b>	34,9	34,56	33,65	32,54	33,89	34,62	31,38	33,33
<b>I411</b>								
<b>R439</b>								
<b>A440</b>								
<b>H492</b>								
<b>H519</b>								
<b>G550</b>								
<b>C592</b>								
<b>H593</b>								
<b>H594</b>								
<b>F605</b>								
<b>R609</b>								
<b>D633</b>								
<b>Q635</b>								
<b>A636</b>								
<b>M637</b>								







R639								
------	--	--	--	--	--	--	--	--

**Quadro G78** – Interações das substâncias da literatura (**Lit415-439**) que compõem a faixa 4 de inibição ( $IC_{50} > 50 \mu M$ ) com a CEU

	Lit415R	Lit415S	Lit426R	Lit426S	Lit438R	Lit438S	Lit439R	Lit439S
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	60,00	60,00	56,40	56,40	98,00	98,00	82,60	82,60
<b>Score</b>	41,32	43,77	46,35	42,27	47,03	47,13	42,68	44,21
<b>R439</b>								
<b>A440</b>								
<b>H492</b>								
<b>D494</b>								
<b>L523</b>								
<b>M588</b>								
<b>C592</b>								
<b>H593</b>								
<b>H594</b>								
<b>L595</b>								
<b>F605</b>								
<b>R609</b>								
<b>Q635</b>								
<b>A636</b>								
<b>M637</b>								
<b>R639</b>								

## APÊNDICE H

### Semelhança entre as Ureases

**Figura H1**– Alinhamento das sequências primárias das ureases CEU (4H9M), CNU (*Cryptococcus neoformans* - P0CS23) e HPU (6ZJA)

4H9M_CEU	1	MKLSPREVEKLGHNAGYLAQKRLARGVRLNRYTEAVALIASQIMEYARDGKETAQLMCLGQHLGRRQVLPVPHLLNA	80
CryNB_CNU	1	MHLLPRETDKLIIVTTLGTLAQRRLARGLILNRAETIALISSQLQEFIRDGRHSVAELMDLGKMKLGRRHVRKGVPEIHT	80
6ZJA_HPU		-----	
4H9M_CEU	81	VQVEATFPDGTKLVTVHDPISRENGELQEALFGSLLPVPSLDKFAETKED-NRIPGEILCEDECLTINIGRKAVILKVTS	159
CryNB_CNU	81	IQVEGTFPDGVFLVTVDDPISSDDGDLNNAFYGSFLPIPSADVFPAAPEPaDTLLGALICRKEPIKINASRRRFKLEVKN	160
6ZJA_HPU		-----	
4H9M_CEU	160	KGDRPIQVGSYHYHFIEVNPYLTFDRRKAYGMRLNIAAGTAVRFEPGDCKSVTLVSIENKVIIRGGNAIADGPVNETNLEA	239
CryNB_CNU	161	AGDRPIQVGSYHYHFLETNPALIFDRLLSYGYHLDIPAGTAVRFEPGEKKTVMVEFGGKIFHGGSGLASGSFDENLRET	240
6ZJA_HPU		-----	
4H9M_CEU	240	AMHAVRSK-GFGHEEEKDASEGFT[8]NTFIHRKEYANKYGPTTGDKIRLGDTNLLAEIEKDIALYGDCEVFGGGKVIIRD	323
CryNB_CNU	241	KVKEMVEKGGFGHKDQEKVEEGPT -TEMNREYASMFGPTTGDKIKLADMDLWIEVEKDITYVYGECKFGGGKVLIRD	316
6ZJA_HPU	1	----- MKKISRKEYVSMYGPTTGDKVRLGDTDLIAEVEHDYTIYGEELKFGGGKTLRE	53
4H9M_CEU	324	GMGQSCGHPPAISLDTVITNAVIDYTGIIKADIGIKDGLIASIGKAGNPDMNGVFSNMIIIGANTEVIAGEGLIVTAGA	403
CryNB_CNU	317	GGGQASGRHEHEVLDLVITNALIVDWNIGYKADIGVKNGIIVGIGKAGNPDMMDGVTGDMIVGSSTEVIAAGEKLIITAGA	396
6ZJA_HPU	54	GMSQSN-NPSKEELDLIITNALIVDYTGIIYKADIGIKDGIAGIKGGKNDMQDGVKNLNSVGPATEALAGEGLIVTAGG	132
4H9M_CEU	404	IDCHVHYICPQLVYEAISSGITTLVGGGTGPAAGTRATTCTPSPTQMLMLQSTDDLPLNFGFTGKGSSSKPDELHEIIK	483
CryNB_CNU	397	LDVHVHYICPQLMTEALASGITTVGGGTGPAAGSNATTCTSSSFYMQNMIIKATDTPVPLNFGFTGKGNDSGTNALRDVIE	476
6ZJA_HPU	133	IDTHIHFIISPQQIPTAFASGVTTMIGGGTGPADGNTATTITPGRRLKWMMLRAAEYSMLGLFLAKGNTSNDASLADQIE	212
4H9M_CEU	484	AGAMGLKLHEDWGSTPAAIDNCLTIAEHHDIQINIHTDTLNEAGFVEHSIAAFKGRITHTYHSEGAGGGHAPDIIKVGCI	563
CryNB_CNU	477	AGACGLKVHEDWGTPEVIDRALSIADEYDVQVNLHSDTLNESGYVESTLAAIKGRITHSYHTEGAGGGHAPDIIIVCEY	556
6ZJA_HPU	213	AGAIGFKIHEDWGTTPSAINHALDVADKYDQVAIHTDTLNEAGCVEDTMAAIGRTMHTFHTEGAGGGHAPDIIKVAGE	292
4H9M_CEU	564	KNVLPSSSTNPTRPLTSNTIDEHLDMLMVCHHLDRIPEDLAFASRIRKKTIAAEDVLNDIGAISIISSDSQAMGRVGEV	643
CryNB_CNU	557	ENVLPSSSTNPTRPYAVNTLDEHLDMLMVCHHLKDSIPEDIAFADSRIRSETVAAEDVLQDTGAIMSISDCQAMGRIGEV	636
6ZJA_HPU	293	HNILPASTNPTIPFTVNTAEAHMDMLMVCHHLKDSIKEDVQFADSRIRPQTIAAEDTLHDMGIFSIITSSDSQAMGRVGEV	372
4H9M_CEU	644	ISRTWQTADKMKAQTGPLKCDSSDNDNFRIRRYIAKYTINPAIANGFSQYVGSVEVGKLADLVMMKPSFFGTKPENVIKIG	723
CryNB_CNU	637	ITRTWRTAAKMKQFRGPLEGDEPTRDNRVRYVAKYITINPAITHGMSHLIGQVAVGCLADLVFWTAESFGARPEMILKIG	716
6ZJA_HPU	373	ITRTWQTADKMKKEFGRLKEEGDNDNFRIRRYLSKYTINPAIAHGISEYVGSVEVGKVLADLVWSPAFFGVKPNMIIKIG	452
4H9M_CEU	724	GMVAWADIGDPNASIPTPEPVKMRPMYGTGKAGGALSIAFVSKAALDQRVNVLYGLNKRVEAVSNVRKLTCLDMKLNDA	803
CryNB_CNU	717	GVIAWAAMGDANASIPTVQPVIGRPMWGSQPEAAALNSIVVVSQASLDKDLVKRFNIKRAEAVKNCRATIGKDKMKWINDS	796
6ZJA_HPU	453	GFIALSQMGDANASIPTPQPVYREMFVHGHGAKYDANITFVVSQAAYDKGIKEELGLERQVLPVKNCRNITKDKMQFNDT	532
4H9M_CEU	804	LPEITVDPESTYVKADGKLLCVSEATTVPLSRNYFLF	840
CryNB_CNU	797	MPKMTVDPEYDVAHAGVLCVPPADKLPVLTGRYFVY	833
6ZJA_HPU	533	TAHIEVNPETYHVFDGKEVTSKANKVSLAQLFSIF	569

Fonte: o próprio autor

Legenda: Resíduos idênticos entre as sequências são dados em vermelho e aqueles que são semelhantes em azul. O alinhamento foi realizado pelo servidor Cobalt ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re\\_cobalt.cgi](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi)) (PAPADOPOULOS; AGARWALA, 2007) e os cálculos de identidade e similaridade pelo Bioinformatics server ([https://www.bioinformatics.org/sms2/ident\\_sim.html](https://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html)) (STOTHARD, 2000)

## APÊNDICE I

Artigos Aceitos para Publicação

**Figura I1**– Capa do artigo publicado na revista *Frontiers in Microbiology*, com estudos na urease de *Cryptococcus neoformans*



TYPE Original Research  
 PUBLISHED 07 March 2023  
 DOI 10.3389/fmicb.2023.1040671



## OPEN ACCESS

EDITED BY  
 Francisca Vicente,  
 Fvperez Consulting, Spain

REVIEWED BY  
 Patricia Albuquerque,  
 University of Brasilia, Brazil  
 Debabrata Chowdhury,  
 Stanford University, United States

\*CORRESPONDENCE  
 Sueli Fumie Yamada-Ogatta  
 ✉ ogatta@uel.br

SPECIALTY SECTION  
 This article was submitted to  
 Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy,  
 a section of the journal  
 Frontiers in Microbiology

RECEIVED 09 September 2022  
 ACCEPTED 20 February 2023  
 PUBLISHED 07 March 2023

CITATION  
 Andriani GM, Spoladori LFA, Fabris M,  
 Camargo PG, Pereira PML, Santos JP,  
 Bartolomeu-Gonçalves G, Alonso L,  
 Lancheros CAC, Alonso A, Nakamura CV,  
 Macedo F Jr, Pinge-Filho P, Yamauchi LM,  
 Bispo MLF, Tavares ER and Yamada-Ogatta SF  
 (2023) Synergistic antifungal interaction  
 of *N*-(butylcarbamoithiyl) benzamide  
 and amphotericin B against *Cryptococcus  
 neoformans*.  
*Front. Microbiol.* 14:1040671.  
 doi: 10.3389/fmicb.2023.1040671

COPYRIGHT  
 © 2023 Andriani, Spoladori, Fabris, Camargo,  
 Pereira, Santos, Bartolomeu-Gonçalves,  
 Alonso, Lancheros, Alonso, Nakamura

# Synergistic antifungal interaction of *N*-(butylcarbamoithiyl) benzamide and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*

Gabriella Maria Andriani<sup>1,2</sup>,  
 Lais Fernanda de Almeida Spoladori<sup>1,2</sup>, Marciéli Fabris<sup>3</sup>,  
 Priscila Goes Camargo<sup>3</sup>, Patricia Morais Lopes Pereira<sup>1</sup>,  
 Jussevania Pereira Santos<sup>2</sup>,  
 Guilherme Bartolomeu-Gonçalves<sup>2,4</sup>, Lais Alonso<sup>5</sup>,  
 Cesar Armando Contreras Lancheros<sup>6</sup>, Antonio Alonso<sup>5</sup>,  
 Celso Vataru Nakamura<sup>1,6</sup>, Fernando Macedo Jr.<sup>3</sup>,  
 Phileno Pinge-Filho<sup>1,7</sup>, Lucy Megumi Yamauchi<sup>1,2</sup>,  
 Marcelle de Lima Ferreira Bispo<sup>3</sup>, Eliandro Reis Tavares<sup>1,2</sup> and  
 Sueli Fumie Yamada-Ogatta<sup>1,2,4\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil, <sup>2</sup>Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil, <sup>3</sup>Laboratório de Síntese de Moléculas Mediciniais, Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil, <sup>4</sup>Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil, <sup>5</sup>Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil, <sup>6</sup>Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brazil, <sup>7</sup>Laboratório de Imunopatologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de

## Figura I2 – Capa do artigo de revisão publicado na revista *Current Pharmaceutical Design*, com estudos na urease de *Helicobacter pylori* e *Cryptococcus neoformans*

*Current Pharmaceutical Design*, XXXX, XX, XXX-XXX

1

### REVIEW ARTICLE

## Computational Strategies Targeting Inhibition of *Helicobacter pylori* and *Cryptococcus neoformans* Ureases

Marciéli Fabris<sup>1</sup>, Nailton M. Nascimento-Júnior<sup>2</sup>, Marcelle L.F. Bispo<sup>1,\*</sup> and Priscila G. Camargo<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Chemistry Department, Laboratory of Synthesis of Medicinal Molecules (LaSMMed), State University of Londrina (UEL), Celso Garcia CID Road, Campus Universitário, Londrina, Paraná, 86057-970, Brazil; <sup>2</sup>Department of Biochemistry and Organic Chemistry, Laboratory of Medicinal Chemistry, Organic Synthesis and Molecular Modeling (LaQMedSOMM), Institute of Chemistry, São Paulo State University (Unesp), Professor Francisco Degni Street, 55, Jardim Quitandinha, Araraquara-SP, 14800-060, Brazil

**Abstract:** *Helicobacter pylori* and *Cryptococcus* spp. are pathogenic ureolytic microorganisms that cause several disorders in the host organism and, in severe cases, lead to death. Both infections have the urease enzyme as a key virulence factor since they use its ability to produce ammonia to soften the inhospitable pH to which they are subjected. In this review, we describe two ureases as possible molecular targets for drug discovery and provide insights for developing potent inhibitors against ureases from these pathogenic microorganisms through computer-aided drug discovery approaches, such as structure-based drug design (SBDD) and structure-activity relationship (SAR). The SAR studies have indicated several essential subunits and groups to be present in urease inhibitors that are critical for inhibitory activity against *H. pylori* or *Cryptococcus* spp. Since the three-dimensional structure of *C. neoformans* urease has yet to be determined experimentally, the plant urease of *Canavalia ensiformis* was used in this study due to its structural similarity. Therefore, in the SBDD context, FTMap and FTSite analyses were performed to reveal characteristics of the urease active sites in two protein data bank files (4H9M, *Canavalia ensiformis*, and 6ZJA, *H. pylori*). Finally, a docking-based analysis was performed to explore the best inhibitors described in the literature to understand the role of the ligand interactions with the key residues in complex ligand-urease stabilization, which can be applied in the design of novel bioactive compounds.

### ARTICLE HISTORY

Received: July 31, 2022  
Accepted: January 13, 2023

DOI:  
10.2174/1381612829666230329122902

**Keywords:** Drug discovery, urease inhibitors, structure-activity relationship, molecular docking, *Canavalia ensiformis*, ureolytic microorganisms, cryptococcosis, virulence factor.