

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Exatas

Programa de Pós-graduação em Química

LUCIANA PEREIRA SILVA VIANA

**ÁCIDOS CINAMOILIDROXÂMICOS COMO INIBIDORES DE UREASE:
síntese, avaliação da atividade inibitória e estudos sobre o mecanismo de inibição**

Belo Horizonte

2024

**ÁCIDOS CINAMOILIDROXÂMICOS COMO INIBIDORES DE UREASE:
síntese, avaliação da atividade inibitória e estudos sobre o mecanismo de inibição**

Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Ciências-Química.

Orientador: Prof. Cleiton Moreira da Silva

Coorientador: Prof. Ângelo de Fátima

Belo Horizonte

2024

Ficha Catalográfica

V614a Viana, Luciana Pereira Silva.
2024 Ácidos cinamoilidroxâmicos como inibidores de urease [manuscrito] : síntese,
T avaliação da atividade inibitória e estudos sobre o mecanismo de inibição / Luciana
Pereira Silva Viana. 2024.
186 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Cleiton Moreira da Silva.

Coorientador: Ângelo de Fátima.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de
Química.

Bibliografia: f. 123-135.

Anexos: f. 136-186.

1. Química orgânica – Teses. 2. Ácidos hidroxâmicos – Teses. 3. Urease –
Inibidores – Teses. 4. Agentes antiinfeciosos – Teses. 5. Helicobacter pylori – Teses.
6. Proteus (Bactéria) – Teses. 7. Cinética de enzimas – Teses. 8. Biofísica – Teses. 9.
Esterificação (Química) – Teses. 10. Ácidos carboxílicos – Teses. I. Silva, Cleiton
Moreira da, Orientador. II. Fátima, Ângelo de, Coorientador. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

UFMG
Programa de Pós-Graduação em Química
Departamento de Química - ICEX



"Ácidos Cinamoilidroxâmicos como Inibidores de Urease: Síntese, Avaliação da Atividade Inibitória e Estudos sobre o Mecanismo de Inibição"

Luciana Pereira Silva Viana

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Cleiton Moreira da Silva - Orientador
UFMG

Prof. Ângelo de Fátima - Coorientador
UFMG

Prof. Cláudio Viegas Júnior
UNIFAL

Prof. José Augusto Ferreira Perez Villar
UFSJ

Profa. Rosemeire Brondi Alves
UFMG

Profa. Amanda Silva de Miranda
UFMG

Belo Horizonte, 20 de março de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Cleiton Moreira da Silva**, Professor do Magistério Superior, em 22/03/2024, às 14:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Amanda Silva de Miranda**, Professora do Magistério Superior, em 22/03/2024, às 15:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudio Viegas Júnior, Usuário Externo**, em 22/03/2024, às 15:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Angelo de Fatima, Professor do Magistério Superior**, em 22/03/2024, às 15:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **José Augusto Ferreira Perez, Usuário Externo**, em 22/03/2024, às 16:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rosemeire Brondi Alves, Professora do Magistério Superior**, em 22/03/2024, às 17:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 3123765 e o código CRC 167F483A.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus pela Sua graça e cuidado em cada etapa desta jornada acadêmica.

À Universidade Federal de Minas Gerais, pela acolhida desde 2012, e ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Ao meu orientador, Cleiton Moreira, agradeço por todo o seu apoio, dedicação em ensinar e paciência ao longo desses anos. Ao meu coorientador, Ângelo de Fátima, agradeço pelos valiosos conselhos, incentivo e ensinamentos. Cleiton e Ângelo, sou imensamente grata pela significativa contribuição que vocês deixaram em minha vida profissional.

À professora Luzia Modolo, pelas orientações e auxílio nos experimentos de urease e ao professor Josué C. C. Santos, pela realização dos estudos de biofísica.

Aos membros da banca examinadora, agradeço a presença e disponibilidade, em especial às professoras Rose e Amanda pelas contribuições na avaliação do texto.

Aos integrantes do GEQOB, expresso minha gratidão pela amizade, boas conversas e apoio, em especial Giovanna, Bruno e Isabela, pelo auxílio na realização dos experimentos.

Ao meu marido pelo amor e paciência durante todos esses anos, e aos meus pais pelas orações e incentivo constantes.

Aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Os ácidos hidroxâmicos (AHs) compõem uma classe de compostos reconhecida pelas suas propriedades quelantes e capacidade de inibir importantes metaloenzimas contendo Ni(II) e Zn(II). Como inibidores de urease, os AHs foram descritos pela primeira vez por Kobashi *et al.* em 1962. Desde então, estudos mostrando sua potencial aplicação no tratamento de infecções causadas por microrganismos ureolíticos, como *Helicobacter pylori* e *Proteus mirabilis* têm sido relatados. Nesse contexto, o presente trabalho compreende o planejamento estrutural, síntese e avaliação da atividade inibidora de urease de uma série de híbridos moleculares de ácidos hidroxâmicos com aceptores de Michael. A hibridação molecular tem como objetivo maximizar os efeitos inibitórios, visto que aceptores de Michael também apresentam reconhecida atividade anti-ureolítica. Os compostos sintetizados mostraram-se potentes inibidores de urease com valores de CI_{50} entre 12,8-3,8 μ M, sendo observado que a atividade era proporcional à eletrofilia do carbono β . Estudos de cinética enzimática mostraram que os híbridos de ácido hidroxâmico e aceptor de Michael são inibidores mistos, enquanto a ausência do aceptor de Michael resulta em uma inibição competitiva. Os estudos biofísicos de interação sugerem que o ácido hidroxâmico interaja com o sítio ativo da enzima enquanto o aceptor de Michael se ligue a um sítio alostérico, um resíduo de cisteína próximo do centro catalítico.

Palavras-chave: ácidos hidroxâmicos α,β -insaturados; inibidor de urease; mecanismo de interação; *Helicobacter pylori*, aceptor de Michael.

ABSTRACT

Hydroxamic acids (HAs) constitute a class of compounds recognized for their chelating properties and ability to inhibit important metalloenzymes containing Ni(II) and Zn(II). As urease inhibitors, HAs were first described by Kobashi et al. in 1962. Since then, studies showing their potential application in the treatment of infections caused by ureolytic microorganisms, such as *Helicobacter pylori* and *Proteus mirabilis*, have been reported. In this context, the present work comprises the structural planning, synthesis, and evaluation of the urease inhibitory activity of a series of molecular hybrids of hydroxamic acids with Michael acceptors. Molecular hybridization aims to maximize inhibitory effects, as Michael acceptors also exhibit recognized anti-ureolytic activity. The synthesized compounds proved to be potent urease inhibitors with IC₅₀ values ranging from 12.8-3.8 μM, observing that activity was proportional to the electrophilicity of the β carbon. Enzyme kinetic studies showed that the hydroxamic acid-Michael acceptor hybrids are mixed-type inhibitors, while the absence of the Michael acceptor moiety results in competitive inhibition. Biophysical interaction studies suggest that the hydroxamic acid interacts with the enzyme's active site while the Michael acceptor binds to an allosteric site, a nearby cysteine residue near the catalytic center.

Keywords: α,β -unsaturated hydroxamic acids; urease inhibitor; interaction mechanism; *Helicobacter pylori*, Michael acceptor.

Title: Cinnamoyl hydroxamic acids as urease inhibitors: Synthesis, evaluation of inhibitory activity and studies on the inhibition mechanism

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografia de cristais de urease ampliados 728 vezes. _____	23
Figura 2. Modelos estruturais de urease de <i>K. aerogenes</i> e seus sítios ativos. A) PDB:1KAU. No PDB a estrutura 1KAU foi substituída por 1FWJ por estar obsoleta. B) PDB:2KAU C) PDB:1FWJ. D) Modelo estrutural da enzima de <i>K. aerogenes</i> . PDB: 1FWJ. (Adaptado de Mazzei, 2020) ²⁰ _____	27
Figura 3. Modelos estruturais de urease isolada de <i>S. pasteurii</i> . A) Sítio ativo da enzima nativa (PDB:2UBP. B) Enzima nativa de <i>S. pasteurii</i> (PDB: 2UBP). (Adaptado de Mazzei, 2020) ²⁰ _____	28
Figura 4. Estrutura do sítio ativo da urease _____	29
Figura 5. Representação do <i>flap</i> da urease nas conformações aberta e fechada. (Adaptado de Zambelli <i>et al.</i> , 2020.) ³⁰ _____	29
Figura 6. Conservação estrutural da urease. Heterotrímero, <i>Sporosarcina pasteurii</i> (PDB ID 2UBP), a heterodímero, <i>Helicobacter pylori</i> (PDB ID 1E9Z) e unidade simples, <i>Canavalia ensiformis</i> (PDB ID 3LA4). (Adaptado de Kappaun <i>et al.</i> , 2018) _____	31
Figura 7. Reconstrução digital de <i>H. pylori</i> ; (Extraída de Aruni <i>et al.</i> , 2011. ⁴⁷ _____	37
Figura 8. Representação da complexação dos hidroxamatos a um metal genérico M nos modos (A) monodentado e (B) bidentado _____	43
Figura 9. Estruturas do ácido acetoidroxâmico e do sítio ativo da urease inibido por AAH. CI ₅₀ determinado para urease proveniente de <i>Canavalia ensiformis</i> ⁶⁸ _____	44
Figura 10. Estrutura dos derivados hidroxâmicos mais ativos sintetizados por Kobashi <i>et al.</i> _____	45
Figura 11. Estruturas dos derivados heterocíclicos sintetizados e testados como inibidores de urease por Muri <i>et al.</i> ⁷⁵ _____	46
Figura 12. Estrutura geral dos derivados arilamino sintetizados por Liu <i>et al.</i> , na qual, n=1 ou 2 e R= H, halogênio, NO ₂ e OMe. ⁷⁶ _____	46
Figura 13. Estrutura do derivado mais ativo sintetizado por Ni <i>et al.</i> ⁷⁷ _____	47
Figura 14. Estrutura do derivado mais ativo sintetizado por Mamidala <i>et al.</i> ⁷⁸ _____	47
Figura 15. Estrutura do derivado mais ativo sintetizado por Song <i>et al.</i> ⁷⁹ _____	48
Figura 16. Compostos aprovados pelo FDA como inibidores de tirosina-quinases _____	49
Figura 17. Estruturas de aceptores de Michael inibidores de urease _____	51
Figura 18. Estrutura do sítio ativo da urease inibida por diamidofosfato _____	52

Figura 19. Estrutura de organofosforados utilizados como inibidores de urease _____	53
Figura 20. Estrutura do omeprazol (A) e do derivado sulfenamida ativo (B) _____	54
Figura 21. Derivados do monastrol sintetizados por Rashid <i>et al.</i> , nos quais o grupo X é oxigênio ou enxofre e os grupos R iguais a hidrogênio, grupos alquila, acetila, fenila ou benzila substituídos ⁹³ _____	55
Figura 22. Compostos sintetizados por Khan <i>et al.</i> , nos quais R ₁ = Me ou Et, R ₂ = H, OH, Me ou NO ₂ ⁹⁴ _____	55
Figura 23. Estrutura do derivado benzotiazólico com maior atividade inibidora de urease sintetizado por Araújo <i>et al.</i> ⁹⁶ _____	56
Figura 24. Estrutura geral dos compostos sintetizados por Taha <i>et al.</i> , na qual o grupo R é um grupo fenila substituído ⁹⁷ _____	56
Figura 25. Estrutura geral dos compostos sintetizados _____	59
Figura 26. Dimerização do ácido carboxílico via formação de ligações de hidrogênio ____	89
Figura 27. Espectro na região do infravermelho (ATR, 600-4000 cm ⁻¹) para o composto 2i	90
Figura 28. Espectro na região do infravermelho (ATR, 600-4000 cm ⁻¹) para o composto 3i	91
Figura 29. Espectro na região do infravermelho (ATR, 600-4000 cm ⁻¹) para o composto 4i	92
Figura 30. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) para o composto 2i _____	94
Figura 31. Espectros de RMN de ¹³ C (abaixo) e DEPT 135 (acima) para o composto 2i (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) _____	95
Figura 32. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) para o composto 3i _____	96
Figura 33. Espectros de RMN de ¹³ C (abaixo) e DEPT 135 (acima) para o composto 3i (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) _____	97
Figura 34. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) para o composto 4i _____	98
Figura 35. Espectros de RMN de ¹³ C (abaixo) e DEPT 135 (acima) para o composto 4i (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆). _____	98
Figura 36. Médias de inibição e desvio padrão para urease de <i>Canavalia ensiformis</i> na concentração de 20 μM dos compostos 4a-4i . Letras distintas no topo das barras indicam diferenças significativas (teste de Scott Knott; p < 0,05). AAH, ácido acetohidroxâmico _	100
Figura 37. Gráfico do tipo Michaelis-Menten para urease de <i>Canavalia ensiformis</i> nos ensaios com o composto 4i na presença e ausência de inibidor (<i>I-Free</i>). Concentrações de ureia entre 1-32 mM _____	103

- Figura 38.** Gráficos de Lineweaver-Burk para os compostos **4a**, **4e**, **4i** e **4k** na presença ou ausência (*I-Free*) de inibidor e em concentrações de ureia variando entre 1-32 mM _____ 105
- Figura 39.** Interação da urease com os ácidos hidroxâmicos **4a**, **4e**, **4i** e **4k**. A) Titulação fluorimétrica da urease com o derivado **4i**; B) Constante de ligação K_d da urease com os derivados **4a**, **4e**, **4i** e **4k**; C) Gráfico de Stern-Volmer para o **4i**-urease em função da concentração de **4i**; D) Constante de quenching da urease com os derivados **4a**, **4e**, **4i** e **4k** 107
- Figura 40.** Espectros de fluorescência tridimensional da urease livre 2 μ M (A), na presença de 10 μ M de **4i** (B) e 10 μ M de **4e** (C). Condições: tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, 30 °C _____ 111
- Figura 41.** Espectro de absorção no UV-vis para os três sistemas avaliados. A. **4e** (10 μ M), Cis (10 μ M) e complexo **4e** + Cis; B. **4i** (10 μ M), Cis (10 μ M) e complexo **4i** + Cis; C. **4e** (10 μ M), urease (10 μ M) e o complexo **4e** + urease; D. **4i** (10 μ M), urease (10 μ M) e o complexo **4i** + urease. Condições: tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, 30 °C _____ 114
- Figura 42.** Sinal analítico normalizado dos sistemas contendo cisteína (50 μ M, em cinza), MPA (50 μ M, em verde) ou urease (5 μ M, em amarelo), na presença de **4e** (gráficos indicados por A) ou **4i** (gráficos indicados por B) nas concentrações entre 0-50 μ M (Sistemas 1 a 6) e DTNB (50 μ M). Condições: tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, 30°C. Os valores foram representados como média \pm SD (n = 3). As colunas seguidas por diferentes letras são correspondentes a diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) _____ 115
- Figura 43.** Proposta mecanicista para a reação que provoca a inibição da urease pelos derivados do AA - **4e/4i**. A) A urease livre com flap fechado e sítio catalítico livre para hidrolisar ureia; B) presença dos derivados **4e** ou **4i**. na região do flap aberto para iniciar a reação com o resíduo de Cis; C) Produto formado entre os derivados **4e** ou **4i** e Cis592 e responsável pela redução da mobilidade do flap e bloqueio do sítio ativo _____ 117
- Figura 44.** Espectro de absorção no UV-vis para os três sistemas avaliados. A. **4e** - 10 μ M, Ni (II) - 10 μ M e o complexo (**4e** + Ni (II)); B. **4i** - 10 μ M, Ni (II) - 10 μ M e o complexo (**4i** + Ni (II)). Condições: tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, 30 °C _____ 118
- Figura 45.** Ensaios FRET para urease com os derivados ácidos cinamoilidroxâmicos **4e** (A) e **4i** (B). _____ 120

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reação de hidrólise da ureia _____	20
Esquema 2. Reação de decomposição da ureia _____	21
Esquema 3. Mecanismo catalítico proposto por Dixon <i>et al.</i> , sendo as moléculas de água representadas por W(1) e W(2). (Adaptado de Dixon <i>et al.</i> , 1980) ³³ _____	32
Esquema 4. Mecanismo proposto por Hausinger <i>et al.</i> . Moléculas de água representadas por W(1) (Adaptado de Jabri <i>et al.</i> , 1995) ¹⁷ _____	33
Esquema 5. Mecanismo aprimorado proposto por Hausinger <i>et al.</i> . (Adaptado de Karplus <i>et al.</i>) ³⁴ _____	34
Esquema 6. Mecanismo de hidrólise da urease proposto por Benini <i>et al.</i> . (Adaptado de Benini <i>et al.</i> , 1999) ³⁶ _____	36
Esquema 7. Representação das formas tautoméricas dos ácidos hidroxâmicos e seus estereoisômeros, no caso da forma enólica, e confôrmeros, no caso da forma ceto _____	43
Esquema 8. Mecanismo geral para ação de um inibidor covalente, no qual, K_i corresponde a constante de dissociação do complexo EI e k_2 e k_{-2} às constantes de velocidade _____	50
Esquema 9. Rota sintética dos compostos 4a-4k . i) Ácido malônico, piperidina, EtOH, 70 °C, MO, 45 min.; ii) CDI, NH ₂ OH.HCl, THF anidro, atmosfera inerte, temperatura ambiente, 48 h.; iii) TMSCl, MeOH, refluxo, 24 h.; iv) KOH, NH ₂ OH.HCl, MeOH, temperatura ambiente, 6-24 h.; v) RhCl(PPh ₃) ₃ , THF anidro e desgaiseficado, H ₂ 2 atm, 24 h.; vi) NaOH, H ₂ O, MeOH, temperatura ambiente, 24 h. * O composto 2d foi obtido de fontes comerciais. ____	60
Esquema 10. Reação de formação do indofenol a partir da reação entre amônia e fenol na presença de hipoclorito de sódio catalisada por nitroprussiato de sódio. _____	75
Esquema 11. Rota sintética dos compostos 4a-4k . i) Ácido malônico, piperidina, EtOH, 70°C, MO, 45 min.; ii) CDI, NH ₂ OH.HCl, THF anidro, atmosfera inerte, temperatura ambiente, 48 h.; iii) TMSCl, MeOH, refluxo, 24 h.; iv) KOH, NH ₂ OH.HCl, MeOH, temperatura ambiente, 6-24 h.; v) RhCl(PPh ₃) ₃ , THF anidro e desgaiseficado, H ₂ 2 atm, 24 h.; vi) NaOH, H ₂ O, MeOH, temperatura ambiente, 24 h. * O composto 2d foi obtido de fontes comerciais. _____	79
Esquema 12. Síntese dos ácidos cinâmicos 2a a 2j _____	79
Esquema 13. Mecanismo de formação dos ácidos cinâmicos 2a a 2j por condensação de Knoevenagel ¹²³ _____	80
Esquema 14. Síntese dos ésteres 3a a 3i _____	81

Esquema 15. Mecanismo de esterificação dos ácidos carboxílicos 2a a 2i em metanol e utilizando-se TMSCl para obtenção dos compostos 3a a 3i _____	81
Esquema 16. Síntese dos ácidos hidroxâmicos 4a a 4h _____	82
Esquema 17. Mecanismo de hidroxiamidação dos ésteres 3a a 3h para obtenção dos ácidos hidroxâmicos 4a a 4h _____	82
Esquema 18. Síntese dos ácidos hidroxâmicos 4i e 4j _____	83
Esquema 19. Mecanismo de formação dos <i>N</i> -acilimidazóis na etapa de ativação dos ácidos carboxílicos ¹²⁵⁻¹²⁷ _____	84
Esquema 20. Mecanismo de hidroxiamidação dos <i>N</i> -acilimidazóis para formação dos ácidos hidroxâmicos 4i e 4j ¹¹⁶ _____	85
Esquema 21. Rota sintética para obtenção do derivado 4k _____	85
Esquema 22. Ciclo catalítico de hidrogenação do éster 3i utilizando-se o catalisador de Wilkinson ¹²⁹ _____	87
Esquema 23. Mecanismo de hidrólise em meio básico do éster 3k _____	88
Esquema 24. Estruturas de ressonância para o ácido cinâmico 2i _____	94
Esquema 25. Estruturas de ressonância para os derivados nitrados _____	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimentos dos produtos de cada etapa de síntese e rendimentos globais para obtenção dos produtos 4a-4k _____	88
Tabela 2. Frequências de estiramento da ligação C=O dos ácidos cinâmicos, ésteres e ácidos hidroxâmicos sintetizados _____	93
Tabela 3. Deslocamentos químicos (δ) de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) e constantes de acoplamento (J) para H2 e H3 dos ácidos hidroxâmicos 4a a 4k _____	99
Tabela 4. Porcentagens médias de inibição na concentração de 20 μM e valores de CI_{50} dos ácidos cinamoilhidroxâmicos sintetizados para urease de <i>Canavalia ensiformis</i> _____	102
Tabela 5. Efeito dos ácidos hidroxâmicos na cinética de urease de <i>Canavalia ensiformis</i> _____	104
Tabela 6. Parâmetros de ligação e termodinâmicos entre os derivados do ácido hidroxâmico 4e e 4i e a urease de <i>Canavalia ensiformis</i> _____	110
Tabela 7. Parâmetros de fluorescência 3D para urease livre (2 μM) e na presença de 4e e 4i (10 μM) em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, 30 °C _____	112
Tabela 8. Parâmetros de ligação adquiridos no ensaio de fluorescência sincronizada para os derivados 4e e 4i _____	113
Tabela 9. Razão da constante de ligação dos compostos 4e e 4i com a urease na ausência (K_b) e na presença de inibidores competitivos clássicos (K_b') _____	118
Tabela 10. Parâmetros FRET para a urease na concentração de 10 μM utilizando os ligantes 4e e 4i na proporção 1:1, 1:2 e 1:4, enzima:composto _____	120

LISTA DE ABREVIATURAS

AHs – Ácidos hidroxâmicos

ATP – Adenosina trifosfato

ATR – Refletância total atenuada (do inglês, *Attenuated Total Reflectance*).

CCD – Cromatografia em cama delgada

CDI – *N,N*- carbonildimidazol

CI₅₀ – Concentração inibitória média

DEPT – Intensificação sem Distorção por Transferência de Polarização (do inglês, *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*)

DHPMs – Di-hidropirimidina

DMSO - Dimetilsulfóxido

DTNB - ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)

ESI – Ionização por eletrospray

FDA – do inglês, *Food and Drug Administration*

FRET – Transferência de Energia de Ressonância de Förster (do inglês, *Förster Resonance Energy Transfer*)

FT-IR – Infravermelho por Transformada de Fourier (do inglês, *Fourier Transform Infrared*)

HIV -Vírus da imunodeficiência humana (do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*)

HOMO – Orbital Ocupado de Maior Energia (do inglês, *Highest Occupied Molecular Orbital*)

HR-MS – Espectrometria de Massas de Alta Resolução (do inglês, *High Resolution Mass Spectrometry*)

HU – Hidroxiureia

IFA – Associação Internacional de Fertilizantes (do inglês, *International Fertilizer Association*)

IV - Infravermelho

K_b - Constante de ligação

K_{cat} – Contante de velocidade catalítica

K_d – Constante de dissociação

K_i – Constante de equilíbrio de dissociação enzima-inibidor

K_i' – Constante de equilíbrio de dissociação enzima-inibidor-substrato

K_M – Constante de Michaelis-Menten

K_q – Constante da taxa de extinção biomolecular

K_{sv} – Constante de *quenching*

LUMO – Orbital Molecular não-Ocupado de Menor Energia (do inglês, *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*)

MATP - ácido monoamidotiofosfórico.

MMQO – Método dos Mínimos Quadrados Ordinários

MPA - ácido 3-mercaptopropiônico

NBPT - *N*-(*n*-butil)-tiofosfórico triamida

NPPT - *N*-(*n*-propil)-tiofosfórico triamida

PDB – *Protein Data Bank*

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

THF - Tetraidrofurano

TIO - Tiourea

TMS - Tetrametilsilano

TMSCl – Cloreto de trimetilsilila

TNB - ácido 5-tio-2-nitrobenzóico

UV - Ultravioleta

V_0 – Velocidade inicial

$V_{máx}$ – Velocidade máxima

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. A enzima urease	20
1.1.1. Propriedades catalíticas	20
1.1.2. Propriedades não-catalíticas	21
1.1.3. História	22
1.1.4. Estrutura.....	24
1.1.4.1. O sítio ativo.....	24
1.1.4.2. O <i>flap</i> móvel	29
1.1.4.3. A estrutura da enzima	30
1.1.5. Mecanismo catalítico	31
1.2. Impactos da atividade ureolítica na medicina.....	36
1.2.1. Ureases como um fator de virulência microbiana	36
1.3. Impactos da atividade da urease na agricultura.....	40
1.4. Inibidores de urease.....	41
1.4.1. Ácidos hidroxâmicos	42
1.4.2. Aceptores de Michael	48
1.4.3. Organofosforados	51
1.4.4. Complexos metálicos.....	53
1.4.5. Compostos heterocíclicos	54
1.4.6. Outras classes de inibidores.....	56
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	58
2.1. Objetivos específicos	58
3. PLANO DE TRABALHO.....	59
4. EXPERIMENTAL.....	61
4.1. Técnicas de caracterização e análises	61
4.1.1. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	61
4.1.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	61
4.1.3. Infravermelho (IV).....	61

4.1.4. Faixas de fusão	61
4.1.5. Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HR-MS).....	61
4.1.6. Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN)	61
4.1.7. Titulação espectrofluorimétrica	62
4.1.8. Absorção molecular	62
4.2. Reagentes e solventes	62
4.3. Síntese	62
4.3.1. Procedimento geral de síntese dos compostos 2a-2j	62
4.3.1.1. Ácido cinâmico (2a)	63
4.3.1.2. Ácido (<i>E</i>)-3-(4-Fluorofenil)acrílico (2b)	63
4.3.1.3. Ácido (<i>E</i>)-3-(4-Clorofenil)acrílico (2c)	63
4.3.1.4. Ácido (<i>E</i>)-3-(4-Metoxifenil)acrílico (2e).....	64
4.3.1.5. Ácido (<i>E</i>)-3-(4-(Dimetilamino)fenil)acrílico (2f).....	64
4.3.1.6. Ácido (<i>E</i>)-3-(4-(Trifluorometil)fenil)acrílico (2g)	64
4.3.1.7. Ácido (<i>E</i>)-3-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-il)acrílico (2h).....	65
4.3.1.8. Ácido (<i>E</i>)-3-(4-Nitrofenil)acrílico (2i)	65
4.3.1.9. Ácido (<i>E</i>)-3-(3-Nitrofenil)acrílico (2j)	65
4.3.2. Procedimento geral de síntese dos compostos 3a-3i	66
4.3.2.1. Cinamato de metila (3a)	66
4.3.2.2. (<i>E</i>)-3-(4-Fluorofenil)acrilato de metila (3b).....	66
4.3.2.3. (<i>E</i>)-3-(4-Clorofenil)acrilato de metila (3c).....	67
4.3.2.4. (<i>E</i>)-3-(4-Bromofenil)acrilato de metila (3d)	67
4.3.2.5. (<i>E</i>)-3-(4-Metoxifenil)acrilato de metila (3e)	67
4.3.2.6. (<i>E</i>)-3-(4-(Dimetilamino)fenil)acrilato de metila (3f).....	68
4.3.2.7. (<i>E</i>)-3-(4-(Trifluorometil)fenil)acrilato de metila (3g)	68
4.3.2.8. (<i>E</i>)-3-(Benzo[d][1,3]dioxolo-5-il)acrilato de metila (3h).....	68
4.3.2.9. (<i>E</i>)-3-(4-Nitrofenil)acrilato de metila (3i)	69
4.3.3. Procedimento geral de síntese dos compostos 4a-4h	69
4.3.3.1. <i>N</i> -hidroxicinamida (4a)	69
4.3.3.2. (<i>E</i>)-3-(4-Fluorofenil)- <i>N</i> -hidroxiacrilamida (4b).....	70
4.3.3.3. (<i>E</i>)-3-(4-Clorofenil)- <i>N</i> -hidroxiacrilamida (4c).....	70
4.3.3.4. (<i>E</i>)-3-(4-Bromofenil)- <i>N</i> -hidroxiacrilamida (4d)	71
4.3.3.5. (<i>E</i>)-3-(4-Metoxifenil)- <i>N</i> -hidroxiacrilamida (4e).....	71

4.3.3.6. (E)-3-(4-(Dimetilamino)fenil)-N-hidroxiacrilamida (4f).....	71
4.3.3.7. (E)-3-(4-(Trifluorometil)fenil)-N-hidroxiacrilamida (4g)	72
4.3.3.8. (E)-3-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-hidroxiacrilamida (4h).....	72
4.3.4. Procedimento geral de síntese dos compostos 4i e 4j	73
4.3.4.1. (E)-3-(4-Nitrofenil)-N-hidroxiacrilamida (4i)	73
4.3.4.2. (E)-3-(3-Nitrofenil)-N-hidroxiacrilamida (4j)	73
4.3.5. Procedimento de síntese do 3-(4-nitrofenil)propanoato de metila (3k).....	74
4.3.6. Procedimento de síntese do ácido 3-(4-Nitrofenil)propanóico (2k).....	74
4.3.7. Procedimento de síntese de N-hidroxi-3-(4-Nitrofenil)propenamida (4k) .	75
4.4. Testes de atividade anti-ureolítica <i>in-vitro</i>	75
4.4.1. Análise estatística dos resultados de atividade anti-ureolítica <i>in-vitro</i>	76
4.5. Estudos de biofísica.....	77
4.5.1. Avaliação da interação urease-ligante usando UV-vis e fluorescência molecular	77
4.5.2. Estudo de competição com inibidores padrão	77
4.5.3. Avaliação do mecanismo baseado na resposta aos grupos tióis	77
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
5.1. Síntese	79
5.1.1. Síntese dos compostos 2a a 2j	79
5.1.2. Síntese dos compostos 3a a 3i	81
5.1.3. Síntese dos compostos 4a a 4h	82
5.1.4. Síntese dos compostos 4i e 4j	83
5.1.5. Síntese dos derivados hidrogenados 2k , 3k e 4k	85
5.2. Caracterização	88
5.2.1. Espectroscopia na região do infravermelho.....	89
5.2.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	93
5.3. Atividade anti-ureolítica	99
5.3.1. Determinação dos valores de concentração inibitória média (CI ₅₀)	99
5.3.2. Efeito dos ácidos hidroxâmicos nos parâmetros cinéticos de urease de <i>C.</i> <i>ensiformis</i>	102
5.4. Estudos de biofísica.....	105
5.4.1. Estudos de interação e parâmetros termodinâmicos	105

5.4.2. Avaliações de mudanças conformacionais na cadeia polipeptídica da urease	111
5.4.3. Avaliação da formação do complexo via UV-vis.....	113
5.4.4. Avaliação da interação dos ligantes 4e e 4i com sítio ativo da urease	117
5.4.5. Transferência de energia ressonante (FRET).....	119
6. CONCLUSÃO.....	122
REFERÊNCIAS.....	123
APÊNDICE.....	136

1. INTRODUÇÃO

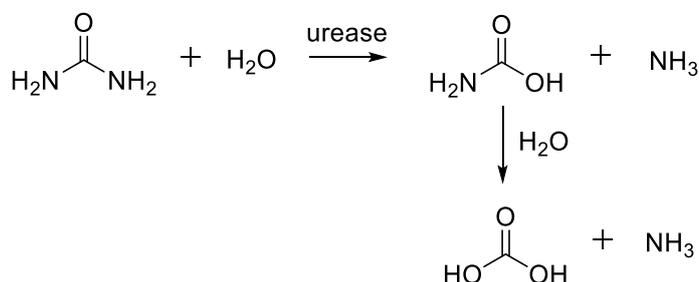
1.1. A enzima urease

As ureases (EC 3.3.1.5) são metaloenzimas de níquel do grupo das amido-hidrolases responsáveis pela hidrólise da molécula de ureia. Elas são produzidas por uma variedade de espécies de plantas, bactérias, fungos, algas e invertebrados, mas também podem estar presentes no solo imobilizadas em argila, como resultado da decomposição de plantas e células microbianas.¹ As ureases provenientes de plantas e bactérias têm sido as mais investigadas desde a descoberta da enzima, enquanto o seu papel em outros seres, como fungos e invertebrados, necessita de melhores esclarecimentos.²

Em seres vivos, a atividade catalítica da urease permite o fornecimento de nitrogênio ao organismo na forma de amônia. Todavia, são relatadas na literatura ureases que apresentam propriedades biológicas independentes da sua atividade catalítica, evidenciando um papel biológico muito mais amplo.³

1.1.1. Propriedades catalíticas

A urease é responsável pela hidrólise da molécula de ureia, produzindo amônia e ácido carbâmico, sendo este último produto decomposto, na presença de água, em outra molécula de amônia e ácido carbônico. As reações são mostradas no Esquema 1.¹



Esquema 1. Reação de hidrólise da ureia

Até o presente momento, a reação não-catalisada de hidrólise da ureia não foi observada devido sua energia de ressonância, estimada em 30-40 kcal/mol, que confere a esse composto alta estabilidade em solução aquosa.¹ A ausência de dados de velocidade para a reação não-

A descoberta das propriedades não-catalíticas da urease está intimamente ligada à descoberta da canatoxina como uma forma variante de urease. Em 1981, Carlini e colaboradores mostraram que o feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) possuía uma potente neurotoxina que era capaz de causar convulsões e morte em camundongos, chamada de canatoxina. Vinte anos depois, Follmer e colaboradores⁹ mostraram que essa neurotoxina era uma isoforma de urease, que apresentava um sítio ativo híbrido com um átomo de zinco e de níquel, ao invés de dois átomos de níquel. A atividade catalítica da canatoxina era apenas 30% da atividade hidrolítica da urease já descrita para essa espécie, diminuição que pode ser explicada por seu sítio ativo híbrido. Neste trabalho foram realizados ensaios de inibição enzimática com *p*-hidroximercurilbenzoato para a canatoxina e a urease nativa. Os resultados mostraram que mesmo após o sítio ureolítico estar bloqueado, a canatoxina mantinha-se letal para camundongos e ambos os tipos de ureases continuavam a promover agregação plaquetária e se ligavam a glicoconjugados. Esse trabalho mostrou que ureases podem ter outros domínios biologicamente ativos e não relacionados à atividade ureolítica. Então, concluiu-se que as ureases poderiam atuar como proteínas de defesa contra predadores, visto que ureases similares à canatoxina eram encontradas em outras espécies de plantas, principalmente na fase de maturação das sementes.⁹

Nos anos que se seguiram à descoberta da canatoxina como uma isoforma de urease, novos resultados tornaram evidente que o papel multifuncional desempenhado pelas ureases era comum a outras espécies. Observou-se que ureases microbianas contribuíam para a virulência de micro-organismos patogênicos por meio de mecanismos desvinculados da hidrólise. O exemplo mais notável entre essas descobertas foi relacionado à urease bacteriana proveniente de *Helicobacter pylori*, sobre a qual estudos mostram que a enzima contribui para o processo inflamatório comum às infecções gástricas.^{3,10,11}

1.1.3. História

Historicamente a urease faz parte de dois marcos importantes para a ciência. Ela foi a primeira enzima a ser isolada e cristalizada, mostrando que enzimas eram proteínas.¹² Ela também foi o primeiro exemplo descoberto de metaloenzima de níquel.^{13,14}

Em 1798 Fourcroy e Vauquelin descobriram que a amônia deriva da fermentação da urina. Em 1861 Pasteur mostrou que um organismo vivo realizava a fermentação alcalina da urina. Três anos depois, o primeiro micro-organismo capaz de realizar essa fermentação foi

isolado por van Tieghen e foi denominado *Micrococcus ureae*. Em 1874, Musculus obteve uma enzima proveniente da urina que observou ser capaz de decompor ureia em solução aquosa. Em 1890, Miquel descreveu mais de 30 micro-organismos capazes de decompor ureia e sugeriu que a enzima comum entre eles recebesse o nome urease. Em 1909 Takeuchi descobriu a presença da urease em soja, uma fonte abundante da enzima, atraindo atenção para seu estudo.¹⁵

Em 1926, James B. Sumner¹² isolou e cristalizou a urease de *Canavalia ensiformis*, uma planta tropical conhecida popularmente como feijão-de-porco. Foram nove anos de estudo até Sumner obter cristais nítidos, sem cor e octaédricos, mostrados na Figura 1, extraída de seu artigo.¹²

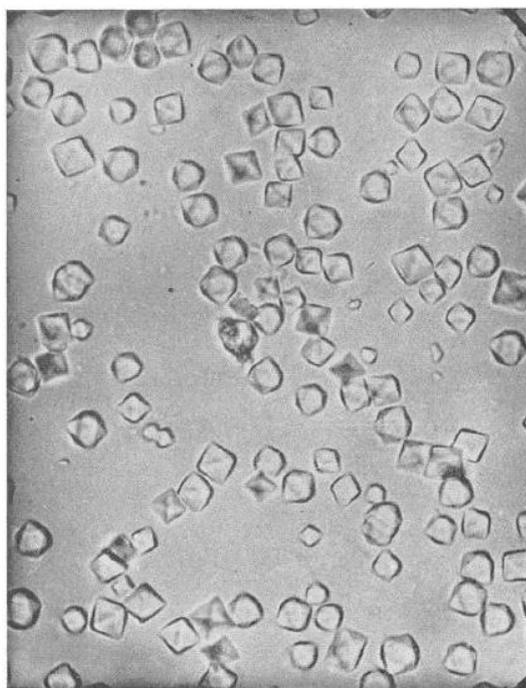


Figura 1. Fotomicrografia de cristais de urease amplificados 728 vezes.
(Extraído de Sumner, 1926)

Sumner foi agraciado com o prêmio Nobel de Química em 1946¹⁶, pela sua descoberta de que enzimas podiam ser cristalizadas. Ele dividiu o prêmio com outros dois cientistas, John H. Northrop e Wendell M. Stanley, premiados pela sua preparação de proteínas e enzimas de vírus em pura forma.¹⁶

Em 1975, a urease participou de outra grande descoberta. Dixon *et al.*,¹³ realizando estudos da interação de β -mercaptoetanol com urease de feijão-de-porco, observaram que esta interação resultava em mudanças no espectro de absorção eletrônica, indicando a presença de

átomos de níquel fortemente ligados. Desse modo, Dixon *et al.* mostraram pela primeira vez a presença de íons níquel no sítio ativo de uma enzima, que eram essenciais para sua atividade enzimática. Sendo assim, a urease se tornou a primeira metaloenzima de níquel descoberta.^{13,14}

Em 1995 o sítio ativo da urease de *Klebsiella areogenes* foi descrito pela primeira vez por Hausinger *et al.*¹⁷ e, três anos depois, Benini *et al.* realizaram a caracterização de um complexo de urease de *Bacillus pasteurii* com β -mercaptoetanol.¹⁸ Apenas em 2010, a estrutura da urease de *Canavalia ensiformis*, a mesma cristalizada por Sumner, foi relatada.¹⁹ Desde a descoberta da estrutura do sítio ativo em 1995, pesquisadores têm empregado esforços para caracterização de ureases de outras espécies revelando semelhanças na cadeia polipeptídica e nos sítios ativos entre ureases de diferentes espécies.

1.1.4. Estrutura

1.1.4.1. O sítio ativo

Após a cristalização da urease por Sumner¹², vários estudos foram conduzidos com o intuito de compreender melhor as propriedades da enzima. Entretanto, por quase 50 anos não surgiram resultados significativos sobre sua estrutura e mecanismo catalítico.²⁰ Em 1975, o trabalho pioneiro de Dixon *et al.* apresentou à comunidade científica as primeiras informações sobre o sítio catalítico da urease, mostrando que os dois átomos de níquel presentes em cada subunidade da urease de *Canavalia ensiformis* eram fundamentais para a atividade catalítica.^{13,14}

Nos 15 anos que se seguiram essa descoberta, tentativas foram feitas com o objetivo de explicar o mecanismo catalítico baseando-se em dados espectroscópicos e cinéticos.²⁰ No início da década de 80, Dixon *et al.* foram os primeiros a publicar estudos espectroscópicos de absorção na região do ultravioleta visível para urease de feijão-de-porco, indicando a presença de íons Ni(II) hexacoordenados em geometria pseudo-octaédrica no seu sítio ativo.²¹

Inspirados nos resultados de Dixon *et al.*, Hasnain *et al.*^{22,23} realizaram experimentos de espectroscopia de absorção de raios-X para urease de feijão-de-porco com o objetivo de caracterizar a estrutura presente ao redor dos íons níquel. Os resultados foram interpretados sugerindo a presença de íons Ni(II) em geometria pseudo-octaédrica coordenados a três átomos

de nitrogênio de resíduos de histidina a 2,04 Å de distância, dois oxigênios a 2,07 Å e um oxigênio a 2,25 Å.^{22,23}

No final na década de 80, Clark *et al.*²⁴ realizaram experimentos de suscetibilidade magnética e espectroscopia de absorção de raios-X utilizando urease de feijão-de-porco nativa e inibida por β -mercaptoetanol. Os resultados obtidos para urease nativa mostraram que o sítio ativo possuía um cluster metálico contendo íons Ni(II) coordenados octaedricamente e que, quando inibido por β -mercaptoetanol, essa ligação ocorria via substituição na esfera de coordenação do níquel.²⁴ Esses resultados comprovaram a hipótese de dois átomos de níquel espacialmente próximos. Baseando-se em estudos de absorção de raios-X, Clark *et al.* elaboraram um modelo no qual íons níquel são ligados a seis ou cinco ligantes doadores de elétrons (nitrogênio ou oxigênio) a uma distância média de 2,06 Å com geometria octaédrica distorcida.²⁵ Todavia, em 1993, Day *et al.* realizaram estudos de saturação magnética para ureases nativas de *Canavalia ensiformis* e *Kleisiella aerogenes*, mostrando que não havia evidências de troca de acoplamento entre os íons níquel no sítio ativo²⁶, contrariando os resultados obtidos por Clark *et al.*²⁴

Em 1994, Wang *et al.*²⁷ publicaram novos estudos de espectroscopia de absorção de raios-X para urease de *Canavalia ensiformis* e *Kleisiella aerogenes* nativas e na presença de β -mercaptoetanol. Os resultados indicaram que o centro ativo era formado por dois íons Ni(II) pentacoordenados separados por 3,26 Å de distância. O ambiente de coordenação da urease nativa era formado por Ni(imidazol)_x(N/O)_{5-x}, onde x = 2 ou 3, mas, na presença de β -mercaptoetanol, um dos ligantes não-imidazólicos é substituído por um átomo de enxofre em ponte.²⁷ Dois anos depois da publicação desses resultados, Benini *et al.* publicaram seus resultados de espectroscopia de absorção de raios-X para a urease de *Sporasarcina pasteurii*, os quais indicavam a presença de íons Ni(II) hexacoordenados com esfera de coordenação formada por seis ligantes N/O, sendo dois deles histidinas, a uma distância média de 2,03 Å.²⁸ Essas informações preliminares foram complementadas por estudos cinéticos que mostraram que resíduos de cisteína e histidina no centro ativo eram fundamentais para a atividade catalítica.²⁰

Em 1995 o conhecimento estrutural da urease deu um salto, quando Hausinger *et al.*¹⁷ publicaram ineditamente duas estruturas de raios-X para urease de *Kleisiella aerogenes* registradas no *Protein Data Bank* (PDB) como 1KAU e 2KAU (Figura 2). Nas estruturas foram identificados três sítios ativos, nos quais, dois átomos de níquel, classificados como Ni(1) e

Ni(2), estavam separados por uma distância de 3,5 Å e unidos em ponte por uma lisina carbamilada. Neste artigo, os autores identificaram que Ni(1) encontrava-se coordenado a três ligantes e Ni(2) encontrava-se tetracoordenado em 2KAU, mas em 1KAU estava coordenado também à uma molécula de água, assumindo uma geometria bipiramidal distorcida.¹⁷ Apesar de não constar nas estruturas depositadas no PDB, os autores afirmaram posteriormente que Ni(1) poderia estar também coordenado fracamente a uma molécula de água, assumindo uma geometria pseudo-tetraédrica. Eles também sugeriram que a molécula de água ligada a Ni(2) pudesse assumir outras posições, como em ponte com os dois átomos de níquel ou ligada a Ni(1).^{17,20}

Apesar da importância do trabalho de Hausinger *et al.* para elucidação do sítio ativo, as geometrias de coordenação relatadas para os íons níquel eram inconsistentes com resultados prévios, inclusive publicados pelo próprio grupo de pesquisa.²⁷ Por essa razão, em 1997 Hausinger *et al.* publicaram um estudo no qual parte dessas inconsistências foram solucionadas e uma nova estrutura cristalina foi disponibilizada (Código PDB 1FWJ).²⁹ Os resultados obtidos desse trabalho mostram a presença de três moléculas de água na esfera de coordenação dos íons níquel, uma delas coordenada em ponte aos dois íons metálicos e as outras duas coordenadas a cada íon níquel separadamente (Figura 2). Nessa interpretação dos dados, o íon Ni(1) estaria pentacoordenado assumindo uma geometria pirâmide de base quadrada distorcida e o íon Ni(2) estaria hexacoordenado (Figura 2C) em geometria pseudo-octaédrica. Apesar desses resultados serem mais compatíveis com os obtidos previamente, os autores afirmaram que o grande volume ocupado pelas moléculas de água no interior do sítio ativo indicava que talvez ele só pudesse ser ocupado parcialmente e que essa interpretação ainda não era completa.²⁹

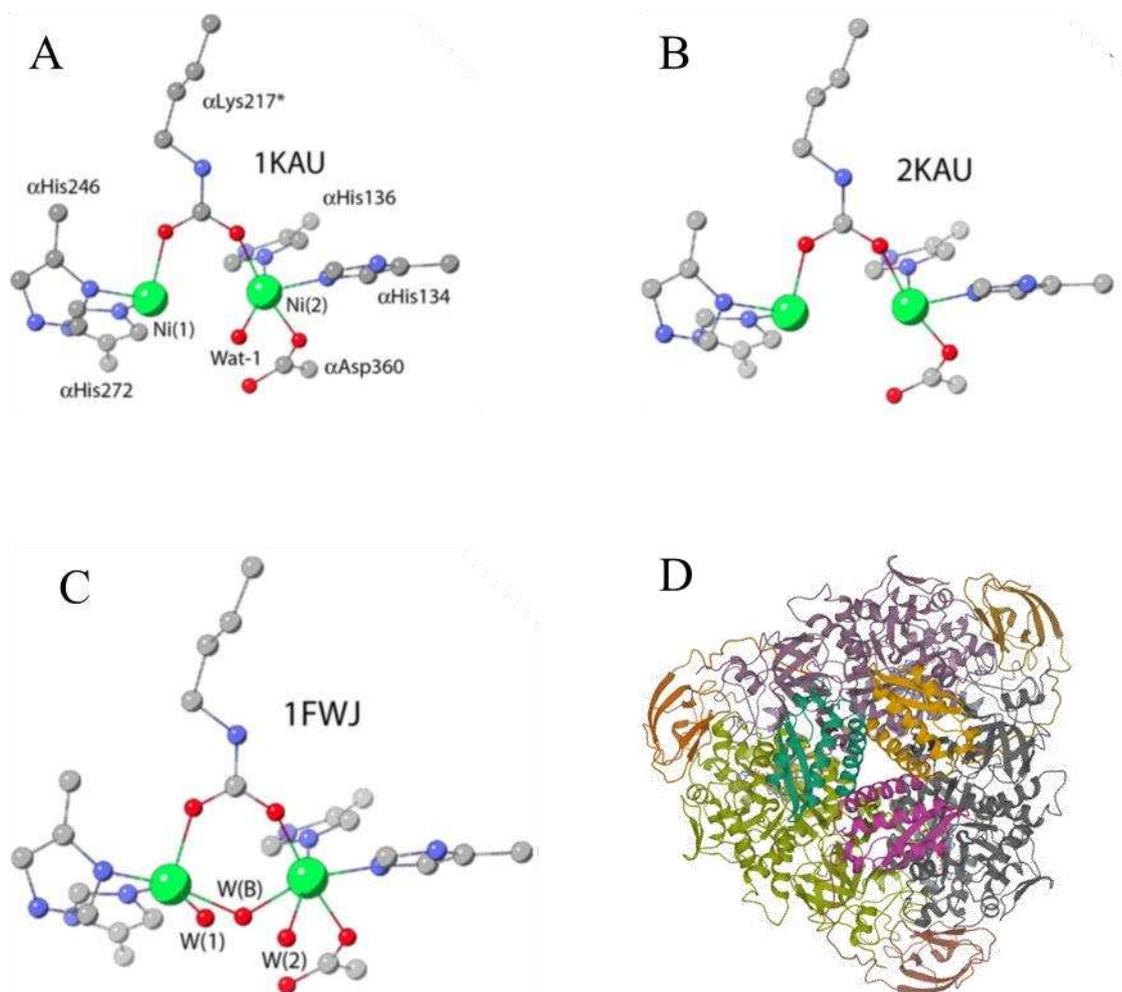


Figura 2. Modelos estruturais de urease de *K. aerogenes* e seus sítios ativos. **A)** PDB:1KAU. No PDB a estrutura 1KAU foi substituída por 1FWJ por estar obsoleta. **B)** PDB:2KAU **C)** PDB:1FWJ. **D)** Modelo estrutural da enzima de *K. aerogenes*. PDB: 1FWJ. (Adaptado de Mazzei, 2020)²⁰

Dois anos após a caracterização da urease de *Klebsiella aerogenes*, a caracterização da urease de *Sporosarcina pasteurii* foi realizada por Benini *et al.* e registrada no PDB com o código de 2UBP (Figura 3).¹⁸ Os resultados de caracterização obtidos foram muito similares aos obtidos por Hausinger *et al.*,²⁹ mostrando que os dois íons níquel são separados por 3,7 Å de distância, ligados em ponte por uma lisina carbamilada e cada íon é coordenado por duas histidinas, sendo Ni(2) também coordenado a um aspartato. Todavia, nesse trabalho, o ambiente de hidratação do sítio ativo foi descrito como formado por quatro moléculas de água, W(1), W(2), W(3) e W(B). Desse modo, o íon Ni(1) encontra-se ligado a W(1) e Ni(2) a W(2). A molécula de água W(B) encontra-se desprotonada e forma uma ponte ligando-se aos dois íons níquel. W(3) está em uma posição distal a uma ligação de hidrogênio de distância das demais moléculas de água. Nesse estudo os autores mostraram uma explicação para as moléculas de

água ocuparem espaços tão próximos no sítio ativo (distância O-O na faixa de 2,1-2,4 Å). As moléculas de água assumiriam um arranjo pseudo-tetraédrico com um próton localizado no centro, formando uma rede de ligações de hidrogênio. Os resíduos de aminoácidos também favoreceriam a interação ao agirem como doadores/receptores da ligação de H.¹⁸

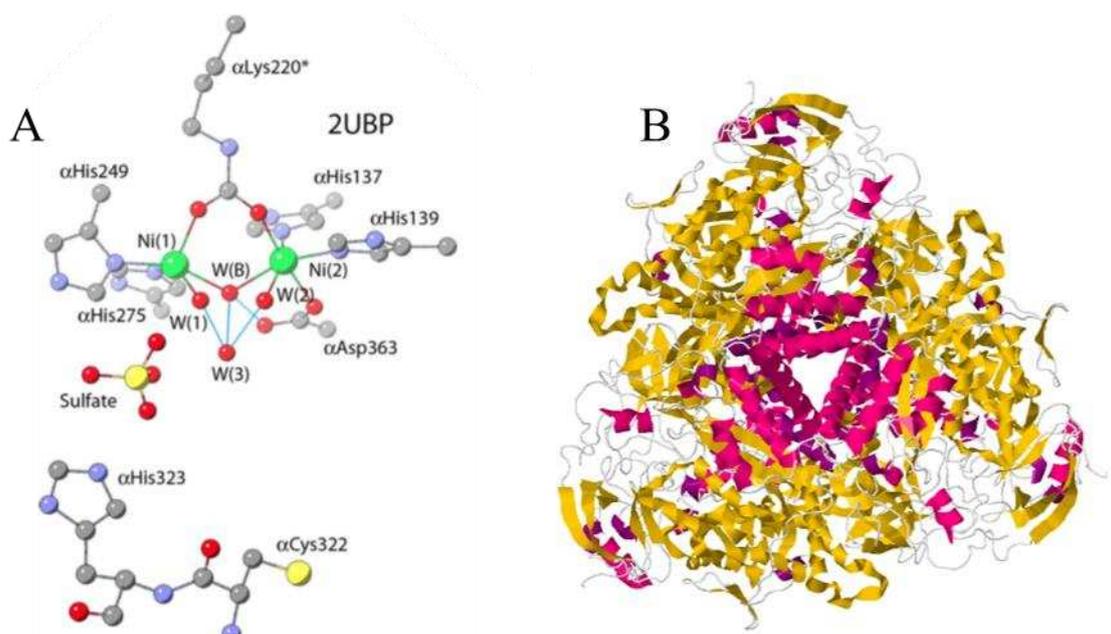


Figura 3. Modelos estruturais de urease isolada de *S. pasteurii*. **A)** Sítio ativo da enzima nativa (PDB:2UBP. **B)** Enzima nativa de *S. pasteurii* (PDB: 2UBP). (Adaptado de Mazzei, 2020)²⁰

Nos anos que se seguiram à publicação de Benini *et al.*¹⁸ muitas outras caracterizações foram publicadas alcançando-se uma boa compreensão atual sobre a estrutura do sítio ativo (Figura 4). O sítio ativo é formado por dois íons níquel (II) conectados entre si por uma lisina carbamilada e um íon hidróxido. A distância entre os átomos de níquel é de 3,5 Å, sendo cada íon níquel coordenado por duas histidinas e uma molécula de água. Um dos átomos de níquel se coordena também a um resíduo de aspartato, desse modo, um dos íons níquel é hexacoordenado Ni(2) e outro pentacoordenado Ni(1).³

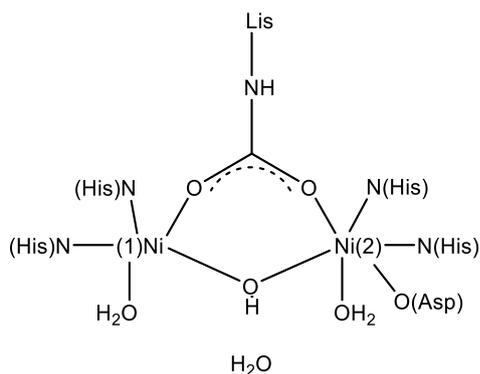


Figura 4. Estrutura do sítio ativo da urease

1.1.4.2. O *flap* móvel

As primeiras estruturas de raios-X obtidas para urease mostraram que o sítio ativo da enzima era bem contraído em torno dos átomos de níquel, sendo coberto por um *flap* flexível (Figura 5) que, ao se mover, permite a entrada do substrato e saída dos produtos. O *flap* é formado por 30 resíduos de aminoácido e compreende 3 regiões: duas hélices α e entre elas uma volta flexível. Na ponta da região móvel apresenta-se um resíduo de histidina conservado (His323), entre as duas hélices.²⁰

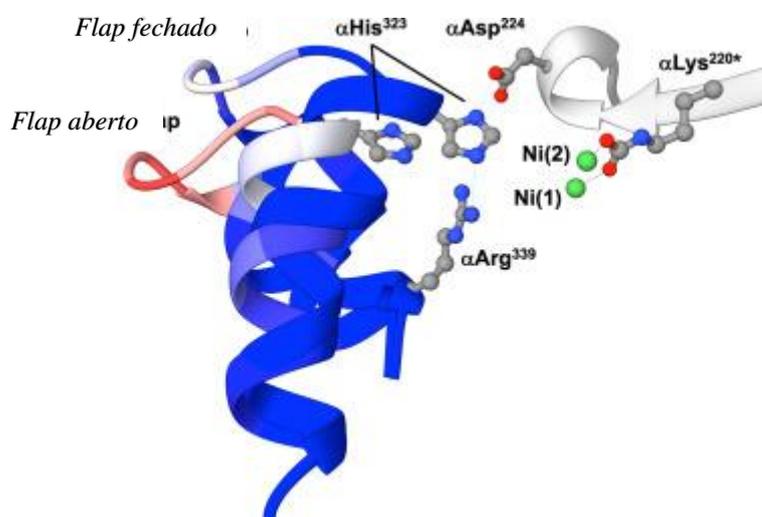


Figura 5. Representação do flap da urease nas conformações aberta e fechada. (Adaptado de Zambelli et al., 2020.)³⁰

A estabilidade do *flap* em conformação aberta ou fechada depende fundamentalmente do estado de protonação do resíduo de histidina e, portanto, é dependente do pH. Em valores de pH maiores que o pKa da histidina (pKa da histidina em urease de *Sporosarcina Pasteuri* é 6,6) o anel imidazólico forma duas ligações de hidrogênio com os resíduos de aspartato e

arginina. Devido a sua natureza química, o resíduo de arginina irá atuar como um doador de ligação de hidrogênio, enquanto o resíduo de aspartato será um acceptor, sugerindo que o nitrogênio do anel imidazólico encontra-se protonado para formar a ligação. Ao formar essas ligações, o resíduo de histidina se insere na abertura do sítio ativo, aproximando-se dos átomos de níquel e mantendo o *flap* fechado. À medida que o pH se torna menor que o pKa da histidina, ambos nitrogênios do anel imidazólico serão protonados, fazendo com que a molécula adquira uma carga positiva e não possa se inserir entre os resíduos de aspartato e arginina devido a repulsões eletrostáticas. Desse modo, a conformação aberta do *flap* se torna a mais favorável.³¹ Nessa perspectiva, o trio de resíduos de aminoácidos Asp-His-Arg funciona como um sistema de chave-fechadura de três membros, no qual a protonação da histidina dita o movimento do *flap* em relação ao centro ativo.²⁰

Além dos resíduos Asp-His-Arg, estudos mostram que o *flap* contém um resíduo de cisteína que auxiliam na sua mudança de conformação e no controle de acesso ao sítio ativo, sendo demonstrado que modificações químicas em resíduos de cisteína prejudicam a atividade ureolítica.³² Estudos estruturais e funcionais mostram que existe uma forte correlação entre a eficiência catalítica da enzima e a sua existência em pelo menos duas conformações diferentes do *flap*, aberto ou fechado. Observa-se que a mudança estrutural é fundamental para a estabilização do substrato ou do estado de transição formado após o ataque nucleofílico do íon hidróxido à ureia, visto que os resíduos de aminoácidos do *flap* se ligam ao substrato via de ligações de hidrogênio.

1.1.4.3. A estrutura da enzima

Atualmente, estruturas de ureases de diversas espécies têm sido bem elucidadas não só em relação aos sítios ativos, mas também em suas estruturas terciárias e quaternárias. Apesar de se encontrarem presentes em espécies de diferentes reinos, as ureases de diferentes fontes compartilham 55% de similaridade em sua estrutura primária. As cadeias polipeptídicas se organizam formando estruturas chamadas de monômeros ou unidades funcionais. O número de cadeias polipeptídicas que se agrupam para formar a unidade funcional varia de acordo com a espécie, plantas e fungos irão apresentar uma unidade funcional formada por uma única cadeia polipeptídica, chamada α . As ureases bacterianas são formadas por duas (α e β) ou três cadeias polipeptídicas (α , β e γ).³ Os monômeros formados interagem formando estruturas mais complexas, constituindo a estrutura quaternária da enzima, como ilustrado na Figura 6. É

importante notar que as unidades α apresentam massa entre 60-76 kDa, enquanto as unidades β e γ são menores, com massas entre 8-21 kDa e 6-14 kDa, respectivamente. Algumas ureases bacterianas apresentam subunidades β excepcionalmente maiores, formadas pela fusão da subunidade β original e a subunidade γ , como a urease de *Helicobacter pylori*, formada por quatro trimeros $(\alpha\beta)_3$. O sítio ativo sempre se localiza nas unidades α para as ureases conhecidas até o presente momento.¹

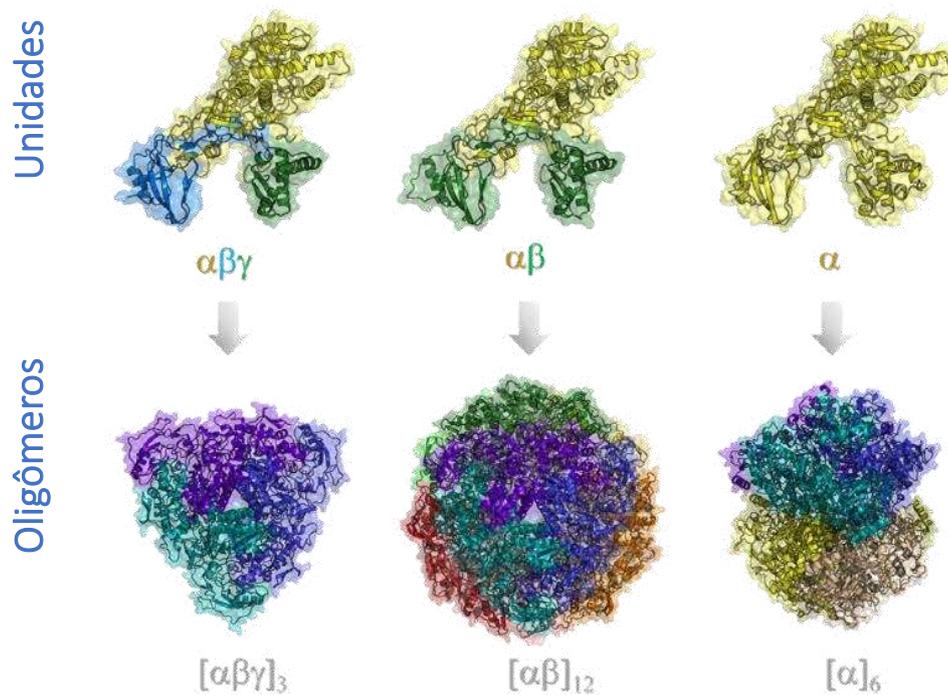
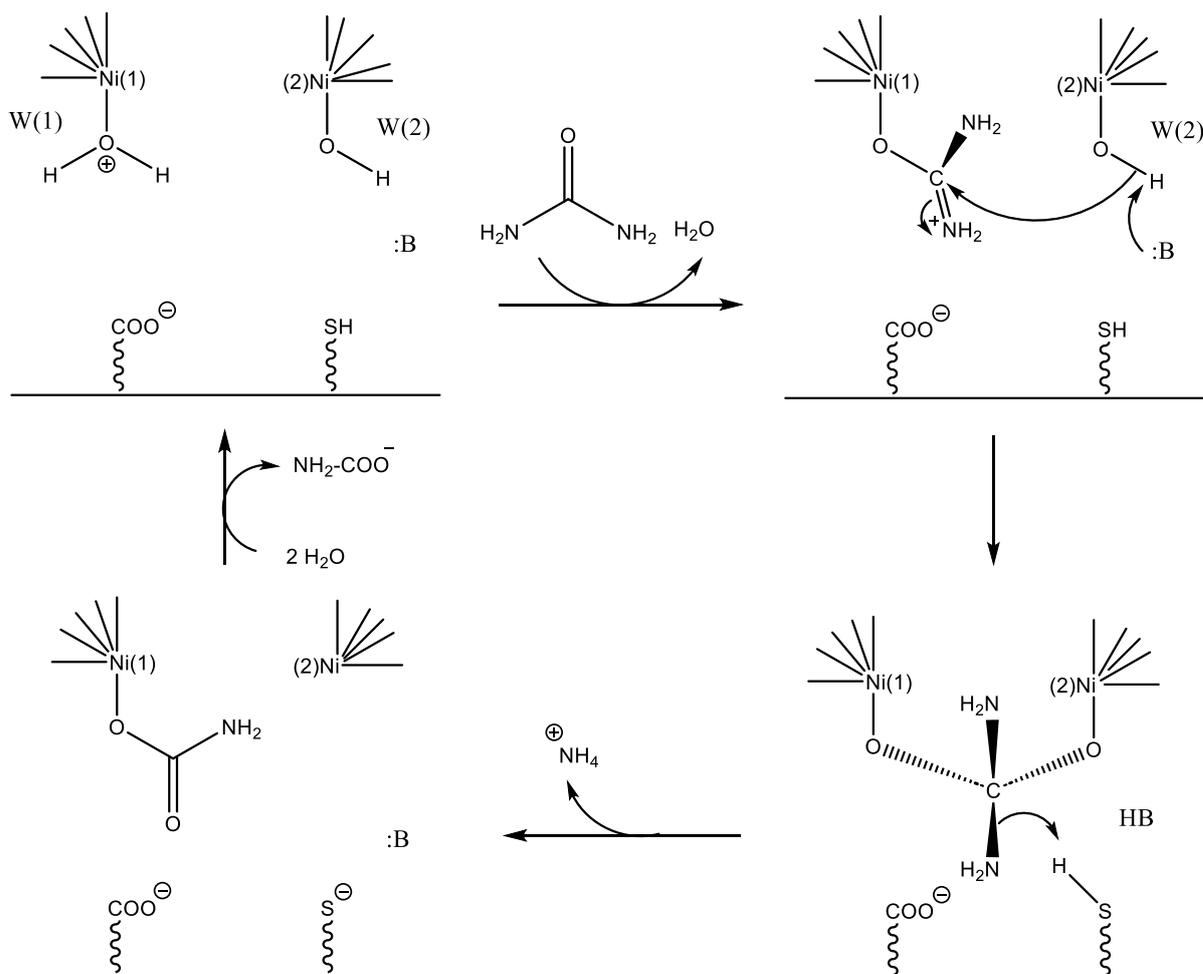


Figura 6. Conservação estrutural da urease. Heterotrímero, *Sporosarcina pasteurii* (PDB ID 2UBP), a heterodímero, *Helicobacter pylori* (PDB ID 1E9Z) e unidade simples, *Canavalia ensiformis* (PDB ID 3LA4). (Adaptado de Kappaun et al.,2018)

1.1.5. Mecanismo catalítico

Em 1980, após a descoberta da presença de níquel no sítio ativo da enzima por Dixon, Blakeley e Zerner, esses pesquisadores propuseram mecanismos catalíticos baseados na reatividade da enzima frente a diferentes substratos. No mecanismo proposto por eles (Esquema 3) um dos átomos de níquel, Ni(1), seria coordenado por uma molécula de água e o outro, Ni(2), por um íon hidróxido. A primeira etapa desse mecanismo ocorreria com a substituição da molécula de água pela ureia, que se liga ao Ni(1) por meio do oxigênio carbonílico. Em seguida, a ureia seria estabilizada através da interação entre os grupos amino e carboxilato dos resíduos de aspartato e glutamato. A próxima etapa do mecanismo seria o ataque nucleofílico do íon

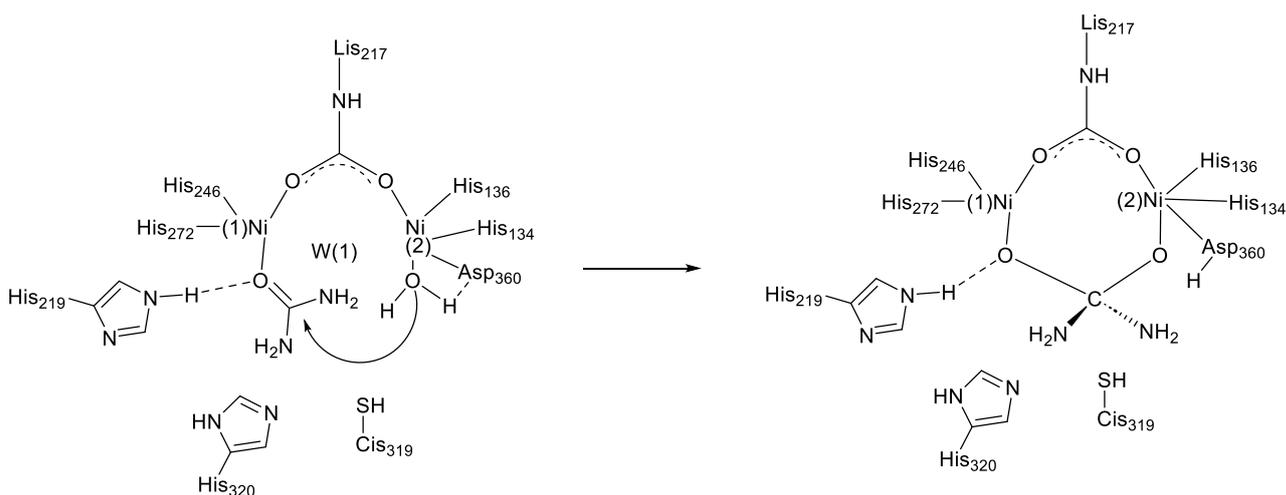
hidróxido ao carbono carbonílico, formando um intermediário tetraédrico. Esse intermediário rapidamente colapsaria formando cátion amônio e carbamato, sendo que o último continuaria coordenado ao Ni(1) via oxigênio. A formação do cátion amônio seria favorecida pelo grupo sulfidril de cisteína (Cis319) presente no sítio ativo, que age como catalisador ácido. No último estágio, a enzima é regenerada com a reentrada das moléculas de água e com a liberação de carbamato.³³



Esquema 3. Mecanismo catalítico proposto por Dixon et al, sendo as moléculas de água representadas por W(1) e W(2). (Adaptado de Dixon et al., 1980)³³

Em 1995, Hausinger *et al.*, baseando-se nas informações obtidas na caracterização inédita da urease de *Kleisiella aerogenes*, propuseram um mecanismo catalítico (Esquema 4). Na primeira etapa dessa nova proposta, o oxigênio carbonílico da ureia se coordena ao átomo de níquel de menor número de coordenação, Ni(1), levando Ni(1) a assumir uma geometria tetra-coordenada. Essa ligação seria favorecida pela His219 que atua como doadora de ligação de hidrogênio. Na segunda etapa, uma molécula de água ligada ao Ni(2), na forma de íon

hidróxido, ataca o carbono carbonílico, que encontra-se mais polarizado devido a interação Ni(1)-O. Forma-se então um intermediário tetraédrico que se decompõe após o grupo amino ser protonado por um grupo ácido genérico não identificado.¹⁷ Em trabalhos anteriores o mesmo grupo de pesquisa propôs que os resíduos de Cis319 e His320 atuariam, respectivamente, como ácido na protonação do grupo amino da ureia e como base na geração do hidróxido como nucleófilo.²⁰ Todavia, os novos resultados mostraram que esses resíduos se encontravam espacialmente distantes para desempenharem essas funções. Por essa razão, no novo mecanismo proposto por Hausinger *et al.* eles consideram que o papel fundamental da Cis319 seria assistir na correta orientação da His320 por meio de efeitos estéricos. Desse modo, o sítio ativo permaneceria na conformação correta para catálise. Os autores também concluíram que a função ácida seria realizada por um ácido genérico ainda não definido e a função básica poderia ser realizada pelo átomo de oxigênio do aspartato ligado ao Ni(2).¹⁷



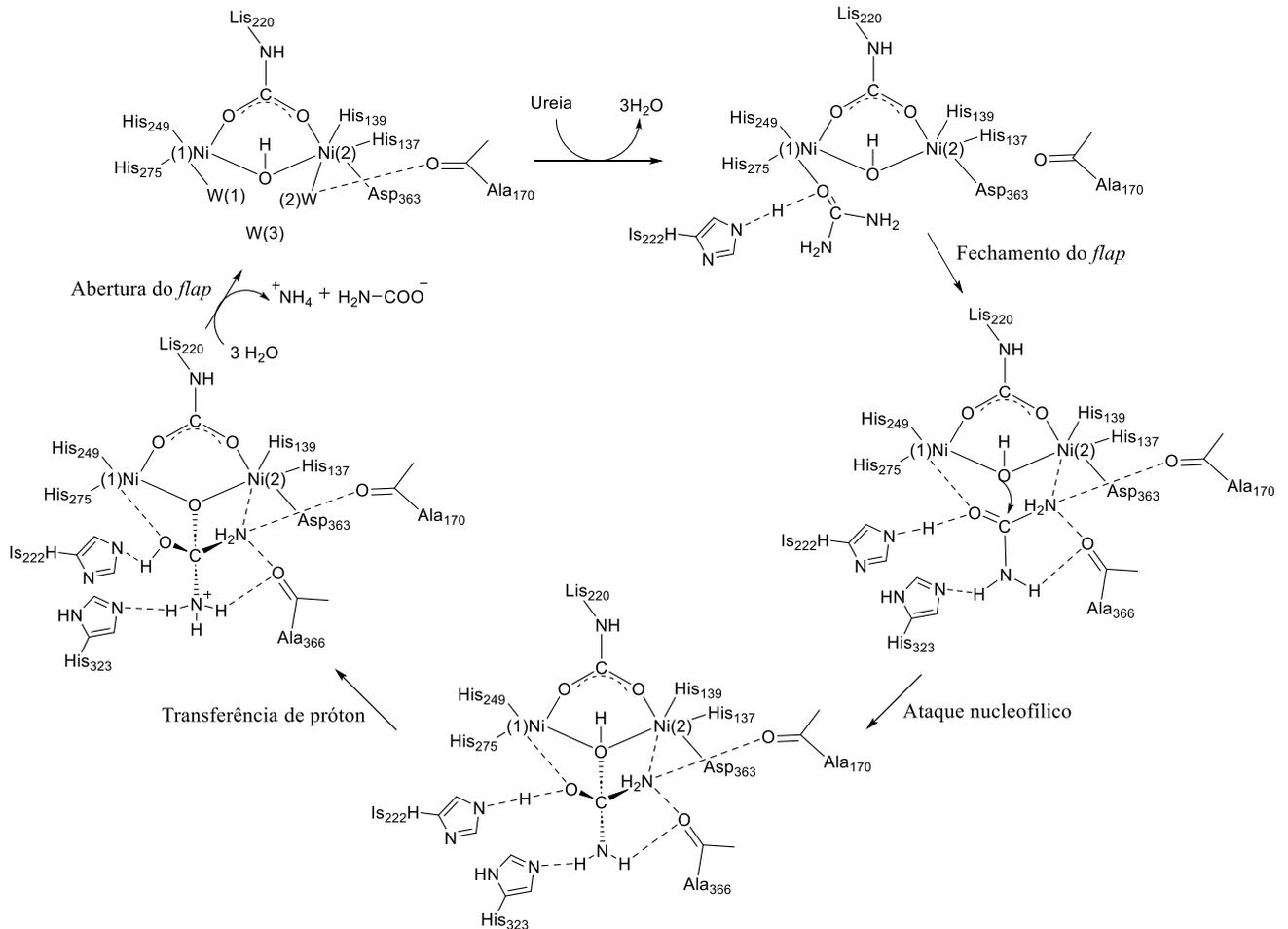
Esquema 4. Mecanismo proposto por Hausinger *et al.* Moléculas de água representadas por W(1) (Adaptado de Jabri *et al.*, 1995)¹⁷

Em 1997, com as novas informações estruturais obtidas que mostravam a presença das três moléculas de água no sítio ativo,²⁹ Hausinger *et al.* propuseram um mecanismo aprimorado (Esquema 5). Nessa proposta a interação do oxigênio carbonílico com Ni(1) seria estabilizada pela His219, mas também por ligações de hidrogênio adicionais dos hidrogênios do grupo amino com Gli227, Ala363, Ala167 e Cis319. A segunda etapa permaneceria semelhante ao anteriormente proposto, ocorrendo a formação do intermediário tetraédrico que colapsa para formar carbamato e amônia. Todavia, no novo modelo, a protonação do nitrogênio do grupo amida seria realizada pelo grupo imidazol do resíduo His320. A atribuição da His320 como um sítio ácido representou uma contradição para resultados do próprio grupo, pois, no pH ótimo

mecanismo, o sítio ativo é assimétrico, apresentando próximo ao Ni(1) resíduos de aminoácidos doadores de ligações de hidrogênio e próximo ao Ni(2) resíduos posicionados como aceptores. Quando o *flap* encontra-se em conformação aberta, o substrato adentra o sítio ativo e substitui as moléculas de água W(1), W(2) e W(3), orientando-se de forma específica devido às ligações de hidrogênio formadas. A formação dessa rede estabilizadora de ligações de hidrogênio irá favorecer a ligação do oxigênio carbonílico da ureia ao íon níquel mais eletrofílico, Ni(1). A formação da ligação Ni(1)-O conduz o grupo NH₂ a aproximar-se de Ni(2), levando à formação de uma nova ligação Ni(2)-N. Esse modo de ligação bidentado entre íons níquel e ureia é estabilizado principalmente pelos resíduos de Ala170 e Ala366, que interagem via ligação de hidrogênio com o NH₂, e pelo resíduo de His222, que interage com o oxigênio carbonílico também via ligação de hidrogênio.³⁵⁻³⁷

As interações descritas irão causar a polarização das ligações C-N e C-O da ureia, tornando o carbono carbonílico altamente eletrofílico. Desse modo, o ataque nucleofílico pelo íon hidróxido ocorre favoravelmente formando um estado de transição tetraédrico e, nesse momento, a conformação do *flap* muda de aberta para fechada. O fechamento do *flap* irá promover a aproximação do resíduo de His323 do sítio ativo, permitindo que ele esteja na posição correta para formar uma ligação de hidrogênio entre seu anel imidazólico e o grupo NH₂. Nesse ponto, os autores sugerem que, para a formação da amônia, a protonação do grupo NH₂ pode ser realizada pelo próprio íon hidróxido, cujo a acidez é maior após a formação da ligação C-O. Essa transferência de próton também poderia ocorrer através do grupo carboxilato de um resíduo Asp366, que posteriormente mostrou a capacidade de rotacionar em torno da ligação C α -C β , aproximando-se tanto de OH quanto de NH₂.³⁵ Finalmente, a liberação de amônia seria assistida pelo movimento da His323 com a abertura do *flap*. O íon carbamato formado interagiria desfavoravelmente com oxigênio de Asp363, sendo sua liberação assistida por Arg339 quando ocorre a abertura do *flap*.^{36,37}

Atualmente, o mecanismo proposto por Benini *et al.* é o mais aceito pela comunidade científica,²⁰ tendo sido confirmado posteriormente por estudos de ureases inibidas por fosfato³⁸ e por ácido bórico³⁹ e também por modelos computacionais.⁴⁰



Esquema 6. Mecanismo de hidrólise da urease proposto por Benini et al. (Adaptado de Benini et al., 1999)³⁶

1.2. Impactos da atividade ureolítica na medicina

1.2.1. Ureases como um fator de virulência microbiana

Ureia, o substrato natural da urease, é o principal produto metabólico nitrogenado produzido pela maioria dos animais terrestres. Em humanos a ureia é produzida no fígado, como resultado natural da degradação de proteínas, transportada pela corrente sanguínea aos rins e excretada na urina, sendo sua concentração no sêrum sanguíneo de 1-10 mM e na urina de aproximadamente 0,5 M. Ureia também pode ser encontrada nas secreções de glândulas exócrinas, como suor e saliva, entretanto, cerca de 20-25% de toda ureia produzida permanece no trato gastrointestinal. A disponibilidade da ureia torna o corpo humano o hospedeiro ideal para micro-organismos ureolíticos⁴¹, estimando-se que 15-30% da ureia sintetizada seja hidrolisada por ureases microbianas.⁴²

Entre os micro-organismos presentes na microbiota humana, encontram-se bactérias com atividade ureolítica (*Bacteroides cellulosilyticus* WH2, *Coprococcus comes*, *Roseburia intestinalis*, *Streptococcus infantarius* e *Streptococcus thermophilus*). A amônia liberada pela urease dessas bactérias pode ser usada para a biossíntese de aminoácidos essenciais e não-essenciais para o microbioma, de modo que, a urease é fundamental na transformação de nitrogênio em dietas deficientes de proteína. Nesse contexto, a atividade ureolítica seria benéfica para os micro-organismos e para o hospedeiro.⁴³ Estudos também mostram que as ureases produzidas pelas bactérias *Streptococcus salivarius* e *Actinomyces naeslundii*, que fazem parte da microbiota bucal, contribuem para a saúde oral ao promoverem aumento do pH, impedindo a formação de placas e a desmineralização dentária.^{44,45}

Apesar de algumas bactérias ureolíticas apresentarem efeitos benéficos à saúde humana, a urease apresenta-se, na maioria das vezes, como um fator de virulência dos micro-organismos patogênicos.

Entre bactérias patogênicas ureolíticas, a *Helicobacter pylori* (Figura 7) é a que desperta maior interesse por estar associada a doenças graves que atingem uma parcela considerável da população mundial. A *H. pylori* é uma bactéria gram-negativa, flagelada e especializada em colonizar a mucosa estomacal humana devido sua capacidade de neutralizar o pH ácido estomacal, que é letal para muitos micro-organismos. Estima-se que mais da metade da população mundial esteja contaminada por *H. pylori*, sendo que, a maioria das pessoas são assintomáticas, apresentando uma inflamação da mucosa detectável apenas por biópsia e histologia. Não obstante, 15-20% dos infectados irão desenvolver ao longo de suas vidas doenças gastroduodenais graves, como úlceras estomacais e duodenais, adenocarcinomas e linfomas estomacais.^{46,47}

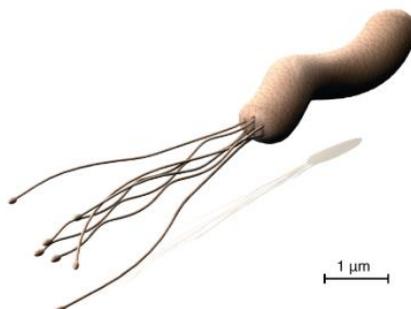


Figura 7. Reconstrução digital de *H. pylori*; (Extraída de Aruni et al., 2011).⁴⁷

A *H. pylori* foi identificada pela primeira vez em 1984 por dois pesquisadores australianos, Barry J. Marshall e Robin Warren.¹¹ Eles analisaram amostras de biópsia da mucosa estomacal de pacientes, observando que a bactéria estava presente em quase todos os pacientes com gastrites crônicas ou úlceras duodenais e gástricas.¹¹ Os resultados apresentados por Marshall e Warren representaram uma grande quebra de paradigma para a comunidade médica da época, visto que era amplamente aceito que a maior causa de úlceras peptídicas eram estilo de vida e estresse. Por essa razão, esses pesquisadores enfrentaram um grande ceticismo e críticas, levando um bom tempo para que seu trabalho fosse aceito completamente.⁴⁸ Em 1985, na tentativa de mostrar claras evidências de sua descoberta, Marshall infectou-se propositalmente com *H. pylori*, se submetendo a biópsias gástricas antes e após a infecção, mostrando que a bactéria de fato poderia causar doença gástrica aguda. O resultado desse experimento incomum mostrou o desenvolvimento da doença causada pela *H. pylori*, sendo publicado no mesmo ano e gerando um grande impacto na percepção médica sobre as patologias gastroduodenais.⁴⁹ Finalmente, em 2005, Marshall e Warren foram agraciados com o prêmio Nobel motivado pela descoberta da bactéria *Helicobacter pylori* e seu papel em gastrites e úlceras peptídicas.¹⁰

A descoberta da *H. pylori* representou um grande impacto para a ciência, conduzindo à realização de milhares de estudos relacionados à bactéria e possíveis tratamentos para as infecções. Uma busca na plataforma Scopus pelo termo “*Helicobacter pylori*” contido em títulos, resumos ou palavras-chave de artigos, mostra mais de 60 mil trabalhos publicados desde sua descoberta até o ano de 2023, inclusive, foi criado um periódico específico chamado “*Helicobacter*”.

Dentre os inúmeros trabalhos relacionados à *H. pylori*, notam-se esforços para entender como a bactéria é capaz de colonizar a mucosa estomacal, um ambiente hostil a microorganismos. Nesse contexto, o papel da urease sintetizada pela bactéria é fundamental, pois os produtos da hidrólise da ureia elevam o pH no entorno da bactéria para um valor adequado (faixa de pH entre 6-8) para sua sobrevivência. Na *H. pylori* a urease encontra-se presente no citosol, todavia, ureases de bactérias mortas podem ser liberadas no ambiente a ser colonizado e se aderirem à superfície de células vivas, sendo este tipo de “expressão de proteínas de superfície” encontrado em amostras de biópsias em humanos.^{41,46}

A entrada de ureia na célula bacteriana ocorre através de um canal controlado por uma bomba de prótons para evitar que excesso de ureia adentre a célula e cause efeitos tóxicos pelo aumento excessivo do pH. Em pH ácido, o portão encontra-se aberto para passagem de ureia, mas fechado em pH neutro. Após a hidrólise da ureia, amônia é liberada causando aumento do pH citosólico e também criando uma camada neutra em torno da célula bacteriana, dessa forma, a bactéria é capaz de atravessar a camada mucosa protetora e se ligar às células epiteliais. Nesse ponto, amônia também poderá ser utilizada como fonte de nitrogênio para síntese proteica.^{46,50}

A liberação de amônia pelas ureases é responsável por parte das complicações causadas pelas infecções por *H. pylori*, uma vez que amônia é conhecidamente tóxica para o ser humano. Apesar da toxicidade da amônia variar com a concentração, sabe-se que bases fracas podem permear a membrana plasmática e causar várias alterações, entre elas, dilatação de compartimentos intracelulares ácidos, alteração do transporte de membrana vesicular, diminuição da síntese proteica ou de ATP e interrupção do ciclo celular. Além desses efeitos, amônia pode reagir com intermediários oxidantes liberados pela atividade de mieloperoxidases e formar agentes carcinogênicos associados ao desenvolvimento de adenocarcinoma.⁴⁶

Apesar de crucial para a sobrevivência da bactéria, o papel da urease na infecção por *H. pylori* não se restringe à sua atividade ureolítica. Estudos da década de 90 mostraram que ureases provenientes de *H. pylori* participam do recrutamento de neutrófilos e monócitos na mucosa para a produção de citocinas pró-inflamatórias. Elas também podem apresentar várias outras propriedades biológicas atuando no sistema imune, entre elas agregação plaquetária e atraso na apoptose de neutrófilos e células gástricas epiteliais. Esses sintomas mostram que funções não-enzimáticas da urease têm um papel importante, mas ainda ignorado, no processo inflamatório das doenças gástricas causados por *H. pylori*. Da mesma forma, ureases podem contribuir para doenças fora do trato gastrointestinal, em particular doenças cardiovasculares, devido sua capacidade de ativar células não-gástricas como neutrófilos, plaquetas, células endoteliais entre outras.^{3,46}

As bactérias ureolíticas também desempenham papel importante nas infecções do trato urinário, sendo *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Ureaplasma. ureolyticum* e *Proteus penneri* as espécies mais comuns isoladas. Apesar de não serem a causa principal de infecções urinárias em pessoas saudáveis, as bactérias ureolíticas estão frequentemente relacionadas a sintomas mais graves. A amônia

liberada pela hidrólise da ureia irá promover o aumento do pH da urina, que é ligeiramente ácida, causando a precipitação de cátions polivalentes normalmente solúveis e a formação de cálculos renais.⁴¹ Estima-se que cálculos urinários induzidos por infecções de bactérias ureolíticas somem 15-20% dos casos relatados.¹

Além das doenças gastrointestinais e do trato urinário, outras patologias humanas também se relacionam com a atividade de ureases bacterianas. Por exemplo, a atividade ureolítica é fundamental para a sobrevivência de *Mycobacterium tuberculosis*, o agente causador da maioria dos casos de tuberculose, uma doença inflamatória dos pulmões.⁵⁰

Apesar das ureases como um fator de virulência em infecções fúngicas ainda ser um assunto emergente na comunidade científica, estudos já mostram que, durante a infecção dos pulmões pelos fungos *Cryptococcus neoformans* e *Coccidioides posadasii*, a hidrólise da ureia presente nos fluídos de revestimento epitelial dos pulmões inibe a função imune e contribui para uma infecção duradoura e extensos danos ao tecido pulmonar.^{42,51}

1.3. Impactos da atividade da urease na agricultura

Em plantas as ureases são amplamente encontradas, estando distribuídas em todo tecido vegetal. A atividade da urease permite que elas utilizem ureia como fonte de nitrogênio, um elemento essencial para o crescimento vegetal, uma vez que é utilizado nas sínteses de clorofila e proteínas importantes em processos vitais.^{52,53} A deficiência de nitrogênio interfere diretamente no crescimento e desenvolvimento de todas as partes da planta, impactando, por exemplo, na produtividade agrícola.⁵³

A fonte de ureia para a enzima pode ser endógena ou exógena à planta, sendo a ureia endógena proveniente de dois processos: a quebra da arginina pela arginase em ornitina e ureia; e a degradação dos ureidos alantoato e ureidoglicolato. Externamente, as plantas podem obter ureia proveniente do solo ou depositada em suas folhas por meio de seus transportadores de ureia. Todavia, devido à presença de ureases do solo e de micro-organismos filoplanos, a ureia pode ser hidrolisada previamente levando à planta a absorver amônia preferencialmente.⁵⁴

Por se tratar de um composto de baixo custo e com alta proporção de nitrogênio, a ureia tornou-se o fertilizante nitrogenado mais utilizado no mundo. Dados da IFA (do inglês,

International Fertilizer Association) projetam que até 2024 a produção de fertilizantes nitrogenados cresça 6% em comparação com 2019, dos quais 75% são compreendidos por ureia. Estima-se também que a demanda por ureia para uso agrícola cresça 0,9% até 2024.⁵⁵

Apesar das ureases serem importantes na obtenção de nitrogênio pelas plantas, o excesso da atividade dessa enzima no solo em plantações suplementadas com ureia acarreta na volatilização de grande parte da amônia produzida, gerando problemas econômicos e ambientais. Economicamente, a perda de nitrogênio pela liberação de amônia impacta diretamente na produtividade agrícola pois haverá menor quantidade de nutriente disponível no solo para o crescimento da planta.⁵⁶ No âmbito ambiental, a volatilização excessiva de amônia é preocupante devido à toxicidade desse composto, podendo também causar acidificação dos solos, eutrofização de ecossistemas, formação de material particulado fino na atmosfera e alteração do equilíbrio global do efeito estufa.⁵⁷ Estima-se que a perda global de amônia a partir de fertilizantes de ureia seja próxima de 14%, mas esse valor é influenciado por outros fatores como tipo de solo e temperatura, desse modo, a taxa de volatilização pode alcançar 40% em solos tropicais.⁵⁶

Com o objetivo de mitigar a volatilização de amônia, a indústria agrícola desenvolveu técnicas de incorporação de ureia ao solo, que pode ser realizada de forma mecânica ou por irrigação. Entretanto, a incorporação nem sempre é possível, principalmente em plantações perenes, nas quais o processo de incorporação poderia causar danos às raízes ou à colheita. Além disso, a incorporação mecânica é demorada e requer o uso de tratores de alta potência, restringindo seu uso a fazendas de grande porte. Uma alternativa para diminuir a taxa de hidrólise da ureia no solo é utilizar formulações com aditivos capazes de bloquear a atividade da urease.⁵⁶

1.4. Inibidores de urease

Os inibidores de urease têm sido tópicos de intensa pesquisa com objetivo de entender melhor o mecanismo de funcionamento da enzima ou para bloquear sua atividade quando ela é desfavorável. Na literatura é descrita vários compostos estruturalmente diversos como inibidores de urease, principalmente após a elucidação da estrutura cristalina da enzima, motivando um planejamento racional das estruturas de novos compostos.⁵⁸

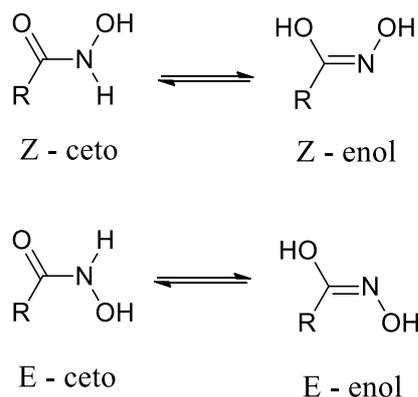
Estudos cristalográficos mostram que, apesar do substrato natural da urease ser uma molécula pequena, a enzima é bastante flexível, sendo capaz de se ligar a estruturas maiores em seu sítio ativo.⁵⁹ A flexibilidade do sítio ativo permite um refinamento estrutural no planejamento de moléculas, levando à busca por inibidores mais efetivos, com menores efeitos colaterais para a saúde humana e mais seguros ambientalmente.

Na pesquisa por novos inibidores é possível classifica-los em três categorias: (I) os análogos estruturais do substrato, como tiourea ou hidroxitiourea, que se ligam ao sítio ativo de maneira similar à ureia e, geralmente, são inibidores reversíveis; (II) os baseados no mecanismo de hidrólise, como os fosfodiamidatos e os imidazóis, que são compostos não-reativos mas, após ativação pela própria urease (fosfodiamidato) ou meio ácido (imidazóis), se transformam em inibidores potentes e irreversíveis; (III) os inibidores que se ligam aos íons níquel do sítio ativo mas de formas diferentes do substrato, como os ácidos hidroxâmicos e os tiois.^{60,61}

Devido ao grande número de classes de substâncias inibidoras de urease, serão discutidas a seguir apenas aquelas mais proeminentes na literatura ou que se relacionam diretamente com o trabalho proposto.

1.4.1. Ácidos hidroxâmicos

Os ácidos hidroxâmicos são representados pela estrutura geral RCONHOH, na qual R pode ser hidrogênio, grupos arila ou alquila substituídos ou não, podendo existir em duas formas tautoméricas provenientes do equilíbrio ceto-enólico (Esquema 7).⁶² Essa classe de compostos foi descoberta em 1869 por Lossen ao realizar a síntese do ácido oxalo-hidroxâmico, entretanto, foi a partir da década de 1980 que um maior volume de estudos foi conduzido sobre suas propriedades biológicas, estrutura e síntese.⁶³



Esquema 7. Representação das formas tautoméricas dos ácidos hidroxâmicos e seus estereoisômeros, no caso da forma enólica, e confôrmeros, no caso da forma ceto

Ácidos hidroxâmicos são geralmente considerados derivados de hidroxilamina e ácidos carboxílicos, todavia, sua capacidade de complexação e seu pKa em solução aquosa são geralmente maiores que o do ácido carboxílico correspondente. Na formação de complexos, os hidroxamatos apresentam grande habilidade quelante, sendo capazes de se ligarem de forma mono ou bidentada através de seus átomos de oxigênio (Figura 8). Desse modo, hidroxamatos podem se coordenar formando anéis quelatos estáveis. Outra característica importante desses compostos é sua habilidade de formar ligações de hidrogênio através dos seus grupos OH, NH e oxigênio carbonílico, que podem, por exemplo, favorecer interações do tipo fármaco-receptor com enzimas.⁶²

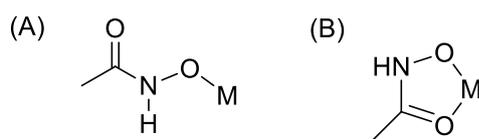


Figura 8. Representação da complexação dos hidroxamatos a um metal genérico M nos modos (A) monodentado e (B) bidentado

As características estruturais dos ácidos hidroxâmicos os fazem possuir um amplo papel biológico, formando uma das classes mais importantes de bio-ligantes orgânicos. Nas ciências biomédicas esse grupo de compostos é utilizado no desenvolvimento de fármacos para tratamento de câncer, HIV, malária, doenças cardiovasculares, Alzheimer, tuberculose, alergias, intoxicação por metais e infecções causadas por micro-organismos.⁶⁴ Os ácidos hidroxâmicos também são capazes de inibir uma variedade de enzimas, como ureases, peroxidases, lipoxigenases e metaloproteinases de matriz, além disso, também podem atuar como sideróforos na competição por íons Fe (III).⁶⁴ Esses compostos também apresentam

funções fora da área médica, por exemplo, como inseticidas, reguladores de crescimento de plantas, antioxidantes, agentes na extração de elementos tóxicos e inibidores de corrosão.⁶⁴

Em 1962, Kobashi *et al.*⁶⁵ mostraram pela primeira vez o potencial dos ácidos hidroxâmicos como inibidores da enzima urease e, desde então, vários outros derivados dessa classe têm sido avaliados para essa finalidade. Entre os compostos avaliados, o mais estudado é o ácido acetoidroxâmico (AAH), um potente inibidor competitivo (Figura 9). Por suas capacidades quelantes, o mecanismo de inibição do AAH envolve a ligação com os íons níquel do sítio ativo da urease, como mostrado nas estruturas cristalográficas de ureases inibidas de *B. pasteurii* (PDB 4UBP), *H. pylori* (PDB 1E9Y) e *K. aerogenes* (PDB 1FWE).³ Em 1983, o AAH foi aprovado pelo FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) para o uso médico no tratamento de infecções do trato urinário, sendo comercializado nos Estados Unidos como Lithostat e na Europa como Uronefrex. Entretanto, esse fármaco apresenta graves efeitos colaterais teratogênicos, psiconeurológicos e musculares que limitam seu uso.⁶⁶

Devido sua promissora capacidade inibitória, o AAH se tornou um composto protótipo a partir do qual grupos de pesquisa propuseram novos derivados hidroxamatos com grupos alifáticos, aromáticos, aminoácidos e dipeptídios, principalmente para tratamento de infecções urinárias e por *H. pylori*.⁶⁷

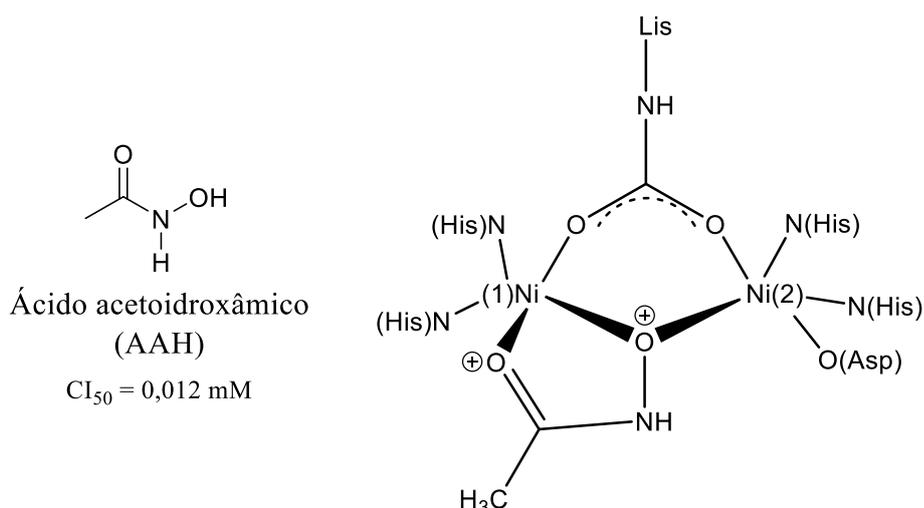


Figura 9. Estruturas do ácido acetoidroxâmico e do sítio ativo da urease inibido por AAH. CI_{50} determinado para urease proveniente de *Canavalia ensiformis*⁶⁸

Até metade da década de 90, o grupo de pesquisa de Kyoichi Kobashi, da Universidade Médica e Farmacêutica de Toyama no Japão, lideraram importantes pesquisas nessa área.⁶⁹ Em

1971 eles sintetizaram 57 derivados alifáticos e aromáticos de ácidos hidroxâmicos. O objetivo do estudo era avaliar os efeitos do tamanho da cadeia carbônica e do padrão de substituição aromático na atividade inibitória de urease de *Canavalia gladiata*, conhecida como feijão-espada. Entre os derivados ácidos acilhidroxâmicos, os ácidos heptil e caprilhidroxâmicos (Figura 10) foram os que apresentaram melhores resultados, enquanto, entre os ácidos *p*-alcoixibenzoidroxâmicos, o ácido *p*-metoxibenzoidroxâmico ($CI_{50}=0,23 \mu\text{M}$) foi o mais ativo (Figura 10). Então, os autores concluíram que o aumento do número de carbonos conduzia a um decréscimo da atividade inibitória, provavelmente devido à diminuição das propriedades hidrofílicas. Em relação ao efeito do padrão de substituição no anel aromático, os autores observaram que a presença de grupos nas posições *meta* ou *para* de ácidos benzo-hidroxâmicos não causava efeitos na atividade inibitória, todavia, compostos *orto*-substituídos eram notavelmente menos ativos. Esse resultado foi atribuído a efeitos estéricos do grupo em *orto* no sítio ativo da urease. Todavia, contrariando a sequência de resultados, o ácido *o*-aminobenzoidroxâmico ($CI_{50}=0,27 \mu\text{M}$) apresentou-se como um dos inibidores mais eficazes (Figura 10).⁷⁰

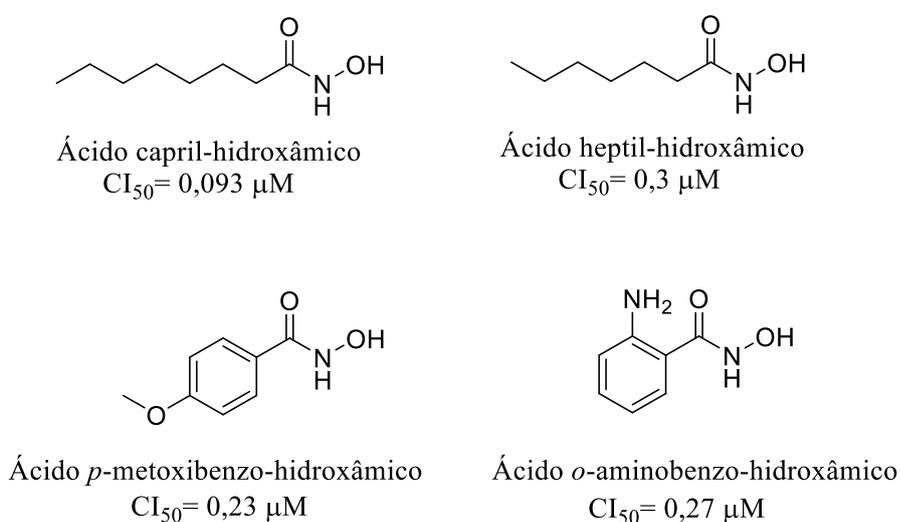


Figura 10. Estrutura dos derivados hidroxâmicos mais ativos sintetizados por Kobashi *et al.*

Em 1975 Kobashi *et al.* sintetizaram 19 ácidos α -aminoacil hidroxâmicos e testaram suas atividades inibitórias de urease de *Canavalia ensiformis*. Entre os compostos avaliados, o ácido metionina-hidroxâmico foi o inibidor mais potente, com valor de CI_{50} igual $3,9 \mu\text{M}$ para urease de feijão-de-porco.⁷¹ Inspirados por esses resultados, em 1992, Otake *et al.* prepararam uma série de ácidos hidroxâmicos dipeptídicos com estrutura geral H-X-Gli-NHOH, no qual X representa um aminoácido. Eles analisaram as relações entre estrutura e atividade para ureases

de *Canavalia ensiformis* e *Proteus mirabilis*. Os autores observaram que os derivados dipeptídicos sintetizados eram inibidores mais eficazes que os ácidos aminoacil-hidroxiâmicos correspondentes.⁷² Por exemplo, o derivado H-Met-Gly-NHOH correspondente ao derivado mais ativo do trabalho de Kobashi *et al.* (1975)⁷¹ apresentou valor de CI_{50} igual 2,6 μM .⁷² Em 1994, Otake *et al.* também testaram os derivados alifáticos, aromáticos, aminoácidos e dipeptídicos para urease de *H. pylori*, observando que a urease dessa bactéria era mais suscetível à inibição por esses derivados hidroxiâmicos do que a de feijão-de-porco. Os melhores resultados de inibição nesse estudo foram obtidos para o derivado H-Ser-Gli-NHOH, com $CI_{50}=0,21 \mu M$.⁷³

Em 1980 Munakata *et al.* sintetizaram 43 derivados ácidos *N*-(aróil)-glicino-hidroxiâmicos com o objetivo de serem avaliados para tratamento de urolitíase. Para essa série de compostos foram obtidos valores de CI_{50} entre 0,5 e 2,0 μM , entretanto, muitos deles eram mutagênicos.^{67,74}

Nas últimas duas décadas outros trabalhos relevantes foram conduzidos com o objetivo de obter novos derivados hidroxiâmicos, mostrando uma diversidade estrutural e potencial ainda a ser explorado para essa classe. Por exemplo, os derivados heterocíclicos, publicados por Muri *et al.* em 2004 (Figura 11)⁷⁵ e os derivados arilamino descritos por Liu *et al.* em 2018 (Figura 12).⁷⁶

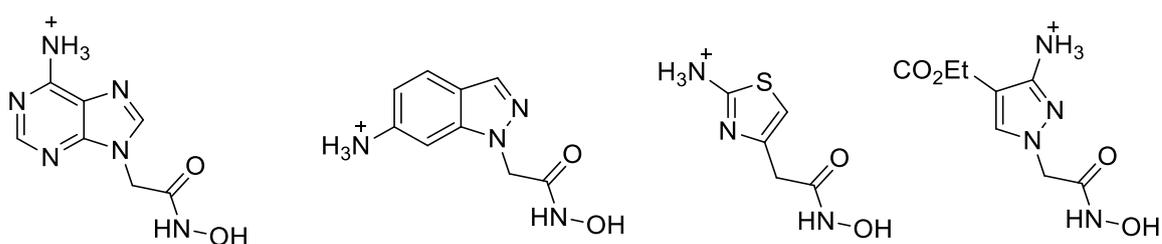


Figura 11. Estruturas dos derivados heterocíclicos sintetizados e testados como inibidores de urease por Muri *et al.*⁷⁵

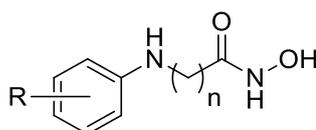


Figura 12. Estrutura geral dos derivados arilamino sintetizados por Liu *et al.*, na qual, $n=1$ ou 2 e $R=H$, halogênio, NO_2 e OMe .⁷⁶

Em 2018 Ni *et al.* avaliaram a capacidade inibidora de uma série de ácidos fenoxidroxâmicos e análogos para urease proveniente de *Helicobacter pylori*. Dentre os compostos testados, o ácido 3-(3,4-diclorofenóxi)propionilidroxâmico (Figura 13) apresentou os melhores resultados ($CI_{50} = 0,061 \pm 0,003 \mu\text{M}$)⁷⁷.

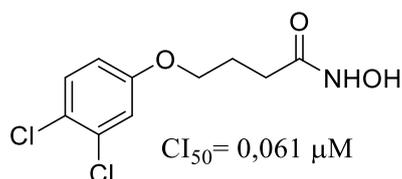


Figura 13. Estrutura do derivado mais ativo sintetizado por Ni *et al.*⁷⁷

Mamidala *et al.* fizeram o planejamento estrutural e síntese de híbridos moleculares de ácidos hidroxâmicos com di-hidropirimidonas para avaliação de sua atividade inibidora de urease de *H. pylori*. Os autores obtiveram valores de CI_{50} na faixa do micromolar, sendo o composto mais ativo mostrado na Figura 14, com $CI_{50} = 0,014 \pm 0,001 \mu\text{M}$.⁷⁸

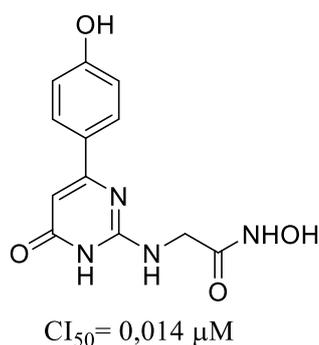


Figura 14. Estrutura do derivado mais ativo sintetizado por Mamidala *et al.*⁷⁸

Em 2022 Song *et al.* propuseram a síntese e a avaliação da atividade anti-ureolítica de 13 derivados de ácidos 2-(*N*-(3-nitrofenil)-*N*-fenilsulfonyl)aminoacetidroxâmicos. O composto mostrado na Figura 15 apresentou os melhores resultados com valores de $CI_{50} = 0,13 \pm 0,01 \mu\text{M}$. Também foram conduzidos experimentos de cinética enzimática na presença desse inibidor, sendo encontradas duas constantes de equilíbrio de dissociação K_i ($0,065 \pm 0,003 \mu\text{M}$) e K_i' ($1,20 \pm 0,09 \mu\text{M}$), caracterizando uma inibição mista.⁷⁹

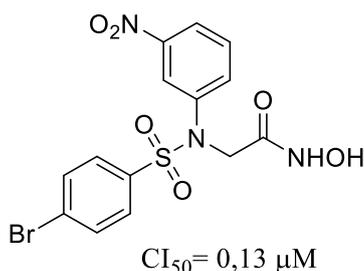


Figura 15. Estrutura do derivado mais ativo sintetizado por Song et al.⁷⁹

1.4.2. Aceptores de Michael

Os aceptores de Michael são definidos como olefinas ativadas que, na presença de nucleófilos (doadores de Michael), reagem para formar o produto de adição 1,4 (aduto de Michael).⁸⁰ Devido à possibilidade de formação de ligações C-C, a reação de adição de Michael tem grande relevância sintética, tendo sido descrita pela primeira vez por Arthur Michael em 1887.⁸¹

Os aceptores de Michael mais comuns são os compostos carbonílicos α,β -insaturados, todavia, outros compostos nos quais a dupla ligação encontra-se conjugada com grupos retiradores de densidade eletrônica também podem reagir como aceptores de Michael. A conjugação com grupos retiradores de elétrons resulta na polarização da ligação dupla com aumento da eletrofilia do carbono- β . Por serem classificados como eletrófilos macios, formam produtos de adição preferencialmente com nucleófilos macios, como os tióis. Portanto, quando em meios biológicos, reagem preferencialmente com aminoácidos contendo enxofre, como a cisteína.

Dentre os eletrófilos com reconhecidas propriedades biológicas, os aceptores de Michael encontram-se em destaque. Entretanto, por muitos anos a presença de funções eletrofilicas em fármacos foi vista como uma desvantagem por químicos medicinais devido aos potenciais efeitos tóxicos e imunogênicos. Um dos principais riscos envolvendo uso de aceptores de Michael no planejamento de fármacos é a formação de ligações covalentes irreversíveis com biomoléculas, como proteínas, de forma não-seletiva, desencadeando uma resposta imunológica indesejada ou reações adversas graves.^{82,83}

Apesar de terem sido evitados pela indústria farmacêutica ao longo dos anos, muitos fármacos que são amplamente utilizados na clínica médica são fármacos que se ligam covalentemente ao biorreceptor, como aspirina, penicilina, omeprazol e clopidogrel.⁸² O

aumento do número de pesquisas focadas no mecanismo de ação de fármacos e o desenvolvimento de técnicas mais modernas de identificação de metabólitos e seus alvos biomoleculares resultaram em um crescente interesse de pesquisadores em fármacos que se ligam covalentemente ao seu alvo biológico.⁸⁴ Nos anos de 2013 e 2015 o FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) aprovou o uso de três fármacos, afatinib, ibrutinib e osimertinib (Figura 16), planejados para se ligarem covalentemente a um resíduo de cisteína de tirosina-quinases via adição de Michael.⁸⁵

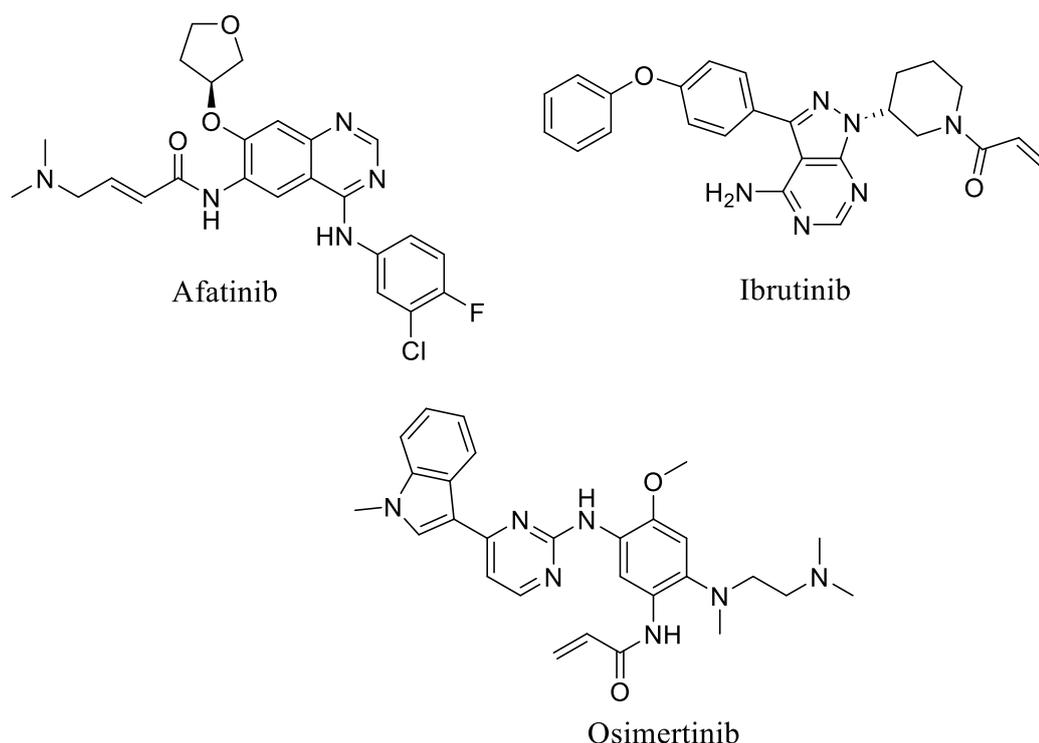


Figura 16. Compostos aprovados pelo FDA como inibidores de tirosina-quinases

Duas estratégias principais têm sido exploradas na busca por fármacos seguros e eficientes que se liguem covalentemente aos seus alvos biológicos. A primeira delas é a inserção de um grupo funcional eletrofílico em uma molécula que já possua um grupo que se ligue reversivelmente ao alvo molecular. Desse modo, a formação da ligação covalente é secundária, ocorrendo o ataque nucleofílico apenas quando a molécula se encontra bem próxima do sítio de ligação. Essa estratégia pode ser de particular importância para superar a resistência de células tumorais ou micro-organismos a fármacos existentes.^{83,85}

Uma segunda estratégia se baseia na modulação da reatividade dos eletrófilos para alcançar uma maior seletividade. No caso dos aceptores de Michael é possível alterar a reatividade ao variar a densidade eletrônica da ligação dupla conjugada, sendo observado que

pequenas diferenças na energia do orbital LUMO (do inglês, *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) são correlacionadas com mudanças na reatividade e atividade biológica.⁸³

Entre as enzimas consideradas alvos de ação de fármacos, aproximadamente um terço apresenta opções de inibidores que se ligem covalentemente aprovados pelo FDA.⁸² A previsão é que o uso de fármacos que se ligam covalentemente cresça, visto que interações mais fortes entre enzima-inibidor podem resultar em maior potencial inibitório, maior tempo de ação e menor dosagem do fármaco.⁵⁸ No caso de inibidores covalentes, a interação enzima-inibidor pode se dar de forma reversível ou irreversível a depender dos valores das constantes de velocidade (k_2) como exemplificado no Esquema 8. Como mostrado, o processo de inibição ocorre em duas etapas, ao aproximar-se da proteína o composto se liga de forma não-covalente deixando o eletrófilo próximo a um sítio nucleofílico específico. Então, ocorre a formação da ligação covalente dando origem ao complexo E-I. No caso de inibidores irreversíveis, a constante k_2 será igual a zero, enquanto para inibidores reversíveis apresentará valores finitos. É importante destacar que, quando uma enzima é submetida à inibição irreversível, a atividade será restaurada pela sua ressíntese. Desse modo, um inibidor também é considerado irreversível caso o tempo de meia-vida do complexo E-I formado seja superior ao tempo de síntese da enzima inibida.⁸²



Esquema 8. Mecanismo geral para ação de um inibidor covalente, no qual, K_i corresponde a constante de dissociação do complexo EI e k_2 e k_2 às constantes de velocidade

Como inibidores de urease, os aceptores de Michael são conhecidos por se ligarem covalentemente ao resíduo de cisteína presente no *flap* móvel da enzima. Em 2003, Tanaka *et al.* publicaram um trabalho relatando a atividade antiureolítica de cetonas α,β -insaturadas para urease de feijão-de-porco. Os resultados mostraram valores de CI_{50} iguais a 0,16 mM para a cetona mais ativa (estrutura I, Figura 17). Nesse estudo o ácido acetoidroxâmico foi utilizado como referência, apresentando valores de CI_{50} iguais a 0,012 mM.⁶⁸

Em 2017 Macegoniuk *et al.* avaliaram 40 aceptores de Michael como inibidores de urease de *S. pasteurii*. Nesse estudo os autores pretendiam determinar qual derivado apresentaria maior potencial inibitório, seletividade diante de grupos sulfidril e baixa toxicidade celular. O composto II (Figura 17) apresentou-se como o mais promissor dentre os avaliados com valor de K_i igual 42,5 nM e atóxico nas concentrações testadas. O estudo também

avaliou a interação do composto **II** com glutationa, mostrando que a reatividade frente ao grupo sulfidril era pequena e, portanto, secundária no processo de inibição.⁸⁶

Em 2018, Ntatsopoulos *et al.* sintetizaram uma série de ácidos fosfônicos derivados do ácido cinâmico e avaliaram suas atividades anti-ureolíticas frente a ureases de *Sporosarcina pasteurii* e *Proteus mirabilis*. Nesse estudo observou-se que o composto mais ativo (estrutura **III**, Figura 17) atuava via um mecanismo “*slow-binding*”, sendo proposto que a interação do grupo fosfônico com o sítio ativo ocorreria prioritariamente, sendo seguida pela reação de adição ao grupo sulfidril. Os valores de CI_{50} encontrados para o composto **III** foram iguais a 3,10 e 11,0 μM para ureases de *S. pasteurii* e *P. mirabilis*, respectivamente. O valor de K_i para a urease de *S. pasteurii* também foi determinado, sendo igual a 0,509 μM .⁸⁷

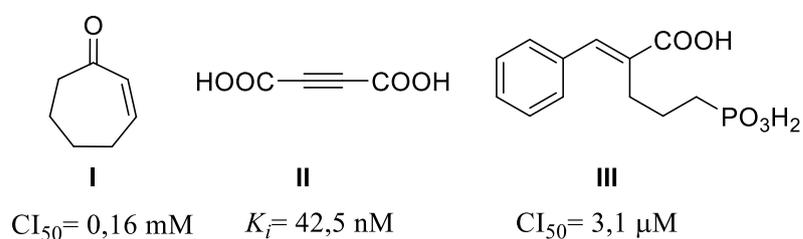


Figura 17. Estruturas de aceptores de Michael inibidores de urease

1.4.3. Organofosforados

Em 1934 Howell e Sumner, ao estudarem o efeito de tampões na atividade ureolítica, descreveram pela primeira vez a inibição competitiva da urease por fosfato.⁸⁸ Esse mecanismo de inibição foi intensivamente estudado até o ano de 2001, quando Benini *et al.* publicaram a estrutura cristalográfica da urease de *S. pasteurii* inibida por fosfato.³⁸

Na década de 70 estudos com outros derivados fosforados foram iniciados após observações de que inseticidas organofosforados eram capazes de inibir ureases presentes no solo.^{3,89} Os derivados amida ou éster de ácidos (tio)fosfóricos são considerados os inibidores mais fortes até então, alcançando valores de CI_{50} na faixa do nanomolar.⁹⁰ Uma análise cinética do mecanismo de inibição de compostos ativos mostra que, independentemente do derivado utilizado, ele será hidrolisado pela enzima ao diamidofosfato, que é o real inibidor da urease.¹ Essa observação foi corroborada pelo trabalho de Benini *et al.* no qual a estrutura cristalográfica de urease de *B. pasteurii* inibida por fenilfosforodiamidato mostrou a presença de diamidofosfato ligado ao sítio ativo (Figura 18). Na estrutura a molécula de diamidofosfato

substitui o *cluster* de quatro moléculas de água do sítio ativo, sendo que, um de seus átomos de oxigênio se liga aos dois íons níquel formando a ponte no lugar do íon hidróxido, o outro oxigênio e um dos nitrogênios se ligam a Ni(1) e Ni(2) e o outro nitrogênio se direciona para a abertura do sítio ativo.³⁶ Portanto, o diamidofosfato é um inibidor análogo ao estado de transição e se liga fortemente ao sítio ativo, o que poderia ser uma das razões para sua alta capacidade inibitória.^{35,58}

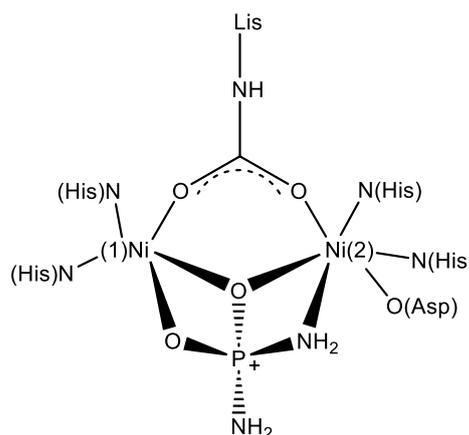


Figura 18. Estrutura do sítio ativo da urease inibida por diamidofosfato

Os compostos organofosforados encontram-se disponíveis comercialmente como inibidores de urease para uso agrícola. O mais famoso entre eles é o *N*-(*n*-butil)-tiofosfórico triamida (NBPT) (Figura 19) introduzido no mercado na década de 90 e que, na presença de urease, é hidrolisado ao inibidor ácido monoamidotiofosfórico. (MATP) (Figura 19).⁹¹ Apesar da posição sólida do NBPT no mercado, outros compostos têm se mostrado como alternativas viáveis. No início dos anos 2000 o composto *N*-(2-nitrofenil) fosfórico triamida foi desenvolvido na Alemanha e tem alcançado o mercado. Em 2017 introduziu-se no mercado uma formulação bem sucedida contendo NBPT e *N*-(*n*-propil)-tiofosfórico triamida (NPPT) (Figura 19).⁵⁶ Apesar de amplamente utilizados em vários países do mundo e terem um mercado em crescimento no ramo de fertilizantes, a instabilidade da ligação entre nitrogênio e fósforo em soluções aquosas limita as aplicações desses compostos. Para superar essa limitação, tem-se testado compostos nos quais a ligação P-N é substituída por ligação C-P (fosfonatos e fosfinatos) com resultados promissores.⁵⁸

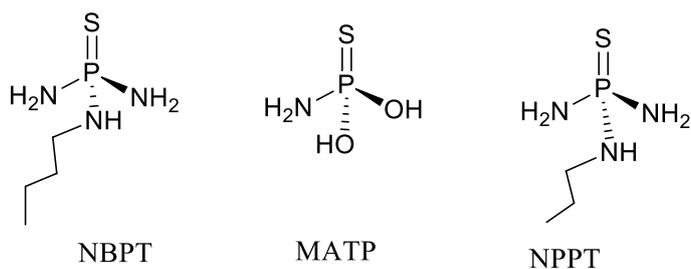
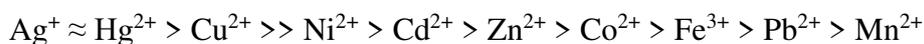


Figura 19. Estrutura de organofosforados utilizados como inibidores de urease

1.4.4. Complexos metálicos

A urease geralmente é inibida por íons de metais pesados, sendo os mais eficientes aqueles capazes de formar sulfetos insolúveis, como Ag^+ e Hg^{2+} . Eles são classificados como inibidores não-competitivos e seu mecanismo de inibição descrito se dá por meio da ligação do íon metálico aos grupos sulfidrila da enzima. Entretanto, existem evidências da coordenação de íons Ag^+ e Cu^{2+} a átomos de nitrogênio ou oxigênio provenientes de resíduos de histidinas e ácidos aspártico e glutâmico, respectivamente. Em relação à eficiência inibitória, outros íons metálicos foram relatados na seguinte ordem:¹



Assim como para íons metálicos, a atividade inibitória de urease também foi observada para vários complexos de metais de transição ou metaloides. A presença do centro metálico fornece ao inibidor uma série de características específicas, sendo possível modular propriedades, como a natureza do íon metálico, o estado de oxidação, o número de coordenação, estrutura do ligante e geometria do complexo. Essas características atraem grande interesse para os complexos metálicos como inibidores, visto que, são particularidades ausentes em moléculas puramente orgânicas.⁶¹

Atualmente, os complexos metálicos mais descritos na literatura como inibidores de urease são os formados por Cu, Zn, Co e Ni. Na síntese desses complexos, a maioria dos ligantes utilizados são bases de Schiff, sendo os compostos de cobre os mais eficientes, apresentando valores de CI_{50} de faixa do micromolar.⁶¹

1.4.5. Compostos heterocíclicos

Os compostos heterocíclicos apresentam-se como uma vasta classe de inibidores de urease, incluindo compostos estruturalmente diversos como imidazóis, tiazóis e adutos de Biginelli.

Os imidazóis foram relatados em 1995 como potentes inibidores de urease, principalmente os pertencentes à classe de inibidores da bomba de prótons, como o omeprazol (Figura 20), de nome comercial Losec. Entretanto, os imidazóis são classificados como pró-fármacos, visto que a substância realmente capaz de inibir a enzima é produzida a partir de sua conversão a 2-[(4-metóxi-3,5-dimetil-2-piridinil)metil]sulfinil-1-*H*-benzoimidazol (Figura 20). Desse modo, a sulfenamida inibe a enzima mimetizando o estado de transição. Estudos mostram que imidazóis, como lansoprazol, apresentam valores de CI_{50} na faixa do micromolar.⁶⁹

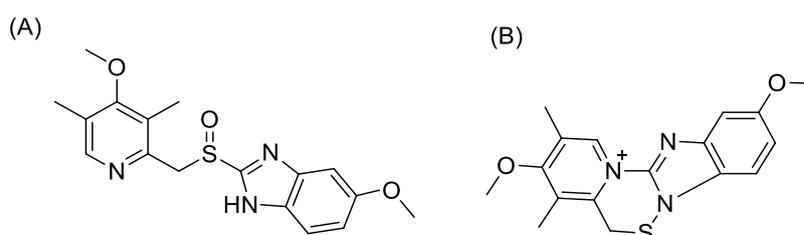


Figura 20. Estrutura do omeprazol (A) e do derivado sulfenamida ativo (B)

Os compostos 3,4-di-hidropirimidina-2(1*H*)-ona (ou tiona) (DHPMs), também conhecidos como adutos de Biginelli, são moléculas formadas a partir da reação multicomponente entre compostos 1,3-dicarbonílicos, (tio)ureia e aldeído.⁹² Como inibidores de urease as DHPMs apresentaram resultados promissores. Em 2013, Rashid *et al.* realizaram testes *in vitro* de inibição de urease para vinte e sete compostos derivados do monastrol (Figura 21), entre os quais, doze deles apresentaram promissora atividade inibitória com valores de CI_{50} na faixa do micromolar.⁹³

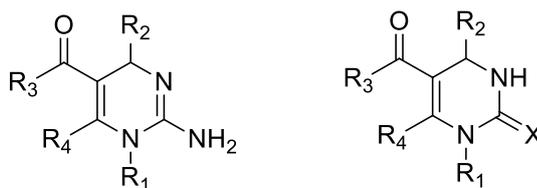


Figura 21. Derivados do monastrol sintetizados por Rashid *et al.*, nos quais o grupo X é oxigênio ou enxofre e os grupos R iguais a hidrogênio, grupos alquila, acetila, fenila ou benzila substituídos ⁹³

Em 2016, Khan *et al.* sintetizaram quatro classes de derivados de DHPMs (Figura 22), sendo elas: 4-di-hidropirimidina-2-tiona (série A), *N,S*-dimetil-di-hidropirimidina (série B), derivados de hidrazina de di-hidropirimidina (série C) e derivados tetrazólicos de di-hidropirimidina (série D). As quatro séries foram avaliadas para atividade inibitória de urease. A série A apresentou atividade significativa, com valores de CI_{50} entre 34,7 e 42,9 μ M, sendo essa atividade atribuída ao átomo de enxofre que interagiria com os átomos de níquel do sítio catalítico da enzima. A série B, sintetizada a partir da adição de grupos metila aos átomos de enxofre e nitrogênio da série A, mostrou-se inativa para inibição de urease. Essa inatividade seria devido à metilação do átomo de enxofre, que impediria sua interação com os átomos de níquel da enzima. A série C apresentou valores de CI_{50} entre 15,0 e 26,0 μ M, atividade duas vezes maior que a série A, sendo um resultado esperado, visto que, hidrazidas são farmacóforos para inibição de urease. A série D, sintetizada a partir da série C, mostrou perda de atividade, provavelmente devido ao bloqueio do grupo hidrazida. ⁹⁴

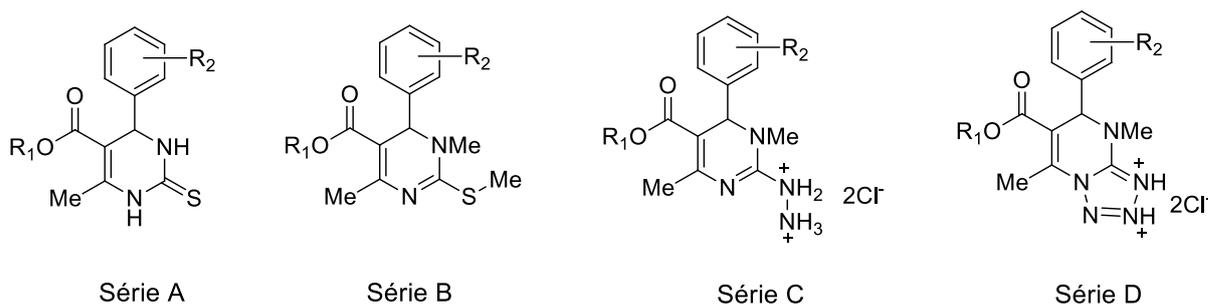


Figura 22. Compostos sintetizados por Khan *et al.*, nos quais $R_1 = Me$ ou Et , $R_2 = H, OH, Me$ ou NO_2 ⁹⁴

Os análogos do benzotiazol são compostos que atraem grande interesse devido suas aplicações em síntese química e propriedades farmacológicas. Entre suas propriedades biológicas encontram-se atividades antitumoral, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antivirais, antimalárica e anticonvulsivante. ⁹⁵ Como inibidores de urease os benzoatiazóis são pouco explorados até o presente momento. Em 2015, Araújo *et al.* publicaram a síntese de 19

derivados benzotiazólicos a partir de reações entre aldeídos aromáticos e 2-aminotiofenol, na presença de bissulfito de sódio e radiação de micro-ondas. Os compostos foram testados como inibidores de urease de feijão-de-porco, resultando em sete compostos capazes de inibir a enzima. O composto mais ativo (Figura 23) apresentou taxa de inibição igual a 62%, valor comparável ao obtido para o composto controle, hidroxiureia.⁹⁶

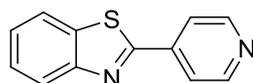


Figura 23. Estrutura do derivado benzotiazólico com maior atividade inibidora de urease sintetizado por Araújo *et al.*⁹⁶

No ano de 2016, Taha *et al.* relataram a síntese e as atividades antiureolíticas de 20 derivados benzotiazólicos (Figura 24). Todos os compostos testados mostraram-se ativos, com valores de CI_{50} entre $1,4 \pm 0,10$ e $34,43 \pm 2,10 \mu M$.⁹⁷

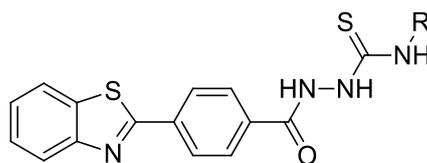


Figura 24. Estrutura geral dos compostos sintetizados por Taha *et al.*, na qual o grupo R é um grupo fenila substituído⁹⁷

1.4.6. Outras classes de inibidores

Entre os produtos naturais, os flavonoides apresentam resultados promissores como inibidores de urease. Extratos de chá verde e *cranberry* têm sido utilizados no tratamento de gastrite e infecções urinárias, sendo o efeito benéfico atribuído a presença de catequina e galato de epigallocatequina. Outros flavonoides, como o gossipol, gossipolona e apogossipol, extraídos do algodão, foram testados apresentando inibição na faixa do micromolar.⁵⁸

Os tióis, em especial o β -mercaptoetanol, têm importância histórica como inibidores de urease pois, em 1980, um complexo desse composto com urease de feijão-de-porco forneceu importantes informações sobre o sítio ativo da enzima. O β -mercaptoetanol é um inibidor competitivo, substituindo as quatro moléculas de água no sítio ativo e se ligando aos íons níquel em ponte por meio do átomo de enxofre. Desse modo, a distância entre Ni(1) e Ni(2) diminui

para 3,1 Å, enquanto seu grupo hidroxila se coordena ao Ni(1). O resultado desse modo de ligação é a perda da assimetria no sítio ativo, ambos íons níquel se tornam pentacoordenados.^{1,3}

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A descoberta dos ácidos hidroxâmicos como inibidores de urease no início da década de 60 deu início a uma busca por outros derivados dessa classe que apresentassem propriedades anti-ureolíticas. Considerando-se a crescente preocupação mundial acerca da resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis, os ácidos hidroxâmicos abrem uma nova perspectiva para o planejamento racional de antibióticos efetivos e seguros no tratamento de infecções causadas por microorganismos resistentes. Apesar de existirem estudos sobre as propriedades farmacológicas dos ácidos hidroxâmicos, ainda não existem fármacos seguros e eficazes dessa classe disponíveis no mercado para tratamento de doenças relacionadas à atividade ureolítica.

Além da perspectiva medicinal, é importante ressaltar as possíveis aplicações de ácidos hidroxâmicos como inibidores de urease em cultivos suplementados com ureia. Essa temática mostra-se muito relevante diante do desabastecimento global de alimentos e o aumento da insegurança alimentar mundial, visto que, é urgente o desenvolvimento de tecnologias e produtos que melhorem a produtividade agrícola.

Nesse contexto, a proposta deste trabalho é a síntese de ácidos cinamoilhidroxâmicos e avaliação de suas atividades inibidoras de urease, assim como sua ação sobre os parâmetros cinéticos da enzima.

2.1. Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar uma série ácidos cinamoilhidroxâmicos;
- Avaliar a atividade inibidora de urease dos compostos sintetizados e determinar os valores de concentração inibitória média (CI₅₀) para cada composto;
- Estudar os efeitos dos compostos sintetizados sobre os parâmetros cinéticos da enzima;
- Investigar a relação entre as características estruturais dos compostos com seus efeitos anti-ureolíticos.

3. PLANO DE TRABALHO

A estrutura geral dos compostos sintetizados foi planejada utilizando-se a estratégia da hibridação molecular. A hibridação molecular consiste na união de características estruturais parciais de compostos bioativos distintos em uma única estrutura dando origem a uma substância que apresente a atividade de um dos compostos originais ou conjugue a atividade de ambos.^{98,99} Neste trabalho propõe-se avaliar a atividade anti-ureolítica dos ácidos cinamoilhidroxâmicos formados pela união de um grupo ácido hidroxâmico (destacado em azul) e um acceptor de Michael (destacado em vermelho). Na Figura 25 é mostrada a estrutura geral das moléculas propostas. Considerando-se a conjugação do anel aromático com a ligação dupla, pretende-se avaliar o efeito do substituinte R na atividade, sendo R referente a grupos doadores ou retiradores de densidade eletrônica.

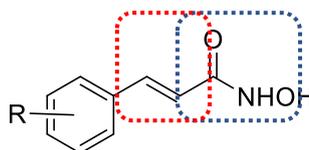
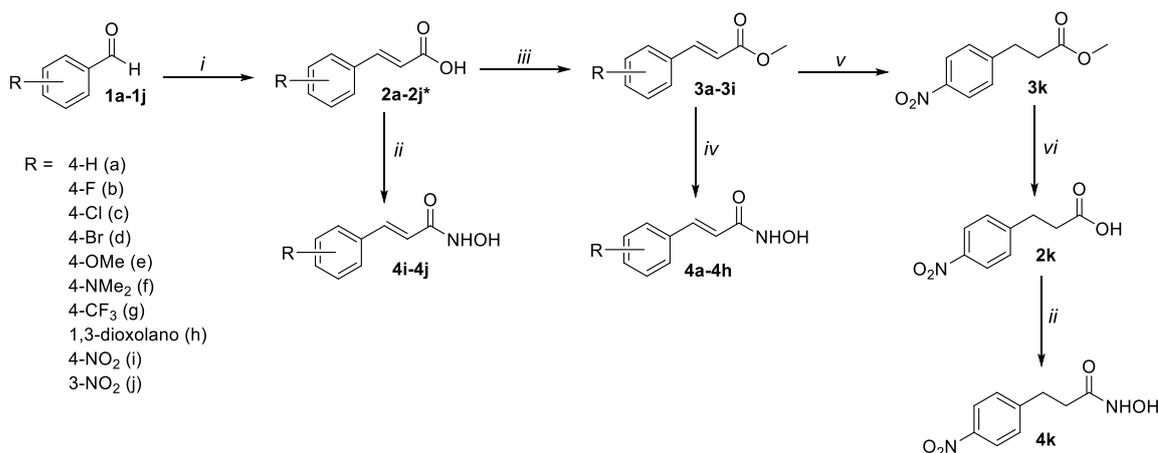


Figura 25. Estrutura geral dos compostos sintetizados

A rota sintética para a obtenção dos compostos propostos é mostrada no Esquema 9. A síntese foi planejada para a obtenção dos ácidos hidroxâmicos partindo-se dos benzaldeídos correspondentes. Portanto, a primeira etapa reacional consistiu na obtenção dos respectivos ácidos cinâmicos por meio de uma condensação de Knoevenagel entre o benzaldeído correspondente e ácido malônico na presença de piperidina em etanol. Para a síntese dos compostos **4a-4h**, os ácidos cinâmicos foram esterificados utilizando-se cloreto de trimetilsilila (TMSCl) em metanol, fornecendo os produtos **3a-3i**. Posteriormente, os ésteres obtidos foram reagidos com cloridrato de hidroxilamina em metanol e meio básico (pH > 10) para a formação dos ácidos hidroxâmicos pretendidos. Com o objetivo de se conseguir melhores rendimentos, os compostos **4i** e **4j** foram obtidos da conversão direta dos ácidos cinâmicos aos seus respectivos ácidos hidroxâmicos utilizando-se *N,N'*-carbonildiimidazol (CDI) e cloridrato de hidroxilamina. Considerando-se a hipótese de que a hibridação molecular entre aceptores de Michael e ácidos hidroxâmicos promova um efeito positivo na atividade anti-ureolítica, o derivado **4k** foi proposto para avaliar o resultado da ausência da ligação dupla.



Esquema 9. Rota sintética dos compostos **4a-4k**. i) Ácido malônico, piperidina, EtOH, 70 °C, MO, 45 min.; ii) CDI, NH₂OH.HCl, THF anidro, atmosfera inerte, temperatura ambiente, 48 h.; iii) TMSCl, MeOH, refluxo, 24 h.; iv) KOH, NH₂OH.HCl, MeOH, temperatura ambiente, 6-24 h.; v) RhCl(PPh₃)₃, THF anidro e desgaseificado, H₂ 2 atm, 24 h.; vi) NaOH, H₂O, MeOH, temperatura ambiente, 24 h. * O composto **2d** foi obtido de fontes comerciais.

Os compostos sintetizados foram avaliados em relação a sua atividade inibidora de urease por meio do método do indofenol utilizando o ácido acetoidroxâmico (AAH) como referência. Inicialmente foi realizada uma triagem para determinar se os compostos apresentavam atividade similar ou superior ao AAH, sendo direcionados para a determinação de CI₅₀ (concentração inibitória média) aqueles que apresentaram as maiores médias de inibição. Os compostos também foram avaliados quanto aos seus efeitos sobre os parâmetros cinéticos da enzima urease, determinando-se os tipos de inibição e as constantes de dissociação dos complexos enzima-substrato.

Com o objetivo de se compreender melhor a interação entre os ácidos cinamoilidroxâmicos e a urease, foram realizados estudos de biofísica utilizando as técnicas de fluorescência e UV-vis em parceria com o grupo de pesquisa do professor Dr. Josué C. C. Santos do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

4. EXPERIMENTAL

4.1. Técnicas de caracterização e análises

4.1.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises por cromatografia em camada delgada foram realizadas utilizando-se placas POLYGRAM-UV254 de 0,20 mm da Macherey-Nagel e os compostos foram visualizados em câmara escura ultravioleta com lâmpadas de comprimento de onda igual a 254 nm.

4.1.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos em equipamento Bruker 400 Nanobay, operando a 400 MHz para experimentos de ^1H e a 100 MHz para experimentos de ^{13}C . Os espectros foram calibrados utilizando tetrametilsilano (TMS) como referência interna.

4.1.3. Infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR, do inglês *Fourier Transform Infrared*) no modo de reflexão total atenuada (ATR, do inglês *Attenuated Total Reflectance*) foram obtidos em equipamento modelo Perkin Elmer Frontier operando na faixa de 600-4000 cm^{-1} .

4.1.4. Faixas de fusão

Os compostos sólidos foram caracterizados pelos seus pontos de fusão medidos em equipamento Gehaka PF1500 Farma.

4.1.5. Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HR-MS)

Os compostos utilizados nos testes *in vitro* foram caracterizados por espectrometria de massas de alta resolução (HR-MS) em espectrômetro IT-TOF Shimadzu utilizando ionização por *eletrospray* (ESI).

4.1.6. Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN)

Os compostos utilizados nos testes *in vitro* também foram caracterizados por análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio em Analisador CHNS/O 2400 Series II Perkin-Elmer (modelo: 2400 Series II).

4.1.7. Titulação espectrofluorimétrica

Os experimentos de titulação espectrofluorimétrica foram realizados em equipamento Shimadzu RF-5301PC equipado com lâmpada de xenônio (150 W) e cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 cm. Em todos os experimentos utilizou-se água ultrapura (18,2 MΩ cm) produzida pelo sistema Master MS2000 Gehaka.

4.1.8. Absorção molecular

As medidas de absorção molecular foram realizadas em espectrômetro Micronal AJX-6100PC de feixe duplo e equipado com cubetas de quartzo de caminho ótico de 1 cm.

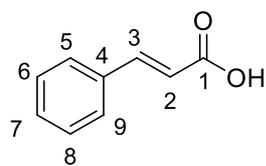
4.2. Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes utilizados foram adquiridos de fontes comerciais, com exceção dos solventes acetato de etila e hexano que foram destilados antes do uso. Todos os ácidos cinâmicos foram sintetizados, com exceção do ácido 4-bromocinâmico (Sigma-Aldrich) que foi obtido de fontes comerciais. A enzima urease utilizada nos testes *in vitro* é do tipo III proveniente da espécie *Canavalia ensiformis* (*jack bean urease*).

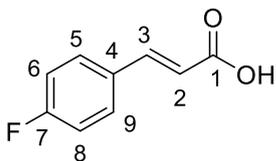
4.3. Síntese

4.3.1. Procedimento geral de síntese dos compostos 2a-2j

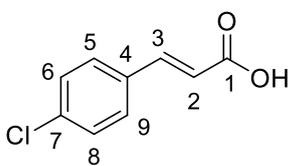
Procedimento adaptado de Pellón *et al.*¹⁰⁰ Em um balão de fundo redondo foram adicionados 7,37 mmol (0,75 mL) de benzaldeído ou seus derivados, 11,1 mmol (1,16 g) de ácido malônico, 11,1 mmol (1,1 mL) de piperidina e 5,0 mL de etanol. Em seguida, a mistura reagente foi irradiada em reator de micro-ondas em frasco aberto a 70 °C e 300 W por 45 minutos, sendo 5 minutos de rampa de aquecimento. Após o término da reação, adicionaram-se ao balão aproximadamente 10 mL de água destilada fria e o pH foi ajustado para 3 com ácido clorídrico 37% m/v. O ajuste do pH levou à precipitação de um sólido. O sólido foi filtrado, lavado com água destilada gelada e seco em bomba de vácuo.

4.3.1.1. Ácido cinâmico (**2a**)

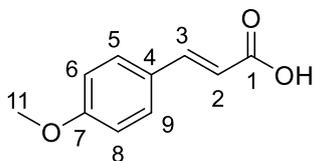
Sólido branco; rendimento: 56%; faixa de fusão: 133,2-135,1 °C (lit. 134-136 °C¹⁰¹); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6,45 (d, 1H, *J*=16,0 Hz, H2); 7,38-7,42 (m, 3H, H6, H7 e H8), 7,54 (d, 2H, *J*=16,0 Hz, H3), 7,58-7,61 (m, 2H, H5 e H9); RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 119,5 (C2), 129,1 (C5 e C9), 130,0 (C6 e C8), 131,5 (C7), 134,7 (C4), 145,5 (C3), 169,2 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm⁻¹) $\tilde{\nu}$: 3026, 2826, 2592, 2522, 1683, 1678, 1630, 1578, 1493, 1450, 1422, 1314, 1288, 1206, 1176, 1068, 972, 933, 872, 764, 704, 674.

4.3.1.2. Ácido (*E*)-3-(4-Fluorofenil)acrílico (**2b**)

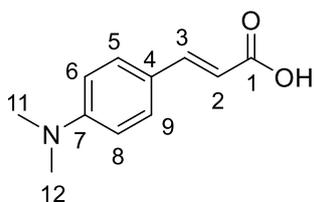
Sólido branco; rendimento: 53%; faixa de fusão: 207,6-211,4 °C (lit. 205,8-207,4 °C¹⁰²); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6,49 (d, 1H, *J*=16,0 Hz, H2), 7,22-7,30 (m, 2H, H6 e H8), 7,54 (d, 1H, *J*=16,0 Hz, H3), 7,74-7,78 (m, 2H, H5 e H9), 12,41 (s, 1H, OH); RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 115,9 (d, *J*=21,8 Hz, C6 e C8), 119,1 (d, *J*=2,8 Hz, C2), 130,5 (d, *J*=8,7 Hz, C5 e C9), 130,9 (d, *J*=3,1 Hz, C4), 142,7 (C3), 163,2 (d, *J*=246,8 Hz, C7), 167,5 (C1), IV (ATR, 600-4000 cm⁻¹) $\tilde{\nu}$: 2831, 2606, 1886, 1684, 1626, 1598, 1506, 1426, 1318, 1286, 1226, 1157, 1092, 982, 934, 864, 825, 784, 740, 690, 638.

4.3.1.3. Ácido (*E*)-3-(4-Clorofenil)acrílico (**2c**)

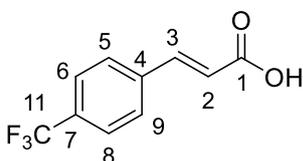
Sólido branco; rendimento: 61%; faixa de fusão: 250,2-254,4 °C (lit. 247,1-250,5 °C¹⁰²); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6,54 (d, 1H, *J*=16,0 Hz, H2), 7,46 (d, 2H, *J*=8,0 Hz, H6 e H8), 7,57 (d, 1H, *J*=16,0 Hz, H3); 7,71 (d, 2H, *J*=8,0 Hz, H5 e H9), 12,46 (s, 1H, OH); RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 120,1 (C2), 129,0 (C6 e C8), 130,0 (C5 e C9), 133,2 (C4), 134,7 (C7), 142,6 (C3), 167,5 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm⁻¹) $\tilde{\nu}$: 2822, 2530, 1901, 1675, 1626, 1592, 1570, 1490, 1428, 1405, 1306, 1284, 1224, 1177, 1084, 1013, 984, 942, 875, 820, 736, 716, 656.

4.3.1.4. Ácido (*E*)-3-(4-Metoxifenil)acrílico (**2e**)

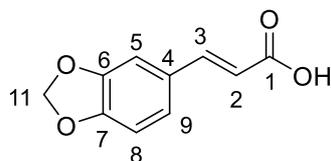
Sólido amarelo; rendimento: rendimento: 80%; faixa de fusão: 172,2-174,1 °C (lit. 170-171 °C¹⁰¹); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 3,79 (s, 3H, H11), 6,37 (d, ¹H, *J*=16,0 Hz, H2), 6,97 (d, 2H, *J*=8,8 Hz, H6 e H8), 7,54 (d, 1H, *J*=16,0 Hz, H3), 7,63 (d, 2H, *J*=8,8 Hz, H5 e H9), 12,21 (s, 1H, OH); RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 55,3 (C11), 114,4 (C6 e C8), 116,5 (C2), 126,8 (C4), 129,9 (C5 e C9), 143,7 (C3), 160,9 (C7), 167,8 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm⁻¹) $\tilde{\nu}$: 2938, 2844, 2564, 2516, 1889, 1674, 1622, 1597, 1512, 1445, 1315, 1254, 1218, 1173, 1116, 1028, 936, 823, 775, 686.

4.3.1.5. Ácido (*E*)-3-(4-(Dimetilamino)fenil)acrílico (**2f**)

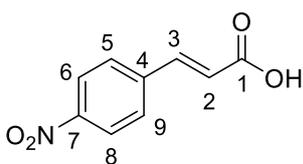
Sólido amarelo; rendimento: 44%; faixa de fusão: 225,5 °C (lit. 216 °C¹⁰³); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2,96 (s, 6H, H11 e H12), 6,20 (d, 1H, *J*=15,6 Hz, H2), 6,70 (d, 2H, *J*=8,4 Hz, H6 e H8), 7,45-7,49 (m, 3H, H3, H5 e H9), 11,95 (s, 1H, OH); RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 39,7 (C11 e C12), 111,8 (C6 e C8), 112,9 (C2), 121,5 (C4), 129,7 (C5 e C9), 144,7 (C3), 151,6 (C7), 168,2 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm⁻¹) $\tilde{\nu}$: 2906, 2806, 2586, 1666, 1593, 1526, 1420, 1368, 1309, 1261, 1228, 1188, 1065, 988, 942, 858, 813, 736, 676.

4.3.1.6. Ácido (*E*)-3-(4-(Trifluorometil)fenil)acrílico (**2g**)

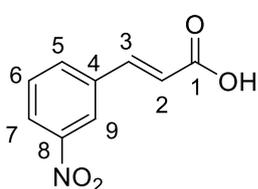
Sólido branco; rendimento: 43%; faixa de fusão: 231,1-234,1 °C (lit. 231-233 °C¹⁰⁴); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6,68 (d, 1H, *J*=16,2 Hz, H2), 7,66 (d, 1H, *J*=16,2 Hz, H3), 7,76 (d, 2H, *J*=8,0 Hz, H6 e H8), 7,92 (d, 2H, *J*=8,0 Hz, H5 e H9), 12,61 (s, 1H, OH); RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 122,6 (C2), 124,5 (q, *J*=273,3 Hz, C11), 126,2 (q, *J*=4,0 Hz, C6 e C8), 129,3 (C5 e C9), 130,3 (q, *J*=31,5 Hz, C7), 138,8 (C4), 142,5 (C3), 167,7 (C1), IV (ATR, 600-4000 cm⁻¹) $\tilde{\nu}$: 2990, 2834, 2592, 2540, 1690, 1632, 1580, 1428, 1316, 1286, 1224, 1174, 1112, 1066, 1015, 980, 910, 830, 762, 698, 638.

4.3.1.7. Ácido (*E*)-3-(Benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)acrílico (**2h**)

Sólido amarelo; rendimento: 53%; faixa de fusão: 234,5-236,8 °C (lit, 242-244 °C¹⁰⁵); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6,07 (s, 2H, H11), 6,39 (d, 1H, *J*=16,0 Hz, H2), 6,94 (d, 1H, *J*=8,1 Hz, H8), 7,15 (dd, 1H, *J*=8,1 Hz e *J*=2,0 Hz, H9), 7,36 (d, 1H, *J*=2,0 Hz, H5), 7,50 (d, 1H, *J*=16,0 Hz, H3), 12,24 (s, 1H, OH); RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 101,5 (C11), 106,7 (C5), 108,5 (C8), 117,1 (C2), 124,6 (C9), 128,7 (C4), 143,8 (C3), 148,0 (C7), 149,1 (C6), 167,8 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm⁻¹) $\tilde{\nu}$: 2903, 2837, 2786, 2714, 2605, 2560, 2512, 1691, 1626, 1604, 1493, 1448, 1422, 1318, 1250, 1217, 1102, 1038, 982, 926, 844, 805, 736, 695.

4.3.1.8. Ácido (*E*)-3-(4-Nitrofenil)acrílico (**2i**)

Sólido amarelo; rendimento: 59%; faixa de fusão: 277,5-278,8 °C (lit. 288-290 °C¹⁰⁵); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6,74 (d, 1H, *J*=16,0 Hz, H2), 7,69 (d, 1H, *J*=16,0 Hz, H3), 7,97 (d, 2H, *J*=9,0 Hz, H5 e H9), 8,23 (d, 2H, *J*=9,0 Hz, H6 e H8), 12,73 (s, 1H, OH); RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 123,6 (C2), 123,9 (C6 e C8), 129,3 (C5 e C9), 140,8 (C4), 141,3 (C3), 148,0 (C7), 167,0 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm⁻¹) $\tilde{\nu}$: 3114, 2846, 2586, 1934, 1684, 1630, 1596, 1520, 1426, 1339, 1307, 1284, 1210, 1110, 986, 960, 920, 868, 847, 833, 760, 710, 672.

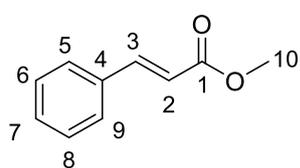
4.3.1.9. Ácido (*E*)-3-(3-Nitrofenil)acrílico (**2j**)

Sólido branco; rendimento: 34%; faixa de fusão: 201,8-203,2 °C (lit. 199-202 °C¹⁰⁶); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6,74 (d, 1H, *J*=16,0 Hz, H2), 7,68-7,74 (m, 2H, H3 e H6), 8,18 (d, 1H, *J*=8,0, H5), 8,23 (dd, 2H, *J*=8,0 Hz e *J*=2,1 Hz, H7), 8,52 (t, 1H, *J*=2,1 Hz, H9); RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 122,3 (C2), 122,9 (C9), 124,4 (C7), 130,4 (C6), 134,1 (C5), 136,2 (C4), 141,5 (C3), 148,4 (C8), 167,2 (C1), IV (ATR, 600-4000 cm⁻¹) $\tilde{\nu}$: 2972, 2828, 2599, 1690, 1634, 1522, 1444, 1418, 1358, 1304, 1278, 1218, 1102, 979, 920, 868, 826, 803, 746, 714, 672, 660.

4.3.2. Procedimento geral de síntese dos compostos 3a-3i

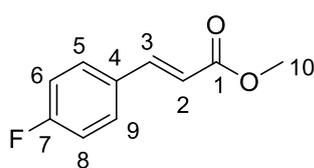
Procedimento adaptado de Eras Joli *et al.*¹⁰⁷ Em um balão de fundo redondo foram adicionados 10,3 mmol (1,52 g) de ácido cinâmico (composto **2a**) ou seus análogos, 20,6 mmol (2,7 mL) de cloreto de trimetilsilila e 30 mL de metanol. A reação foi mantida sob refluxo e atmosfera inerte e monitorada por análises de CCD. Após 20 h o ácido cinâmico foi completamente consumido. Em seguida, adicionaram-se 50 mL de acetato de etila à mistura reagente e extraíram-se duas vezes com 50 mL de solução aquosa de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio e filtrada. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida para obtenção do produto.

4.3.2.1. Cinamato de metila (**3a**)

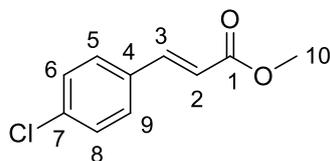


Óleo amarelo; rendimento: 87%; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 3,72 (s, 3H, H10), 6,64 (d, 1H, $J=16,0$ Hz, H2), 7,42-7,45 (m, 3H, H6, H8 e H7), 7,66 (d, 1H, $J=16,0$ Hz, H3), 7,70-7,75 (m, 2H, H5 e H9); RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 51,5 (C10), 117,9 (C2), 128,4 (C5 e C9), 129,0 (C6 e C8), 130,6 (C7), 134,0 (C4), 144,6 (C3), 166,7 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm^{-1}) $\tilde{\nu}$: 2948, 2848, 1712, 1638, 1578, 1495, 1438, 1330, 1282, 1200, 1172, 1076, 1014, 984, 936, 870, 833, 770, 712, 688,

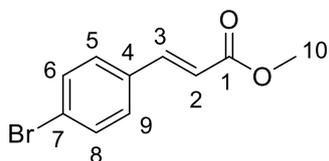
4.3.2.2. (*E*)-3-(4-Fluorofenil)acrilato de metila (**3b**)



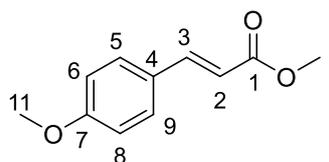
Óleo amarelo; rendimento: 92%; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 3,72 (s, 3H, H10), 6,61 (d, 1H, $J=16,0$ Hz, H2), 7,23-7,27 (m, 2H, H6 e H8), 7,66 (d, 1H, $J=16,0$ Hz, H3), 7,78-7,81 (m, 2H, H5 e H9); RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 51,5 (C10), 115,9 (d, $J=21,7$ Hz, C6 e C8), 117,6 (C2), 130,7 (d, $J=9,0$ Hz, C5 e C9), 130,7 (C4), 143,3 (C3), 163,3 (d, $J=246,9$ Hz, C7), 166,6 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm^{-1}) $\tilde{\nu}$: 2958, 2850, 1706, 1633, 1600, 1510, 1436, 1417, 1318, 1283, 1223, 1202, 1160, 1098, 1005, 939, 832, 782, 712, 692.

4.3.2.3. (*E*)-3-(4-Clorofenil)acrilato de metila (**3c**)

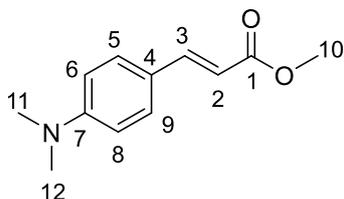
Sólido amarelo; rendimento: 91%; faixa de fusão: 74-75 °C (lit. 74-75 °C¹⁰⁸); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 3,72 (s, 3H, H10), 6,66 (d, 1H, *J*=16,0 Hz, H2), 7,47 (d, 2H, *J*=8,0 Hz, H6 e H8), 7,65 (d, 1H, *J*=16,0 Hz, H3), 7,75 (d, 2H, *J*=8,0 Hz, H5 e H9); RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 51,5 (C1), 118,6 (C2), 128,9 (C6 e C8), 130,1 (C5 e C9), 133,0 (C4), 135,0 (C7), 143,1 (C3), 166,5 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm⁻¹) $\tilde{\nu}$: 2952, 2850, 1704, 1634, 1592, 1490, 1432, 1408, 1315, 1192, 1168, 1101, 1081, 939, 876, 832, 820, 732, 690.

4.3.2.4. (*E*)-3-(4-Bromofenil)acrilato de metila (**3d**)

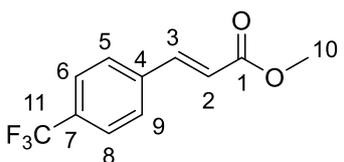
Sólido amarelo; rendimento: 96%; faixa de fusão: 87,0-88,8 °C (lit. 89 °C¹⁰⁹); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 3,72 (s, 3H, H10), 6,68 (d, 1H, *J*=16,0 Hz, H2), 7,60-7,69 (m, 5H, H3-H9); RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 51,5 (C10), 118,7 (C2), 123,8 (C7), 130,3 (C4), 131,9 (C5 e C9), 133,3 (C6 e C8), 143,2 (C3), 166,5 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm⁻¹) $\tilde{\nu}$: 2949, 2850, 1710, 1631, 1587, 1490, 1432, 1406, 1314, 1206, 1194, 1167, 1072, 1002, 936, 874, 835, 816, 728, 688, 630.

4.3.2.5. (*E*)-3-(4-Metoxifenil)acrilato de metila (**3e**)

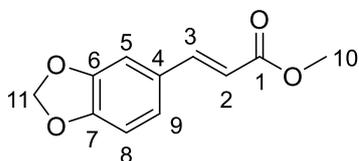
Sólido branco; rendimento: 94%; faixa de fusão: 82,3-86,2 °C (lit. 86 °C¹⁰⁹); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 3,70 (s, 3H, H10), 3,79 (s, 3H, H11), 6,48 (d, 1H, *J*=16,0 Hz, H2), 6,97 (d, 2H, *J*=8,0 Hz, H6 e H8), 7,59-7,68 (m, 3H, H3, H5 e H9); RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 51,3 (C10), 55,3 (C11), 114,4 (C6 e C8), 115,1 (C2), 126,6 (C4), 130,1 (C5 e C9), 144,3 (C3), 161,2 (C7), 166,5 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm⁻¹) $\tilde{\nu}$: 2950, 2844, 1714, 1637, 1602, 1576, 1512, 1433, 1332, 1288, 1254, 1205, 1168, 1112, 1026, 984, 934, 838, 818, 768, 637.

4.3.2.6. (*E*)-3-(4-(Dimetilamino)fenil)acrilato de metila (**3f**)

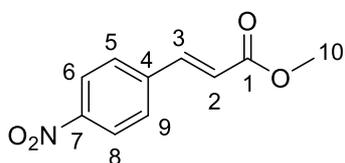
Sólido amarelo; rendimento: 43%; faixa de fusão: 112,7-115,1 °C (lit. 134-136 °C¹¹⁰); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 2,97 (s, 6H, H11 e H12), 3,68 (s, 3H, H10), 6,31 (d, 1H, *J*=12,0 Hz, H2), 6,70 (d, 2H, *J*=8,0 Hz, H6 e H8), 7,13 (d, 1H, *J*=12,0 Hz, H3), 7,51 (m, 2H, H5 e H9); RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 39,7 (C11 e C12), 51,1 (C10), 111,7 (C6 e C8), 112,2 (C2), 121,3 (C4), 129,9 (C5 e C9), 145,2 (C3), 151,8 (C7), 167,3 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm⁻¹) $\tilde{\nu}$: 2947, 2848, 2816, 1736, 1700, 1597, 1524, 1442, 1368, 1330, 1307, 1264, 1222, 1186, 1158, 1068, 1018, 984, 936, 858, 812, 737, 696.

4.3.2.7. (*E*)-3-(4-(Trifluorometil)fenil)acrilato de metila (**3g**)

Sólido branco; rendimento: 95%; faixa de fusão: 76,7-78,6 °C (lit. 77-79 °C¹⁰⁸); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3,75 (s, 3H, H10), 6,81 (d, 1H, *J*=16,0 Hz, H2), 7,72-7,79 (m, 3H, H3, H6 e H8), 7,96 (d, 2H, *J*=8,0 Hz, H5 e H9); RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 124,0 (q, *J*=270,7 Hz, C11), 120,7 (C2), 125,7 (q, *J*=3,8 Hz, C6 e C8), 129,0 (C5 e C9), 130,1 (q, *J*=31,6 Hz, C7), 138,0 (C4), 142,7 (C3), 166,3 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm⁻¹) $\tilde{\nu}$: 2958, 2850, 1710, 1640, 1617, 1580, 1438, 1418, 1316, 1286, 1198, 1160, 1108, 1065, 994, 938, 833, 754, 722, 638.

4.3.2.8. (*E*)-3-(Benzo[*d*][1,3]dioxolo-5-il)acrilato de metila (**3h**)

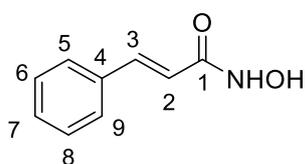
Sólido branco; rendimento: 77%; faixa de fusão: 126,3-128,8 °C (lit. 128-130 °C¹¹¹); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3,70 (s, 1H, H10), 6,07 (s, 2H, H11), 6,51 (d, 1H, *J*=16,0 Hz, H2), 6,95 (d, 1H, *J*=8,0 Hz, H8), 7,20 (d, 1H, *J*=8,0 Hz, H9), 7,40 (s, 1H, H5), 7,57 (d, 1H, *J*=16,0 Hz, H3); RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 51,3 (C10), 101,6 (C11), 106,7 (C5), 108,5 (C8), 115,7 (C2), 125,0 (C9), 128,5 (C4), 144,4 (C3), 148,1 (C7), 149,4 (C6), 166,9 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm⁻¹) $\tilde{\nu}$: 2952, 2903, 1700, 1623, 1600, 1506, 1496, 1451, 1368, 1305, 1254, 1202, 1170, 1126, 1107, 1036, 1005, 932, 918, 866, 821, 726, 712.

4.3.2.9. (*E*)-3-(4-Nitrofenil)acrilato de metila (**3i**)

Sólido amarelo; rendimento: 77%; faixa de fusão: 105-111 °C (lit. 118-119 °C¹¹²); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 3,75 (s, 3H, H10), 6,86 (d, 1H, *J*=16,0 Hz, H2), 7,77 (d, 1H, *J*=16,0 Hz, H3), 8,01 (d, 2H, *J*=8,0 Hz, H5 e H9), 8,24 (d, 2H, *J*=8,0 Hz, H6 e H8); RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 51,8 (C10), 122,1 (C2), 123,9 (C6 e C8), 129,5 (C5 e C9), 140,4 (C4), 142,0 (C3), 148,1 (C7), 166,2 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm⁻¹) $\tilde{\nu}$: 2956, 2920, 2850, 1726, 1600, 1508, 1436, 1341, 1272, 1198, 1170, 1108, 1064, 922, 955, 854, 819, 744, 705.

4.3.3. Procedimento geral de síntese dos compostos 4a-4h

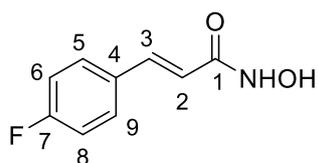
Procedimento adaptado de Wagner, F. *et al.*¹¹³ Em um balão de fundo redondo, 13,9 mmol (0,97 g) de cloridrato de hidroxilamina foram dissolvidos em 15 mL de metanol. O balão foi colocado em banho de gelo e 27,9 mmol (1,84 g) de hidróxido de potássio foram adicionados lentamente. A reação foi agitada durante 30 minutos e observou-se a precipitação de cloreto de potássio. Em seguida, adicionaram-se 6,7 mmol (1,09 g) de cinamato de metila (**3a**) ou seus análogos e deixou-se reagir à temperatura ambiente durante 5 horas. O KCl precipitado foi filtrado e o metanol removido sob pressão reduzida obtendo-se um sólido amarelo. O sólido foi dissolvido em 12 mL de água destilada e o pH ajustado para 7 com ácido clorídrico 37% m/v para precipitação de um sólido. O sólido foi filtrado, lavado com água destilada e transferido para um balão de fundo redondo contendo uma solução aquosa de ácido clorídrico pH 1. A mistura foi agitada durante aproximadamente 5 minutos e filtrada a vácuo para obtenção de um sólido.

4.3.3.1. *N*-hidroxicinamida (**4a**)

Sólido branco; rendimento: 47%; faixa de fusão: 119,1-120,4 °C (lit. 127-130 °C¹¹⁴); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6,47 (d, 1H, *J*=16,0 Hz, H2), 7,38-7,48 (m, 4H, H3, H6, H7 e H8), 7,56 (d, 2H, *J*=8,0 Hz, H5 e H9), 9,07 (s, 1H, NH), 10,76 (s, 1H, OH); RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 119,1 (C2), 127,6 (C5 e C9), 129,1 (C6 e C8), 129,6 (C7),

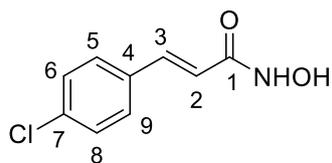
134,9 (C4), 138,5 (C3), 162,8 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm^{-1}) $\tilde{\nu}$: 3254, 3049, 2642, 1665, 1558, 1449, 1354, 1064, 1000, 968, 854, 762, 710; Análise elementar (%): Calculado: C, 66,25; H, 5,56; N, 8,58. Experimental: C, 66,06; H, 5,47; N, 8,33; HRMS-ESI (m/z): Calculado para $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_2$ (M+Na) $^+$: 186,0531; Experimental: 186,0570.

4.3.3.2. (E)-3-(4-Fluorofenil)-N-hidroxiacrilamida (**4b**)

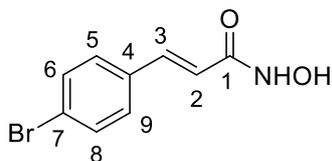


Sólido branco; rendimento: 56%; faixa de fusão: 145,0-145,8 °C; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 6,40 (d, 1H, $J=16,0$ Hz, H2), 7,22-7,28 (m, 2H, H6 e H8), 7,45 (d, 2H, $J=16,0$ Hz, H3), 7,60-7,66 (m, 2H, H5 e H9), 9,05 (s, 1H, NH), 10,75 (s, 1H, OH); RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 115,9 (d, $J=20,0$ Hz, C6 e C8), 119,0 (C2), 129,7 (d, $J=9,0$ Hz, C5 e C9), 131,5 (C4), 137,2 (C3), 162,7 (d, $J=240,0$ Hz, C7), 162,7 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm^{-1}) $\tilde{\nu}$: 3256, 3054, 2748, 1668, 1635, 1600, 1510, 1414, 1355, 1231, 1160, 1100, 1062, 1002, 969, 826, 736; Análise elementar (%): Calculado: C, 59,67; H, 4,45; N, 7,73. Experimental: C, 57,85; H, 4,54; N, 7,27; HRMS-ESI (m/z): Calculado para $\text{C}_9\text{H}_8\text{FNO}_2$ (M+Na) $^+$: 204,0437; Experimental: 204,0449.

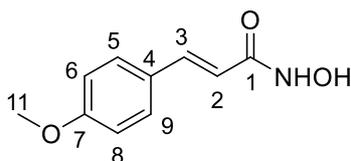
4.3.3.3. (E)-3-(4-Clorofenil)-N-hidroxiacrilamida (**4c**)



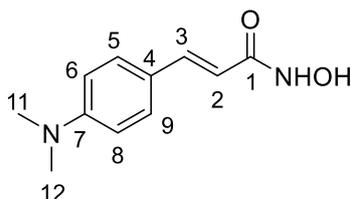
Sólido branco; rendimento: 67%; faixa de fusão: 160,9-161,8 °C; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 6,46 (d, 1H, $J=16,0$ Hz, H2), 7,43-7,47 (m, 3H, H6, H8 e H3), 7,56 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, H5 e H9), 9,08 (s, 1H, NH), 10,79 (s, 1H, OH); RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 119,9 (C2), 129,0 (C6 e C8 ou C5 e C9), 129,2 (C5 e C9 ou C6 e C8), 133,8 (C4 ou C7), 133,9 (C7 ou C4), 137,0 (C3), 162,5 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm^{-1}) $\tilde{\nu}$: 3254, 3055, 2642, 1665, 1634, 1568, 1492, 1440, 1406, 1353, 1065, 1013, 970, 821, 763, 734; Análise elementar (%): Calculado: C, 54,70; H, 4,08; N, 7,09. Experimental: C, 55,28; H, 4,00; N, 6,82; HRMS-ESI (m/z): Calculado para $\text{C}_9\text{H}_8\text{ClNO}_2$ (M+Na) $^+$: 220,0141; Experimental: 220,0121.

4.3.3.4. (*E*)-3-(4-Bromofenil)-*N*-hidroxiacrilamida (**4d**)

Sólido branco; rendimento: 81%; faixa de fusão: 160,9-164,3 °C; RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 6,48 (d, 1H, $J=16,0$ Hz, H2), 7,43 (d, 1H, $J=16,0$ Hz, H3), 7,52 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, H5 e H9), 7,60 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, H6 e H8), 9,08 (s, 1H, NH), 10,79 (s, 1H, OH); RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 120,0 (C2), 122,6 (C7), 129,4 (C5 e C9), 131,9 (C6 e C8), 134,1 (C4), 137,1 (C3), 162,5 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm^{-1}) $\tilde{\nu}$: 3260, 3051, 2658, 1666, 1583, 1489, 1440, 1402, 1067, 1010, 970, 818, 760, 734; Análise elementar (%): Calculado: C, 44,66; H, 3,33; N, 5,79. Experimental: C, 44,63; H, 3,26; N, 5,58; HRMS-ESI (m/z): Calculado para $\text{C}_9\text{H}_8\text{BrNO}_2$ (M+H) $^+$: 263,9636; Experimental: 263,9555.

4.3.3.5. (*E*)-3-(4-Metoxifenil)-*N*-hidroxiacrilamida (**4e**)

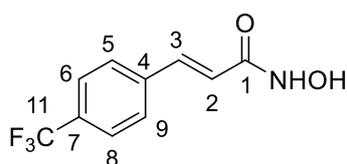
Sólido branco; rendimento: 54%; faixa de fusão: 145,8-147,0 °C (lit. 141-142°C¹¹⁵); RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 3,78 (s, 3H, H11), 6,32 (d, 1H, $J=16,0$ Hz, H2), 6,96 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, H6 e H8), 7,40 (d, 1H, $J=16,0$ Hz, H3), 7,50 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, H5 e H9), 8,97 (s, 1H, NH), 10,66 (s, 1H, OH); RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 55,3 (C11), 114,4 (C6 e C8), 116,5 (C2), 127,4 (C4), 129,1 (C5 e C9), 138,0 (C3), 160,3 (C7), 163,2 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm^{-1}) $\tilde{\nu}$: 3258, 3062, 2736, 1662, 1604, 1564, 1512, 1468, 1440, 1419, 1352, 1304, 1244, 1176, 1102, 1065, 1028, 1002, 971, 823, 787; Análise elementar (%): Calculado: C, 62,17; H, 5,74; N, 7,25. Experimental: C, 61,05; H, 5,30; N, 6,92; HRMS-ESI (m/z): Calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (M+Na) $^+$: 216,0637; Experimental: 216,0604.

4.3.3.6. (*E*)-3-(4-(Dimetilamino)fenil)-*N*-hidroxiacrilamida (**4f**)

Sólido marrom; rendimento: 29%; faixa de fusão: 159,9-162,0 °C; RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 2,94 (s, 6H, H11 e H12), 6,19 (d, 1H, $J=12,0$ Hz, H2), 6,71 (d, 2H, $J=12,0$ Hz, H6 e H8), 7,31-7,38 (m, 3H, H3, H5 e H9), 8,88 (s, 1H, NH), 10,53 (s, 1H, OH); RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 39,8 (C11 e C12), 112,0 (C6 e C8), 113,3 (C2), 122,3 (C4), 128,8 (C5 e C9), 138,9 (C3), 151,1 (C7), 163,9 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm^{-1}) $\tilde{\nu}$: 3136, 2850, 1658, 1596, 1516, 1478, 1444, 1342, 1238, 1186,

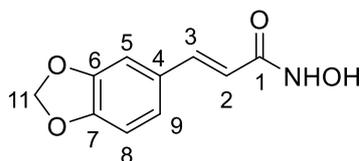
1163, 1126, 1049, 995, 936, 816, 702; Análise elementar (%): Calculado: C, 64,06; H, 6,84; N, 13,58. Experimental: C, 63,83; H, 6,41; N, 12,33; HRMS-ESI (m/z): Calculado para $C_{11}H_{14}N_2O_2$ (M+Na)⁺: 229,0953; Experimental: 229,0914.

4.3.3.7. (*E*)-3-(4-(Trifluorometil)fenil)-*N*-hidroxiacrilamida (**4g**)



Sólido branco; rendimento: 52%; faixa de fusão: 141,1-142,8 °C; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6,59 (d, 1H, *J*=16,0 Hz, H2), 7,53 (d, 1H, *J*=16,0 Hz, H6 e H8), 7,74-7,82 (m, 4H, H3, H5 e H9), 9,15 (s, 1H, NH), 10,86 (s, 1H, OH); ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 122,0 (C2), 124,2 (q, *J*=272,7 Hz, C11), 125,8 (q, *J*=3,95 Hz, C6 e C8), 129,2 (q, *J*=31,8 Hz, C7), 128,1 (C5 e C9), 136,7 (C4), 138,9 (C3), 162,2 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm⁻¹) $\tilde{\nu}$: 3197, 3041, 2886, 1652, 1603, 1418, 1319, 1164, 1131, 1109, 1056, 1017, 982, 960, 826, 740, 625; Análise elementar (%): Calculado: C, 51,96; H, 3,49; N, 6,06. Experimental: C, 52,06; H, 3,32; N, 5,88; HRMS-ESI (m/z): Calculado para $C_{10}H_8F_3NO_2$ (M-H)⁻: 230,0429; Experimental: 230,0340.

4.3.3.8. (*E*)-3-(Benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)-*N*-hidroxiacrilamida (**4h**)

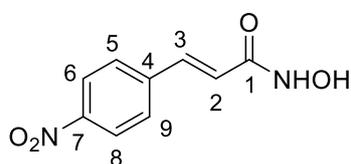


Sólido branco; rendimento: 33%; faixa de fusão: 140,2-141,7 °C; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6,05 (s, 2H, H11), 6,29 (d, 1H, *J*=15,8 Hz, H2), 6,93 (d, 1H, *J*=8,0 Hz, H8), 7,06 (d, 1H, *J*=8,0 Hz, H9), 7,14 (s, 1H, H5), 7,37 (d, 1H, *J*=15,8 Hz, H3), 8,97 (s, 1H, NH), 10,65 (s, 1H, OH); RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 101,4 (C11), 106,2 (C5), 108,6 (C8), 117,4 (C2), 123,1 (C9), 129,3 (C4), 137,8 (C3), 147,9 (C7), 148,4 (C6), 163,0 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm⁻¹) $\tilde{\nu}$: 3178, 3046, 2869, 1672, 1654, 1602, 1548, 1500, 1489, 1440, 1380, 1308, 1248, 1194, 1100, 1036, 970, 934, 860, 830, 802, 758, 636; Análise elementar (%): Calculado: C, 57,97; H, 4,38; N, 6,76. Experimental: C, 57,42; H, 4,16; N, 6,20; HRMS-ESI (m/z): Calculado para $C_{11}H_{14}N_2O_2$ (M+Na)⁺: 230,0429; Experimental: 230,0406.

4.3.4. Procedimento geral de síntese dos compostos 4i e 4j

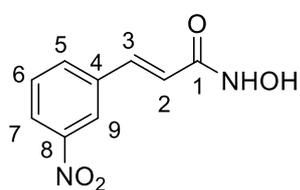
Procedimento adaptado de Usachova *et al.*¹¹⁶ Em um balão de fundo redondo foram adicionados 2,3 mmol (0,44 g) do composto **2i** ou **2j**, 3,4 mmol (0,61 g) de CDI (*N,N'*-carbonildimidazol) e 4,3 mL de THF anidro, deixando-se reagir sob atmosfera inerte e à temperatura ambiente. Após 4 horas de reação foram adicionados 6,8 mmol (0,4860 g) de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ e a reação mantida a temperatura ambiente e agitação por 5 dias. A reação foi monitorada por CCD e após o consumo do material de partida, foi adicionada água destilada até a precipitação de um sólido amarelo. O sólido foi filtrado a vácuo e seco.

4.3.4.1. (*E*)-3-(4-Nitrofenil)-*N*-hidroxiacrilamida (**4i**)



Sólido amarelo; rendimento: 90%; faixa de fusão: 159,5-163,0 °C; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 6,65 (d, 1H, $J=16,0$ Hz, H2), 7,57 (d, 1H, $J=16,0$ Hz, H3), 7,84 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, H5 e H9), 8,23 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, H6 e H8), 9,20 (s, 1H, NH), 10,94 (s, 1H, OH); RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 123,5 (C2), 124,1 (C6 e C8), 128,6 (C5 e C9), 136,1 (C4), 141,4 (C3), 147,5 (C7), 161,9 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm^{-1}) $\tilde{\nu}$: 3586, 3330, 3192, 3005, 2864, 1652, 1594, 1498, 1342, 1111, 1054, 1003, 979, 836, 754, 722; Análise elementar (%): Calculado: C, 51,93; H, 3,87; N, 13,46. Experimental: C, 50,38; H, 3,50; N, 12,86; HRMS-ESI (m/z): Calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ (M-H) $^-$: 207,0406; Experimental: 207,0352.

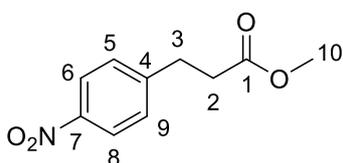
4.3.4.2. (*E*)-3-(3-Nitrofenil)-*N*-hidroxiacrilamida (**4j**)



Sólido branco; rendimento: 62%; faixa de fusão: 191,4-193,4 °C; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 6,65 (d, 1H, $J=16,0$ Hz, H2), 7,59 (d, 1H, $J=16,0$ Hz, H3), 7,70 (t, 1H, $J=8,3$ Hz, H6), 8,02 (d, 1H, $J=8,3$ Hz, H5), 8,20 (d, 1H, $J=8,3$ Hz, H7), 8,39 (s, 1H, H9), 9,16 (s, 1H, NH), 10,84 (s, 1H, OH); RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 121,6 (C2), 122,1 (C9), 123,7 (C7), 130,5 (C6), 133,8 (C5), 136,1 (C4), 136,7 (C3), 148,3 (C8), 162,1 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm^{-1}) $\tilde{\nu}$: 3164, 3038, 2957, 2854, 1656, 1616, 1553, 1525, 1438, 1348, 1057, 983, 939, 864, 834, 808, 780, 732, 675, 656; Análise elementar (%): Calculado: C, 51,93; H, 3,87; N, 13,46. Experimental: C, 52,07; H, 3,74; N, 12,94; HRMS-ESI (m/z): Calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ (M-H) $^-$: 207,0406; Experimental: 207,0374.

4.3.5. Procedimento de síntese do 3-(4-nitrofenil)propanoato de metila (3k)

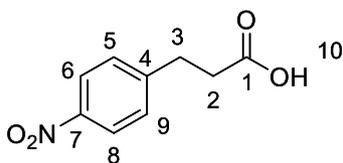
Procedimento adaptado de Vassiliou, S. *et al.*¹¹⁷ Em uma autoclave de alta pressão foram adicionados 1,13 mmol (0,23 g) do composto **3i** e 0,02 g de RhCl(PPh₃)₃ (catalisador de Wilkinson). O reator foi selado e purgado com um fluxo de argônio. Em seguida foram adicionados 5,0 mL de THF anidro e degaseificado. O recipiente do reator foi pressurizado a 2 atm com gás hidrogênio e seu conteúdo reagiu por 24 horas. Em seguida, a mistura reagente foi filtrada com celite e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando hexano:acetato de etila (2:1) como eluente.



Sólido branco; rendimento: 73%; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 2,68 (t, 2H, *J*=7,6 Hz, H₂), 3,06 (t, 2H, *J*=7,6 Hz, H₃), 3,68 (s, 3H, H₁₀), 7,37 (d, 2H, *J*=8,0 Hz, H₅ e H₉), 8,16 (d, 2H, *J*=8,0 Hz, H₆ e H₈); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ: 30,6 (C₃); 34,8 (C₂); 51,8 (C₁₀); 123,8 (C₆ e C₈); 129,2 (C₅ e C₉); 148,2 (C₄ e C₇); 172,6 (C₁). IV (ATR, 600-4000 cm⁻¹) $\tilde{\nu}$: 3113, 3084, 3017, 2958, 2856, 1728, 1608, 1597, 1515, 1454, 1431, 1297, 1191, 1170, 1110, 1056, 1014, 982, 965, 903, 853, 786, 750, 716, 688, 631.

4.3.6. Procedimento de síntese do ácido 3-(4-Nitrofenil)propanóico (2k)

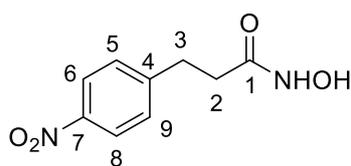
Em um balão de fundo redondo foram adicionados 1,37 mmol (0,28 g) do composto **3k**, 2,0 mmol (0,08 g) de hidróxido de sódio, 5,0 mL de água destilada e 5,0 mL de metanol. Após 24 horas de reação, o composto **3k** foi completamente hidrolisado. O pH foi ajustado para 3 com ácido clorídrico a 37% levando a precipitação do produto **2k**.



Sólido branco; rendimento: 79%; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 2,74 (t, 2H, *J*=7,6 Hz, H₂), 3,07 (t, 2H, *J*=7,6 Hz, H₃), 7,38 (d, 2H, *J*=8,8 Hz, H₅ e H₉), 8,16 (d, 2H, *J*=8,8 Hz, H₆ e H₈); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ: 30,3 (C₃), 34,6 (C₂), 123,9 (C₆ e C₈), 129,2 (C₅ e C₉), 147,7 (C₄ e C₇), 177,5 (C₁), IV (ATR, 600-4000 cm⁻¹) $\tilde{\nu}$: 2918, 2852, 2716, 2627, 1700, 1597, 1515, 1436, 1343, 1320, 1284, 1220, 1188, 1111, 1013, 970, 930, 853, 806, 778, 729, 694, 628.

4.3.7. Procedimento de síntese de *N*-hidroxi-3-(4-Nitrofenil)propenamida (**4k**)

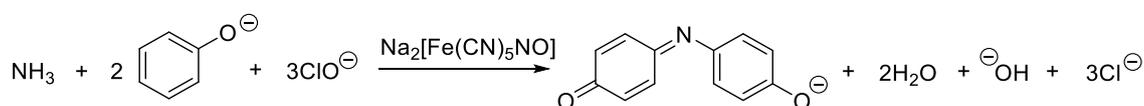
Procedimento adaptado de Usacova *et al.*¹¹⁶ Em um balão de fundo redondo foram adicionados 0,98 mmol (0,19 g) do composto **2k**, 2,0 mmol (0,33 g) de CDI (*N,N'*-carbonildimidazol) e 4,3 mL de THF anidro e deixou-se reagir sob atmosfera inerte e temperatura ambiente. Após 4 horas de reação foram adicionados 3,9 mmol (0,28 g) de NH₂OH.HCl e a reação foi monitorada por CCD. Após 5 dias, o material de partida foi consumido, em seguida, 20 mL de água destilada foram adicionados e a solução aquosa extraída com diclorometano (3x20 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas com sulfato de magnésio, filtradas e o solvente removido sob pressão reduzida. O produto obtido foi solubilizado em acetato de etila e hexano e adicionou-se água gota a gota até a precipitação um sólido branco. O sólido foi filtrado a vácuo e seco.



Sólido branco; rendimento: 59%; faixa de fusão: 115-119 °C; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2,32 (t, 2H, *J*=8,0 Hz, H2), 2,95 (t, 2H, *J*=8,0 Hz, H3), 7,49 (d, 2H, *J*=8,8 Hz Hz, H5 e H9), 8,14 (d, 2H, *J*=8,8 Hz, H6 e H8), 8,72 (s, 1H, NH), 10,39 (s, 1H, OH); RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 30,5 (C3), 33,0 (C2), 123,4 (C6 e C8), 129,6 (C5 e C9), 146,0 (C7), 149,5 (C4), 167,7 (C1); IV (ATR, 600-4000 cm⁻¹) $\tilde{\nu}$: 3199, 2855, 1702, 1674, 1626, 1598, 1512, 1424, 1343, 1222, 1178, 1108, 1070, 987, 904, 854, 823, 750, 730, 700, 660, 622; Análise elementar (%): Calculado: C, 51,43; H, 4,80; N, 13,33, Experimental: C,49,29; H,4,94 ; N,13,80 ; HRMS-ESI (m/z): Calculado para C₁₁H₁₄N₂O₂ (M+H)⁺: 209,0562; Experimental: 209,0544.

4.4. Testes de atividade anti-ureolítica *in-vitro*

Os testes de inibição enzimática foram realizados pelo método do indofenol, também conhecido como método de Berthelot.¹¹⁸ O método de Berthelot baseia-se na formação de indofenol, um composto azul intenso, resultante da reação entre amônia e fenol catalisada por nitroprussiato de sódio na presença de um agente oxidante, como por exemplo hipoclorito de sódio (Esquema 10).



Esquema 10. Reação de formação do indofenol a partir da reação entre amônia e fenol na presença de hipoclorito de sódio catalisada por nitroprussiato de sódio.

Os testes *in vitro* foram realizados adicionando-se a uma microplaca de 96 poços 10 μL de solução etanólica dos compostos a serem testados, 80 μL de solução tampão fosfato pH 7 contendo enzima urease (2,5 U/mL) e 10 μL de solução aquosa de ureia 100 mM. A microplaca foi incubada em termoagitador a 25 °C por 10 minutos a 600 rpm. Em seguida, 45 μL de solução A (solução aquosa 1% m/v de fenol e 0,005% m/v de nitroprussiato de sódio) e 70 μL de solução B (solução aquosa 0,5% m/v de hidróxido de sódio e 0,1% m/v de sódio hipoclorito) foram adicionados e a microplaca incubada por 5 minutos a 50 °C e 600 rpm. Após a incubação, as absorbâncias foram medidas por um leitor de microplacas a um comprimento de onda de 630 nm. A produção de íon amônio pela enzima é calculada considerando a quantidade de íon amônio produzido pela micro-reação na ausência do inibidor.

Inicialmente foi realizada uma triagem com os compostos **4a** a **4h** avaliando-se suas atividades na concentração de 20 μM . Os compostos que apresentaram atividade anti-ureolítica superior ao composto de referência, ácido acetoidroxâmico (AAH), prosseguiriam para os estudos de concentração inibitória média (CI_{50}). Nos experimentos de determinação de CI_{50} foram avaliadas as porcentagens de inibição em diferentes concentrações para cada composto, sendo obtidas curvas lineares de inibição em função da concentração.

Os experimentos de cinética enzimática foram realizados utilizando-se concentrações fixas do inibidor em reações contendo ureia em uma faixa de concentração entre 1-32 mM. Desse modo, seria possível avaliar o comportamento da enzima na ausência ou presença de inibidor à medida que se varia a concentração de substrato. Os compostos foram selecionados para os experimentos de cinética de acordo com seus valores de CI_{50} e diferenças estruturais, sendo determinados os tipos de inibição e suas constantes de dissociação.

4.4.1. Análise estatística dos resultados de atividade anti-ureolítica *in-vitro*

Os dados resultantes dos testes de inibição enzimática foram avaliados quanto a sua normalidade e homocedasticidade utilizando, respectivamente, os testes de Shapiro-Wilk e Cochran. Os dados também foram avaliados pelo teste de Grubs para remoção de valores atípicos (*outliers*). As médias de inibição no teste com inibidores na concentração de 20 μM foram comparadas por *One-way* ANOVA com pós-teste de Scott-Knott. A determinação dos valores de CI_{50} foi realizada utilizando-se o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários e o teste F para determinar a significância dos coeficientes.

Em todas as análises estatísticas considerou-se um intervalo de confiança igual a 95%, sendo realizadas com o auxílio dos programas para Windows Microsoft Office Excel (versão 2019), GraphPad Prism (versão 9.5.0) e Sisvar (versão 5.8, elaborado pelo Prof. Dr. Daniel Furtado Ferreira da Universidade Federal de Lavras).

4.5. Estudos de biofísica

4.5.1. Avaliação da interação urease-ligante usando UV-vis e fluorescência molecular

As medidas de absorvância foram realizadas para os ácidos hidroxâmicos **4e** e **4i** (10 μM) e urease (10 μM) individualmente e para a mistura de ambos com o intuito de avaliar a formação do complexo urease-inibidor. Os estudos de interação com o níquel foram realizados avaliando-se sistemas contendo Ni(II) a 10 μM , **4i** ou **4e** na concentração de 10 μM e Ni(II) na presença de **4e** ou **4i** (proporção 1:1). Os espectros UV-vis foram registrados na faixa de 220 a 500 nm. As titulações espectrofluorimétricas foram realizadas mantendo constante a concentração de urease (2 μM) e fazendo adições incrementais de **4a**, **4e**, **4k** e **4i**. O comprimento de onda de excitação foi de 280 nm, respectivamente, utilizando fendas de 5 e 10 nm (para excitação e emissão), com os espectros registrados de 295 a 450 nm. Todos os ensaios foram realizados em tampão fosfato 20 mM pH 7,4 a 30°C.

4.5.2. Estudo de competição com inibidores padrão

Para avaliar o tipo preferencial de inibição com a enzima, a análise foi realizada em concentrações fixas de inibidores padrão (ácido acetoidroxâmico, tiourea, hidroxauréia, e NBPT a 50 μM) e urease (2 μM) e aumentando gradativamente a concentração de **4e** e **4i** (0,1 a 100 μM). Todos os sistemas foram excitados em $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ e as medições foram realizadas entre 295 - 450 nm.^{119,120}

4.5.3. Avaliação do mecanismo baseado na resposta aos grupos tióis

Os grupos tióis livres foram quantificados usando o método de Ellman,¹²¹ na ausência e presença dos derivados **4e** e **4i** (5, 10, 20, 30, 40 e 50 μM). As concentrações do ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB ou reagente de Ellman, 50 μM) e do composto tiol (50 μM) foram mantidas fixas. As medidas foram realizadas no comprimento de absorção máxima do cromóforo ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB, $\lambda_{\text{max}} = 412 \text{ nm}$).

4.5.4. Titulação fluorimétrica sincronizada

O estudo por fluorescência sincronizada foi realizado mantendo-se fixa a concentração da urease (2 μ M) e variando-se a concentração dos ligantes **4e** (1 – 200 μ M) e **4i** (0,1 – 40 μ M). Para isso, a diferença entre os comprimentos de onda de emissão e excitação ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$) foi mantida fixa, variando-se ambos os monocromadores. Por fim, aplicou-se $\Delta\lambda = 15$ e $\Delta\lambda = 60$ nm para monitorar o comportamento espectroscópico dos resíduos de Trp e Tyr, respectivamente.¹²²

4.5.6. Fluorescência 3D

Os estudos fluorescência 3D foram realizados com a urease livre (2 μ M) e na presença dos ligantes **4e** e **4i** (10 μ M) em tampão fosfato, 20 mM, pH 7,4. As medidas foram realizadas $\lambda_{ex} = 220$ a 400 nm (variando de 10 em 10 nm), $\lambda_{em} = 250$ a 450 nm, e *slit* de excitação e emissão igual a 5 e 10 nm, respectivamente.^{120,122}

4.5.7. Transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET)

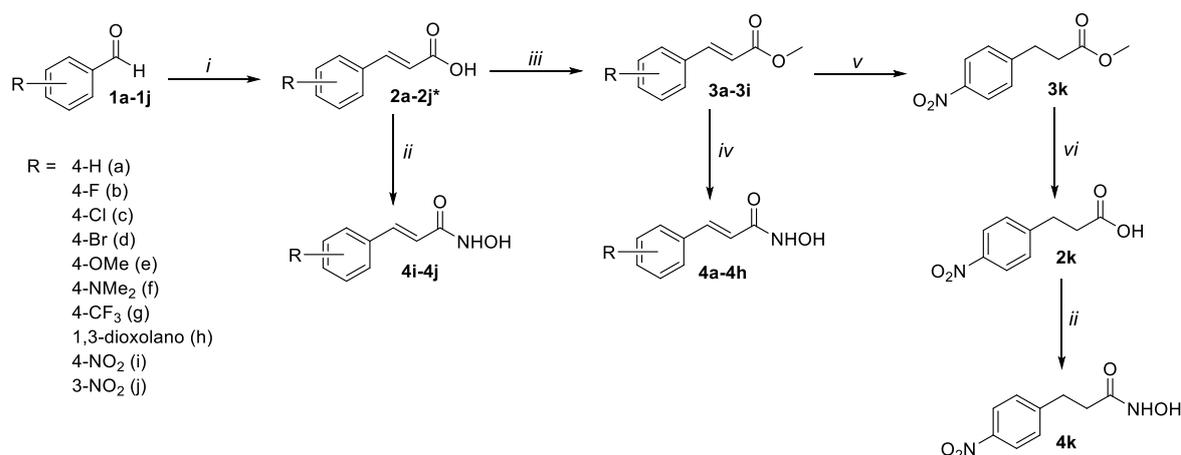
A avaliação da distância intermolecular entre fluoróforo (urease – 10 μ M) e o composto *quencher* (**4e** e **4i** – 10, 20 e 40 μ M) foi realizada a partir de medidas de fluorescência molecular da enzima livre e do complexo urease-ligante, assim como, do perfil de absorção molecular dos ligantes.¹¹⁹

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese

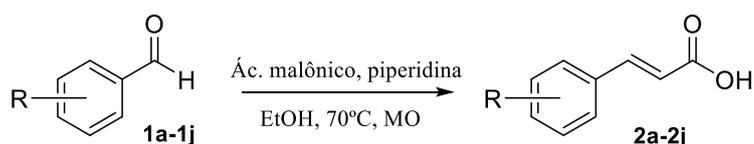
5.1.1. Síntese dos compostos 2a a 2j

Os compostos **4a** a **4k** foram obtidos por meio de uma rota sintética partindo-se dos benzaldeídos correspondentes (Esquema 11).



Esquema 11. Rota sintética dos compostos **4a-4k**. i) Ácido malônico, piperidina, EtOH, 70°C, MO, 45 min.; ii) CDI, NH₂OH.HCl, THF anidro, atmosfera inerte, temperatura ambiente, 48 h.; iii) TMSCl, MeOH, refluxo, 24 h.; iv) KOH, NH₂OH.HCl, MeOH, temperatura ambiente, 6-24 h.; v) RhCl(PPh₃)₃, THF anidro e desgaseificado, H₂ 2 atm, 24 h.; vi) NaOH, H₂O, MeOH, temperatura ambiente, 24 h. * O composto **2d** foi obtido de fontes comerciais.

A primeira etapa de síntese (Esquema 12) consistiu na obtenção dos ácidos cinâmicos **2a** a **2j** por meio da condensação de Knoevenagel entre benzaldeído e ácido malônico utilizando-se piperidina como base nitrogenada. Baseando-se nos estudos de Pellón e colaboradores,¹⁰⁰ os ácidos cinâmicos foram preparados em reator micro-ondas ao invés do aquecimento convencional com o objetivo de diminuir o tempo reacional.



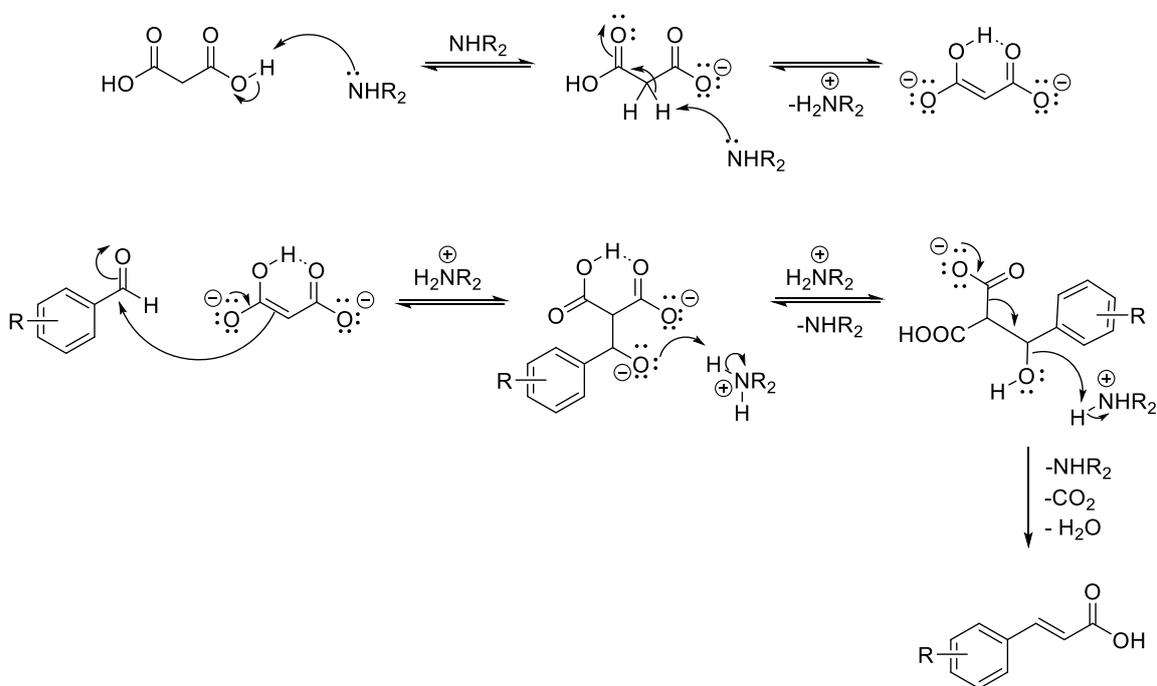
Esquema 12. Síntese dos ácidos cinâmicos **2a** a **2j**

O mecanismo de formação dos ácidos cinâmicos nas condições reacionais descritas é mostrado no Esquema 13. Inicialmente ocorre a desprotonação de um dos grupos carboxila do ácido malônico pela piperidina. Em seguida, observa-se uma segunda desprotonação pela base

nitrogenada. A forma enólica é estabilizada pela ligação de hidrogênio intramolecular estabelecida no intermediário cíclico de 6 membros formado. Portanto, o par de elétrons da ligação dupla da forma enólica atua como nucleófilo ao atacar o carbono carbonílico do benzaldeído, levando à formação do intermediário tetraédrico. Após a protonação de um dos átomos de oxigênio, ocorre a etapa de descarboxilação. A eliminação de CO_2 poderia conduzir à formação dos produtos *E* ou *Z*, entretanto, o estado de transição que promove a formação do isômero *E* é mais estável, sendo o único produto formado.¹²³

A purificação dos ácidos cinâmicos pode ser realizada de forma simples por meio de precipitação do produto em água destilada gelada. Todavia, devido a basicidade do meio de reação, os ácidos cinâmicos encontram-se na forma de carboxilatos, sendo necessário ajuste do pH para 3 com ácido clorídrico 37% m/v para se observar a precipitação dos produtos.

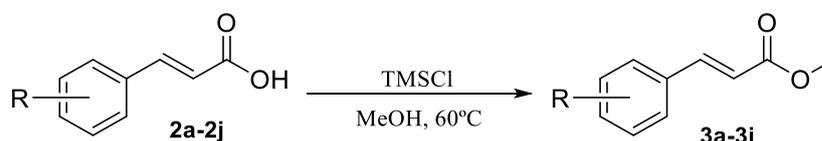
Os rendimentos das reações para cada ácido cinâmico preparado encontram-se na Tabela 1, página 88, sendo obtidos produtos com rendimentos entre 34-80%. Considerando-se que a purificação dos produtos é realizada em água, os rendimentos são afetados pela solubilidade dos respectivos ácidos cinâmicos nesse meio, como observado para o composto **2f**.



Esquema 13. Mecanismo de formação dos ácidos cinâmicos **2a** a **2j** por condensação de Knoevenagel

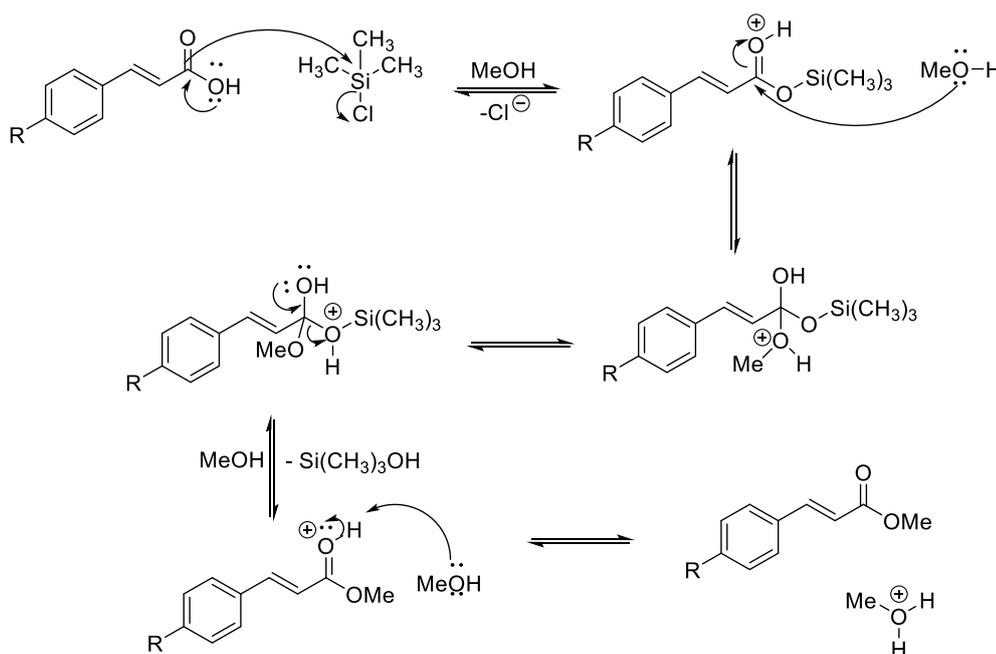
5.1.2. Síntese dos compostos 3a a 3i

Os ácidos cinâmicos **2a** a **2i** obtidos foram submetidos à reação de esterificação com TMSCl na presença de metanol (Esquema 14).



Esquema 14. Síntese dos ésteres 3a a 3i

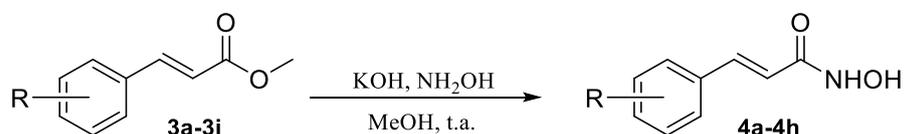
O mecanismo de formação do éster a partir do ácido carboxílico é mostrado no Esquema 15, sendo baseado nos resultados discutidos por Brook e Chan.¹²⁴ Inicialmente ocorre a formação do silil-éster por meio da reação de substituição entre TMSCl e o ácido carboxílico. Em seguida, o carbono carbonílico do silil-éster é atacado pelo par de elétrons do oxigênio do metanol, formando o intermediário tetraédrico. Então, ocorre a saída do silanol e o reestabelecimento da ligação dupla. Na Tabela 1, página 88, são descritos rendimentos reacionais superiores a 77% para essa etapa de síntese, com exceção do composto **3f**, que possui o substituinte dimetilamino, que apresentou rendimento igual a 43%. Essa diferença pode ser justificada pela afinidade do composto pela fase aquosa durante o processo de purificação por extração líquido-líquido, dificultando a recuperação do produto na fase orgânica com melhores rendimentos.



Esquema 15. Mecanismo de esterificação dos ácidos carboxílicos 2a a 2i em metanol e utilizando-se TMSCl para obtenção dos compostos 3a a 3i

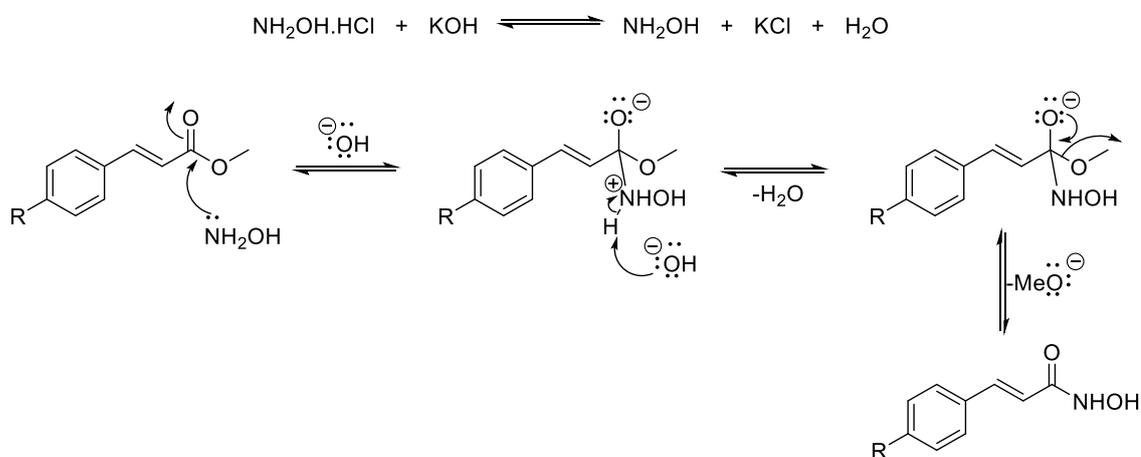
5.1.3. Síntese dos compostos 4a a 4h

Para a obtenção dos compostos **4a** a **4h**, os ésteres correlatos foram submetidos à reação com cloridrato de hidroxilamina em meio básico (Esquema **16**).



Esquema 16. Síntese dos ácidos hidroxâmicos 4a a 4h

Inicialmente reage-se hidróxido de potássio e cloridrato de hidroxilamina em metanol para promover a formação da hidroxilamina livre, como mostrado no Esquema **17**. Por se tratar de uma reação exotérmica, é realizada em banho de gelo, observando-se a precipitação de cloreto de potássio. Após a adição do éster cinâmico ocorre a reação de substituição nucleofílica mostrada no Esquema **17**, na qual o par de elétrons do nitrogênio da hidroxilamina livre ataca o carbono carbonílico do éster deslocando o par de elétrons da ligação dupla para o oxigênio. Quando a dupla ligação se reestabelece o metóxido é eliminado como grupo abandonador dando origem ao ácido hidroxâmico pretendido.



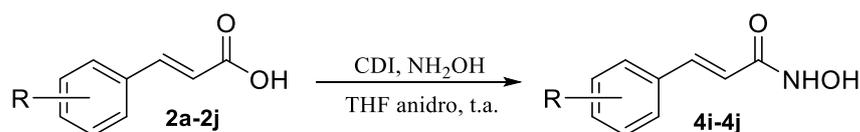
Esquema 17. Mecanismo de hidroxiamidação dos ésteres 3a a 3h para obtenção dos ácidos hidroxâmicos 4a a 4h

Devido ao meio de reação extremamente básico ($\text{pH} > 12$), a reação de hidrólise do éster concorre com a reação de hidroxiamidação, formado o ácido carboxílico como subproduto. Apesar de indesejável a formação de subprodutos, a purificação é facilitada pela diferença de pK_a entre os ácidos carboxílicos ($\text{pK}_a \sim 3$) e hidroxâmicos ($\text{pK}_a \sim 8$). Na etapa de elaboração, todo metanol é evaporado e a mistura de reação é solubilizada em água destilada. Então, o ajuste do pH para 7 conduz à protonação e à precipitação do ácido hidroxâmico, enquanto o ácido

carboxílico se mantém solúvel na forma de carboxilato. O produto é filtrado e lavado com água destilada acidificada com ácido clorídrico 37% m/v para garantir a protonação de todos os sítios ácidos. No caso do composto **4f** a precipitação em água mostrou-se menos eficiente devido à presença do grupo amino que, ao ser protonado, apresenta maior solubilidade em água. Por essa razão, ele não foi submetido à etapa extra de lavagem em água acidificada.

5.1.4. Síntese dos compostos **4i** e **4j**

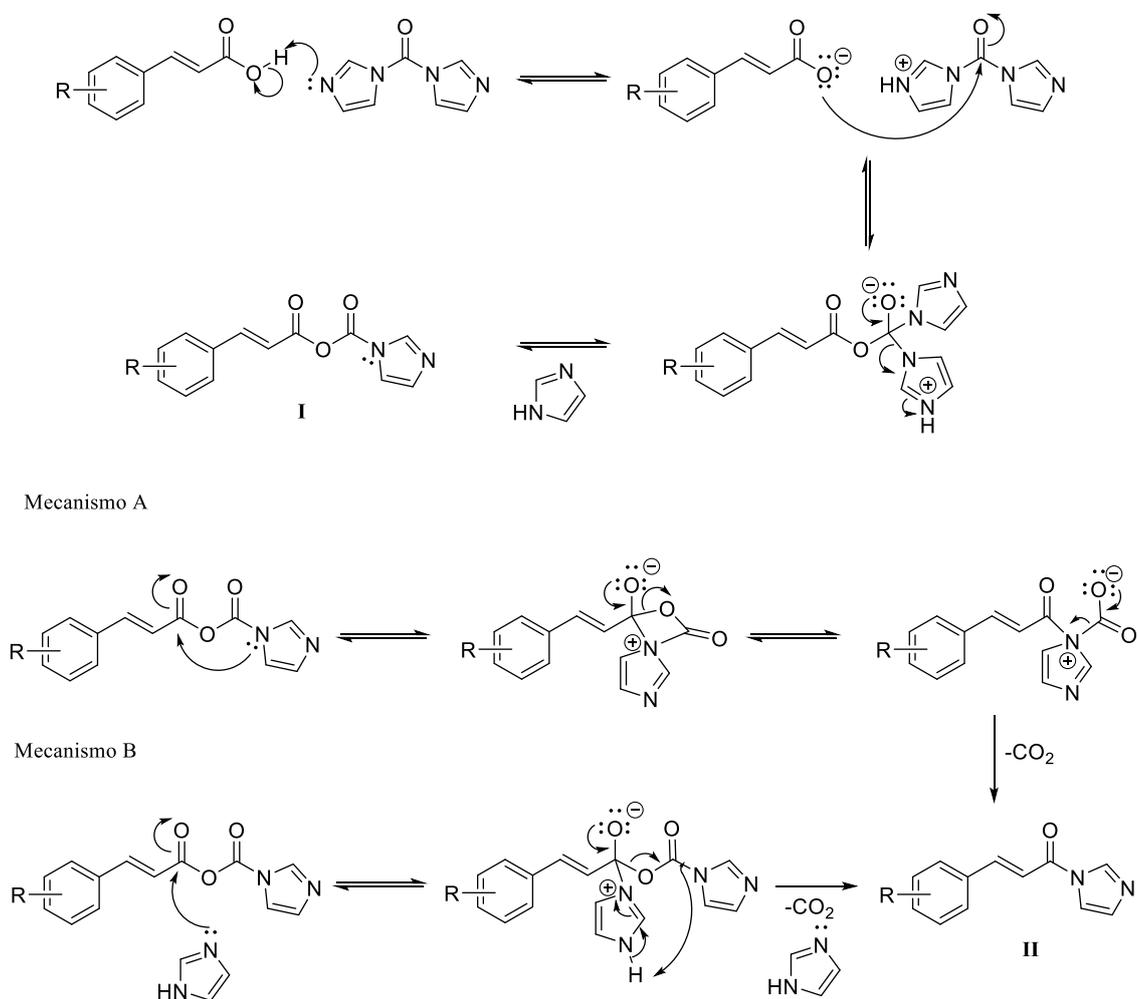
A metodologia de síntese dos compostos **4a** a **4h**, quando aplicada aos compostos contendo o grupo nitro (**4i** e **4j**), não conduziu à formação dos ácidos hidroxâmicos em quantidades satisfatórias, visto que a etapa de purificação por precipitação em água e ajuste do pH para 7 não promoveu a precipitação do produto. Devido os procedimentos de purificação por coluna cromatográfica não se mostrarem efetivos na obtenção dos produtos puros, optou-se por obter os ácidos hidroxâmicos diretamente dos ácidos carboxílicos por meio da reação com *N,N'*-carbonildimidazol (CDI). (Esquema **18**).



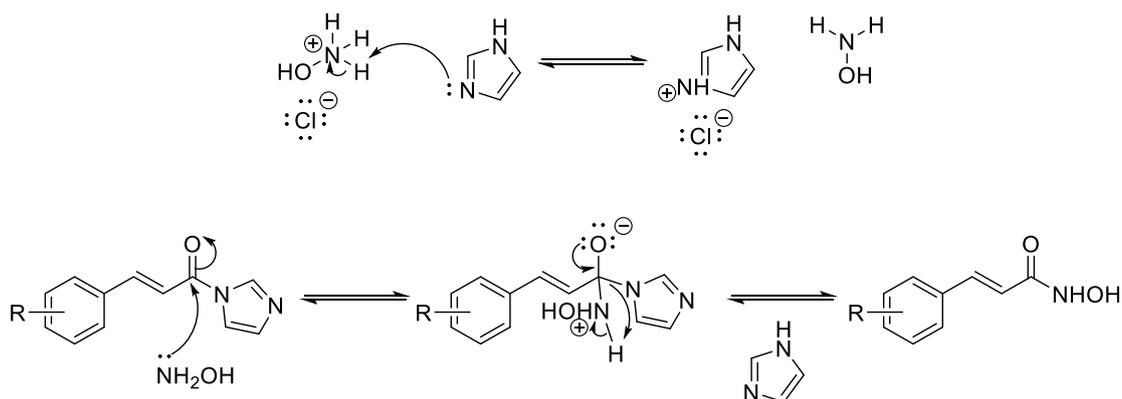
*Esquema 18. Síntese dos ácidos hidroxâmicos **4i** e **4j***

O uso de *N*-acilimidazóis é uma estratégia de ativação de ácidos carboxílicos para o preparo de uma diversidade de produtos como ésteres e amidas, tendo sido seu uso relatado por Staab e colaboradores.^{125,126} O ácido carboxílico, quando submetido à reação com CDI, conduz à formação do *N*-acilimidazol, identificado como II no mecanismo representado no Esquema **19**. No mecanismo representado, inicialmente ocorre uma reação ácido base entre o anel imidazólico e o ácido carboxílico, resultando na formação do íon carboxilato. Então, o par de elétrons do oxigênio do carboxilato realiza um ataque nucleofílico ao carbono carbonílico do CDI conduzindo à formação do anidrido misto I. Nesta etapa, o anidrido misto poderá sofrer um ataque nucleofílico de duas diferentes formas mostradas nos mecanismos A e B. No mecanismo A, ocorre uma substituição nucleofílica intramolecular, na qual o par de elétrons do nitrogênio do anel imidazólico ataca o carbono carbonílico formando um anel de quatro membros. Em seguida ocorre uma descarboxilação para formação do *N*-acilimidazol. No mecanismo B a substituição nucleofílica ocorre com uma molécula de imidazol atuando como nucleófilo, desse modo, não ocorre a formação do anel de quatro membros. Semelhantemente ao mecanismo A, ocorre uma descarboxilação para formação do composto II.¹²⁵⁻¹²⁷

Após a formação do composto II é possível realizar uma nova substituição nucleofílica por meio da adição de cloridrato de hidroxilamina ao meio de reação, como mostrado no Esquema 20. Nesse caso, o próprio imidazol liberado na formação do *N*-acilimidazol será capaz de atuar como base para formação da hidroxilamina livre. Observa-se que as condições mais brandas de síntese utilizando CDI favoreceram a formação dos produtos 4i e 4j com rendimentos iguais a 90% e 62%, respectivamente. Apesar de trabalhos da literatura mostrarem a etapa de elaboração da reação por extração líquido-líquido seguida de purificação por coluna cromatográfica de sílica-gel, observou-se que a adição de um pequeno volume de água destilada ao meio de reação promovia a precipitação do produto puro.



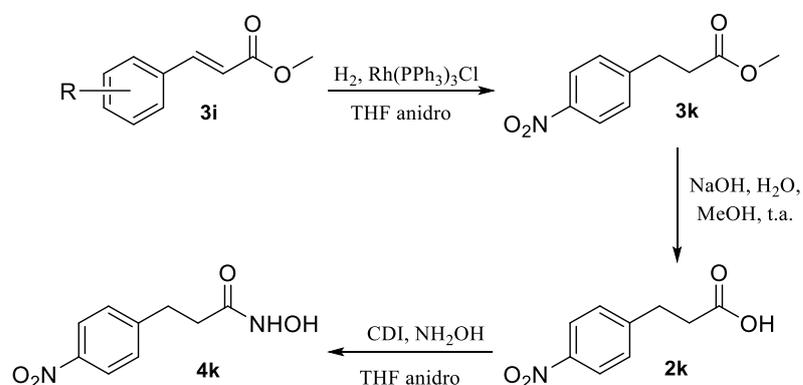
Esquema 19. Mecanismo de formação dos *N*-acilimidazóis na etapa de ativação dos ácidos carboxílicos¹²⁵⁻¹²⁷



Esquema 20. Mecanismo de hidroxiamidação dos *N*-acilimidazóis para formação dos ácidos hidroxâmicos **4i** e **4j** ¹¹⁶

5.1.5. Síntese dos derivados hidrogenados **2k**, **3k** e **4k**.

A síntese do derivado **4k** (Esquema **21**) foi motivada pelos resultados iniciais de atividade anti-ureolítica detalhados no tópico 3 desta seção. Os resultados mostraram que o composto contendo o grupo nitro na posição *para* (**4i**) apresentava a maior média de inibição na concentração de 20 μ M, sendo escolhido como referência para a síntese do análogo sem a dupla ligação conjugada (**4k**). Todavia, a presença do grupo nitro limita o uso de reagentes para hidrogenação convencionais, sendo requeridas condições de reação seletivas de redução.



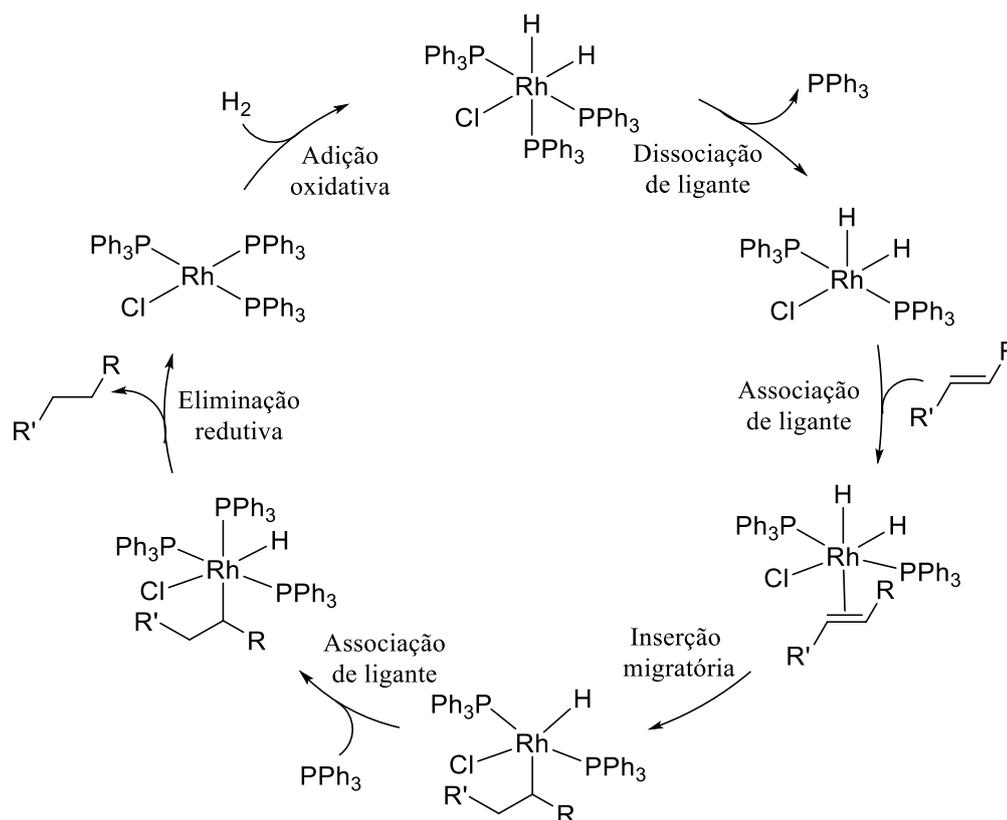
Esquema 21. Rota sintética para obtenção do derivado **4k**

Na literatura é amplamente descrito o uso do catalisador de Wilkinson ($\text{Rh}(\text{PPh}_3)_3\text{Cl}$) para tal finalidade, sendo mostrado por Vassiliou e colaboradores a redução seletiva do éster **3i**.¹¹⁷ Considerando-se que o preparo dos ácidos hidroxâmicos nitrados a partir dos ácidos carboxílicos apresentou melhores rendimentos que a partir dos ésteres, realizou-se a tentativa de redução do ácido carboxílico **2i**. Todavia, não se observou a redução da ligação dupla após 48h de reação, indicando que o grupo carboxila afeta a atividade catalítica do complexo de

ródio. Desse modo, optou-se por realizar a hidrogenação do éster **3i** e, em seguida, sua hidrólise, para obtenção do ácido **2i**.

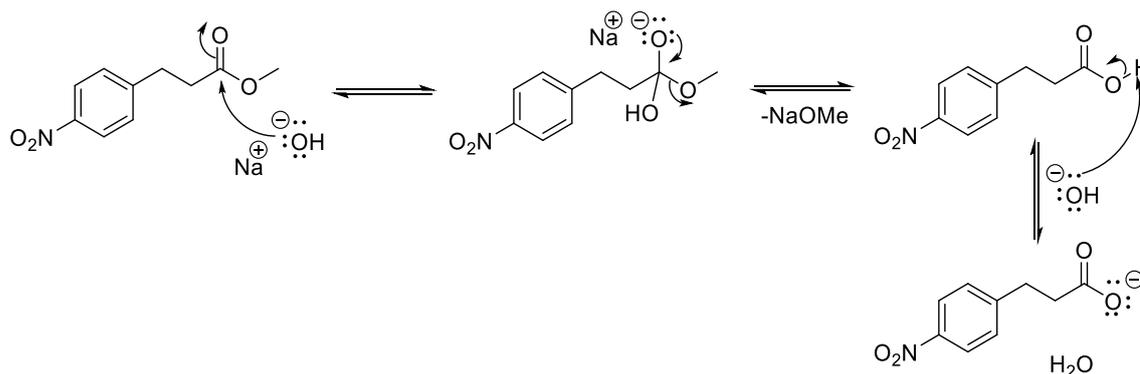
Em um primeiro teste, a reação de redução foi realizada com borbulhamento de hidrogênio, sendo observada a conversão de aproximadamente 50% do éster **3i** no éster reduzido **3k** em 5 dias de reação. Apesar da obtenção do produto nessas condições, sua purificação se torna um desafio devido às similaridades estruturais com o material de partida. Por essa razão, a reação foi realizada em autoclave com pressão de gás hidrogênio igual a 2 atm por 24h, sendo observada a hidrogenação de todo material de partida. Apesar de toda conversão do material de partida, o rendimento da reação (73%) é afetado pela necessidade de purificação do produto final por coluna cromatográfica de sílica-gel para remoção dos resíduos de trifenilfosfina oriundos do processo catalítico.

O ciclo catalítico de redução do éster **3i** encontra-se no Esquema **22**. O ciclo inicia-se com a adição oxidativa de H₂ ao complexo de 16 elétrons [RhCl(PPh₃)₃] formando o complexo di-hidreto de 18 elétrons. Então, a saída do grupo fosfina permite a associação com o alceno levando à sua inserção migratória e à formação do intermediário Rh-alkil. É importante ressaltar que a dissociação do grupo fosfina é fundamental para a atividade catalítica, podendo ocorrer antes da adição oxidativa de H₂. Após a inserção migratória, o complexo de 16 elétrons formado captura um ligante fosfina enquanto a migração do hidrogênio para o carbono conduz à eliminação redutiva do alceno e à recuperação do catalisador.^{128,129}



Esquema 22. Ciclo catalítico de hidrogenação do éster **3i** utilizando-se o catalisador de Wilkinson¹²⁹

O éster **3k** obtido foi hidrolisado em meio básico para a obtenção do ácido carboxílico **2k** e posterior síntese do ácido hidroxâmico **4k** mediante reação com CDI e cloridrato de hidroxilamina como descrito anteriormente e mostrado nos Esquemas **19** e **20**. O mecanismo de hidrólise de **3k** é mostrado no Esquema **23**, no qual se evidencia o ataque à carbonila do éster pelo íon hidróxido deslocando o par de elétrons da ligação C=O. Em seguida, o grupo metoxila é eliminado com a formação da ligação C=O dando origem ao ácido carboxílico desejado. Todavia, devido ao meio básico o ácido carboxílico é desprotonado formando-se o carboxilato, que será protonado novamente na etapa de elaboração da reação.



Esquema 23. Mecanismo de hidrólise em meio básico do éster **3k**

Tabela 1. Rendimentos dos produtos de cada etapa de síntese e rendimentos globais para obtenção dos produtos **4a-4k**

Compostos		Rendimentos (%)			
Código	Grupo R	Ácidos cinâmicos (2)	Ésteres (3)	Ácidos hidroxâmicos (4)	Global
a	4-H	56	87	47	23
b	4-F	53	92	56	27
c	4-Cl	61	91	67	37
d	4-Br	^a	96	81	78
e	4-OMe	80	94	54	41
f	4-NMe ₂	44	43	29	6
g	4-CF ₃	43	95	52	21
h	1,3-dioxolano	53	77	33	13
i	4-NO ₂	59	77	90 ^d	53
j	3-NO ₂	34	^a	62 ^d	21
k	4-NO ₂ reduzido	79 ^b	73 ^c	59 ^d	16 ^e

^aO composto **2d** foi obtido de fonte comercial e **3j** não foi sintetizado. ^bO ácido carboxílico **2k** foi obtido da hidrólise de **3k**. ^cO éster **3k** foi obtido da redução catalítica de **3i**. ^dOs ácidos hidroxâmicos **4i**, **4j** e **4k** foram obtidos em duas etapas a partir da conversão direta dos ácidos carboxílicos aos ácidos hidroxâmicos utilizando-se CDI. ^eO rendimento global da produção de **4k** envolve 5 etapas de reação.

5.2. Caracterização

Os compostos obtidos foram caracterizados por espectroscopias na região do Infravermelho com Transformada de Fourier no modo de refletância total atenuada (FTIR-ATR) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os compostos utilizados nos testes *in-vitro* também foram caracterizados por Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HR-MS) e Análise Elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN).

5.2.1. Espectroscopia na região do infravermelho

Considerando-se as similaridades estruturais entre os ácidos cinâmicos, decidiu-se discutir mais detalhadamente nesta seção os resultados de caracterização para os compostos 4-nitro substituídos (série i). Todavia, a discussão apresentada pode ser estendida de forma similar aos demais compostos.

Na Figura 27 é apresentado o espectro na região do infravermelho para o ácido cinâmico **2i**, no qual é possível observar a banda intensa em 1684 cm^{-1} característica do estiramento de ligações C=O. Em geral, o número de onda de estiramento das ligações C=O em ácidos carboxílicos são observadas entre $1730\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$, entretanto, a conjugação com ligação dupla promove o deslocamento para valores menores. Devido a possibilidade de dimerização via ligação de hidrogênio (Figura 26), a banda concernente ao grupo hidroxila pode ser vista na região entre $3400\text{ e }2400\text{ cm}^{-1}$ e sobreposta à banda relativa ao estiramento da ligação C-H de alcenos em 3114 cm^{-1} . A banda relativa ao estiramento da ligação C=C pode ser observada em 1630 cm^{-1} . Em 847 cm^{-1} encontra-se presente a banda intensa indicativa de anéis aromáticos *para*-substituídos em concordância com as bandas observadas em $1426\text{ e }1596\text{ cm}^{-1}$ relativas ao estiramento das ligações C=C de aromáticos. Na mesma região se observam as bandas intensas referentes aos estiramentos assimétrico e simétrico do grupo nitro em $1520\text{ e }1307\text{ cm}^{-1}$, respectivamente.

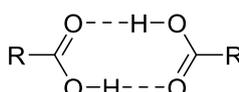


Figura 26. Dimerização do ácido carboxílico via formação de ligações de hidrogênio

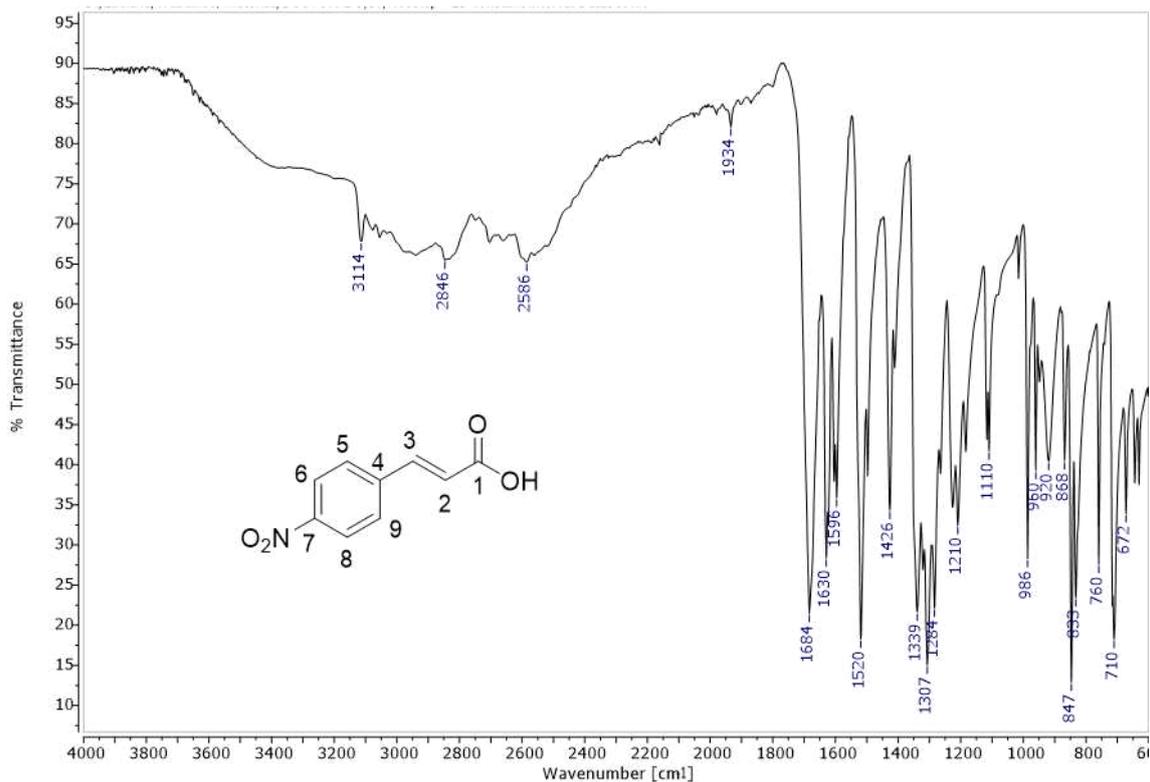


Figura 27. Espectro na região do infravermelho (ATR, 600-4000 cm⁻¹) para o composto **2i**

Na Figura **28** é mostrado o espectro na região do infravermelho para o éster **3i**. Semelhantemente ao ácido cinâmico **2i**, é possível observar as bandas de estiramento referentes a C=C de aromáticos em 1600 e 1436 cm⁻¹ e os estiramentos do grupo nitro em 1508 e 1341 cm⁻¹. Nota-se que, em relação ao ácido cinâmico, a banda referente a C=O desloca-se para regiões de maior número de onda (1726 cm⁻¹), uma vez que não ocorre o enfraquecimento da ligação C=O pela formação das ligações de hidrogênio possíveis no ácido carboxílico. Em 2920 cm⁻¹ é possível observar os estiramentos concernentes às ligações C-H do grupo metil.

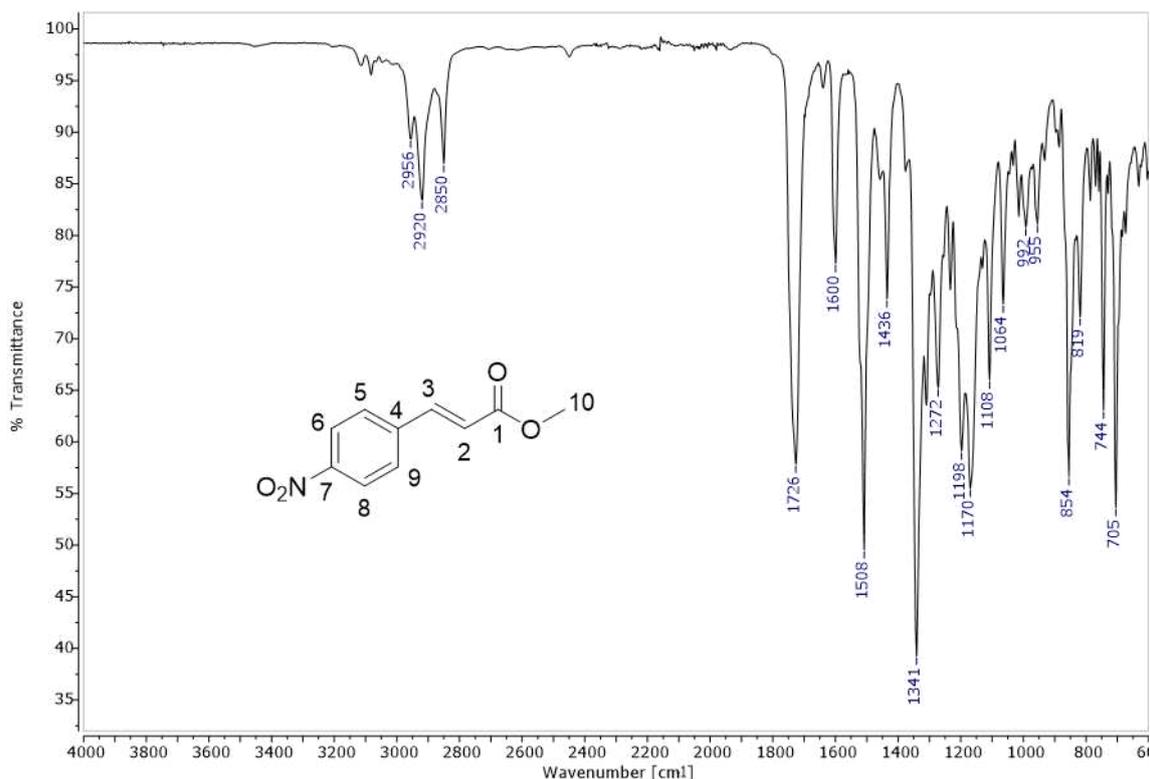


Figura 28. Espectro na região do infravermelho (ATR, 600-4000 cm⁻¹) para o composto **3i**

O espectro na região do infravermelho para o composto **4i** é mostrado na Figura **29**. Observam-se as bandas em 3586 e 3330 cm⁻¹ referentes aos estiramentos das ligações N-H e O-H, respectivamente. A banda relativa a C=O encontra-se com intensidade e frequência (1652 cm⁻¹) notavelmente menores quando comparada aos compostos **2i** e **3i**. Esse resultado pode ser explicado pelo aumento da energia do HOMO (do inglês, *Highest Occupied Molecular Orbital*) do substituinte ligado à carbonila devido a sobreposição do orbital contendo os elétrons não-ligantes do nitrogênio com o orbital contendo os elétrons não-ligantes do oxigênio (efeito alfa). O aumento da energia do HOMO favorece sua sobreposição com o LUMO (do inglês, *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) da ligação C=O, enfraquecendo a ligação dupla entre carbono e oxigênio. No ácido hidroxâmico as bandas referentes ao grupo nitro podem ser visualizadas em 1498 e 1342 cm⁻¹.

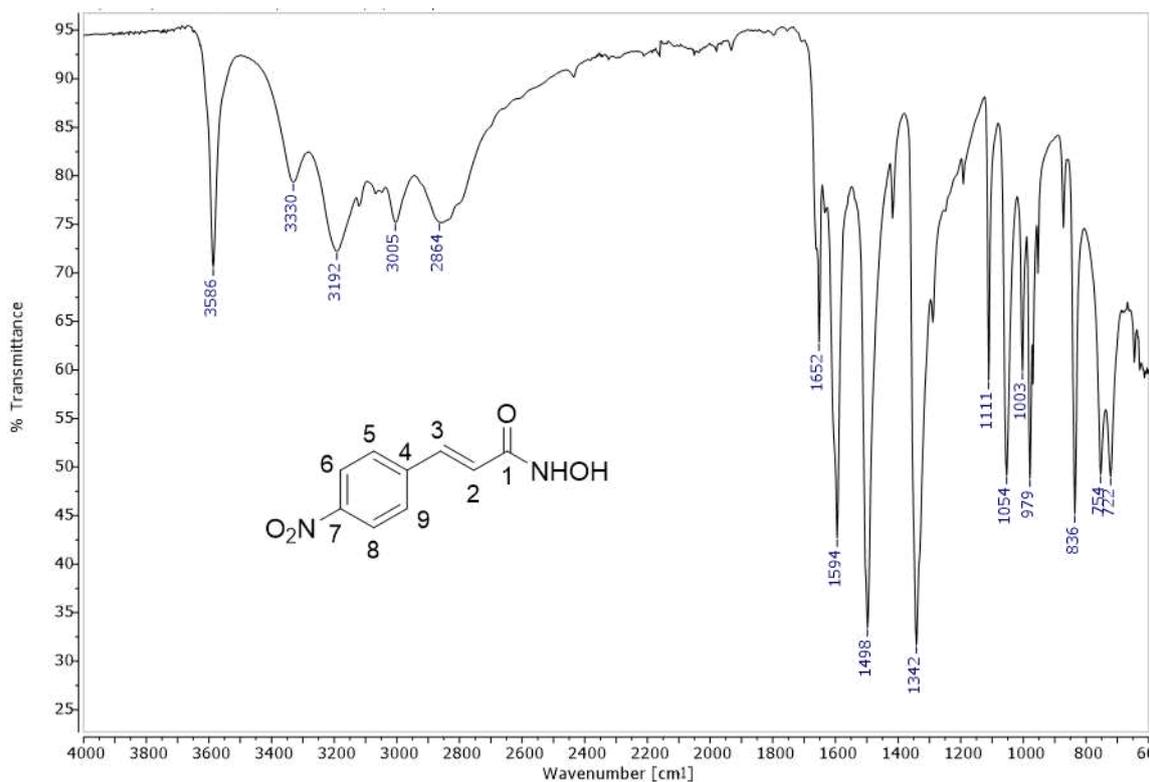
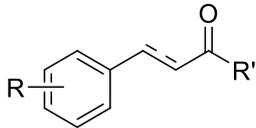


Figura 29. Espectro na região do infravermelho (ATR, 600-4000 cm^{-1}) para o composto **4i**

Na Tabela 2 são representadas as frequências de estiramento das ligações C=O comparativamente para os ácidos cinâmicos, ésteres e ácidos hidroxâmicos sintetizados. Como esperado, nota-se que os compostos sem a ligação dupla (série k) apresentam as maiores frequências de estiramento para a ligação C=O devido à ausência de conjugação com o alceno. Analisando-se os dados da Tabela 2 observa-se que não há uma relação clara entre as características doadoras/retiradoras de densidade eletrônica dos substituintes e as frequências de estiramento. Todavia, para compostos com grupos de características opostas (séries i e f), pode-se observar o aumento das frequências de estiramento da C=O com aumento do efeito retirador de densidade eletrônica. Os demais espectros na região do infravermelho encontram-se na seção anexos.

Tabela 2. Frequências de estiramento da ligação C=O dos ácidos cinâmicos, ésteres e ácidos hidroxâmicos sintetizados

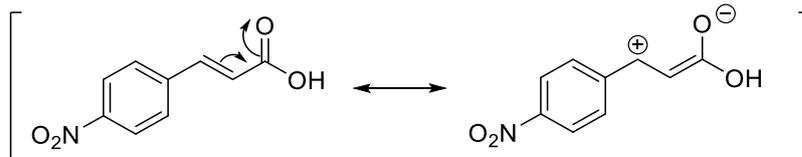
Composto	Frequências de estiramento C=O (cm ⁻¹)			
		Ácidos cinâmicos (R'=OH)	Ésteres (R'=OMe)	Ácidos hidroxâmicos (R'=NHOH)
a	4-H	1678	1712	1665
b	4-F	1684	1706	1668
c	4-Cl	1675	1704	1665
d	4-Br	^a	1710	1666
e	4-OMe	1674	1714	1662
f	4-NMe ₂	1666	1700	1658
g	4-CF ₃	1690	1710	1652
h	1,3-dioxolano	1691	1700	1654
i	4-NO ₂	1684	1726	1652
j	3-NO ₂	1690	NS	1656
k	4-NO ₂ reduzido	1700	1728	1674

NS=Não sintetizado

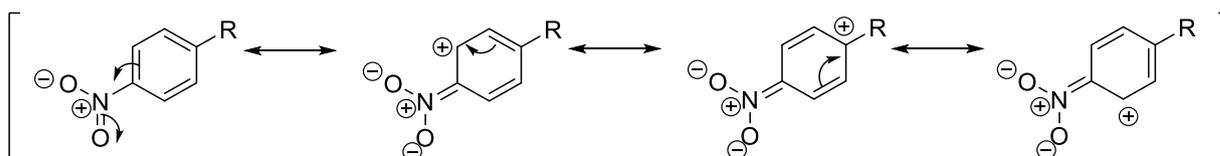
5.2.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

De forma semelhante à seção anterior, optou-se por discutir os espectros concernentes a série de compostos 4-nitro substituídos, sendo possível aplicar as considerações realizadas aos demais compostos.

No espectro RMN de ¹H para o ácido cinâmico **2i** (Figura 30) observam-se os dois dupletos inerentes aos hidrogênios vinílicos H2 e H3 em 6,74 e 7,69 ppm, respectivamente. É importante ressaltar que H3 encontra-se mais desblindado que H2 devido à conjugação com a carbonila que torna C3 mais deficiente em elétrons (Esquema 24). A constante de acoplamento entre H3 e H2 é igual a 16,0 Hz, confirmando a obtenção do estereoisômero *E*. Também são observados outros dois dupletos com constante de acoplamento igual a 9,0 Hz referentes aos hidrogênios do anel aromático, sendo o duplete localizado em 8,23 ppm correspondente aos hidrogênios H6 e H8 e o duplete em 7,97 ppm aos hidrogênios H5 e H9. A maior desblindagem dos hidrogênios H6 e H8 se justifica pela presença do grupo nitro na posição *para* atuando como um retirador de densidade eletrônica mais efetivo nas posições *orto* e *para* ao grupo nitro como mostrado no Esquema 25. Também foi possível observar o sinal relativo a OH em 12,73 ppm, corroborando a formação do ácido carboxílico.



Esquema 24. Estruturas de ressonância para o ácido cinâmico **2i**



Esquema 25. Estruturas de ressonância para os derivados nitrados

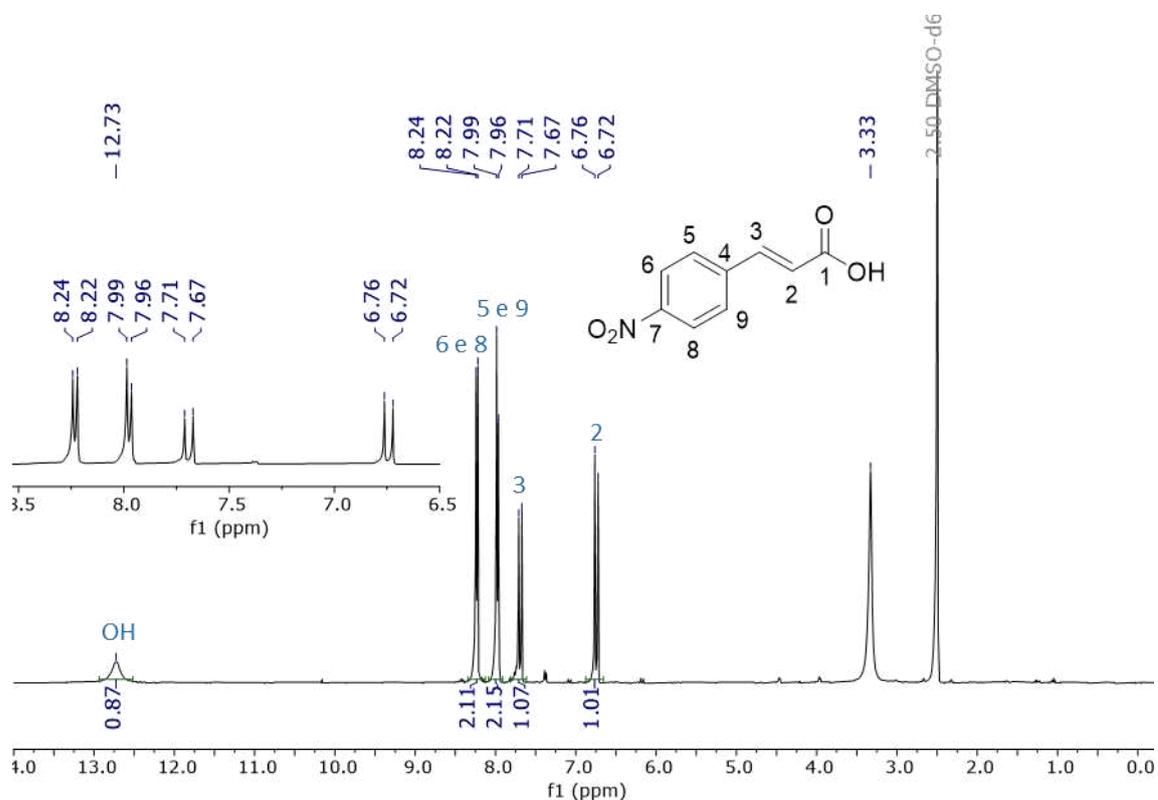


Figura 30. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) para o composto **2i**

Os espectros dos experimentos de RMN de ^{13}C e DEPT-135 são mostrados na Figura **31**. Os sinais referentes aos carbonos não-hidrogenados podem ser vistos em 167,0; 148,0 e 140,8 ppm, sendo referentes aos carbonos C1, C7 e C4, respectivamente. Os carbonos C1 e C7 encontram-se mais desblindados por estarem diretamente ligados a átomos retiradores de densidade eletrônica. A desblindagem do carbono C4 pode ser explicada pelas estruturas de

ressonância mostradas nos Esquemas **24** e **25**, observando-se que ele se encontra deficiente em elétrons por estar em posição *para* ao grupo nitro e ligado a um átomo de carbono também deficiente em elétrons.

Os sinais dos carbonos hidrogenados relativos ao anel aromático encontram-se em 129,3 e 123,9 ppm, sendo o carbono *orto* em relação ao grupo nitro o mais blindado. A aparente contradição na atribuição em relação ao discutido anteriormente pode ser explicada devido os conceitos de química orgânica clássica de reatividade e regioselectividade para anéis aromáticos não se relacionarem de forma simples com os deslocamentos de RMN de ^{13}C . No caso dos compostos nitrados é importante avaliar a contribuição do sistema σ tanto quanto o sistema π de elétrons na atribuição. Antagonicamente ao sistema π , no sistema σ o grupo NO_2 promove o aumento de densidade eletrônica nos carbonos *orto* e *para*, visto que os rearranjos de carga no sistema σ são apenas parcialmente explicados pelo efeito indutivo.¹³⁰

Os sinais referentes aos carbonos C3 e C2 são observados em 141,3 e 123,6 ppm, respectivamente, sendo o maior deslocamento do sinal de C3 explicado pelas estruturas de ressonância mostradas no Esquema **24**.

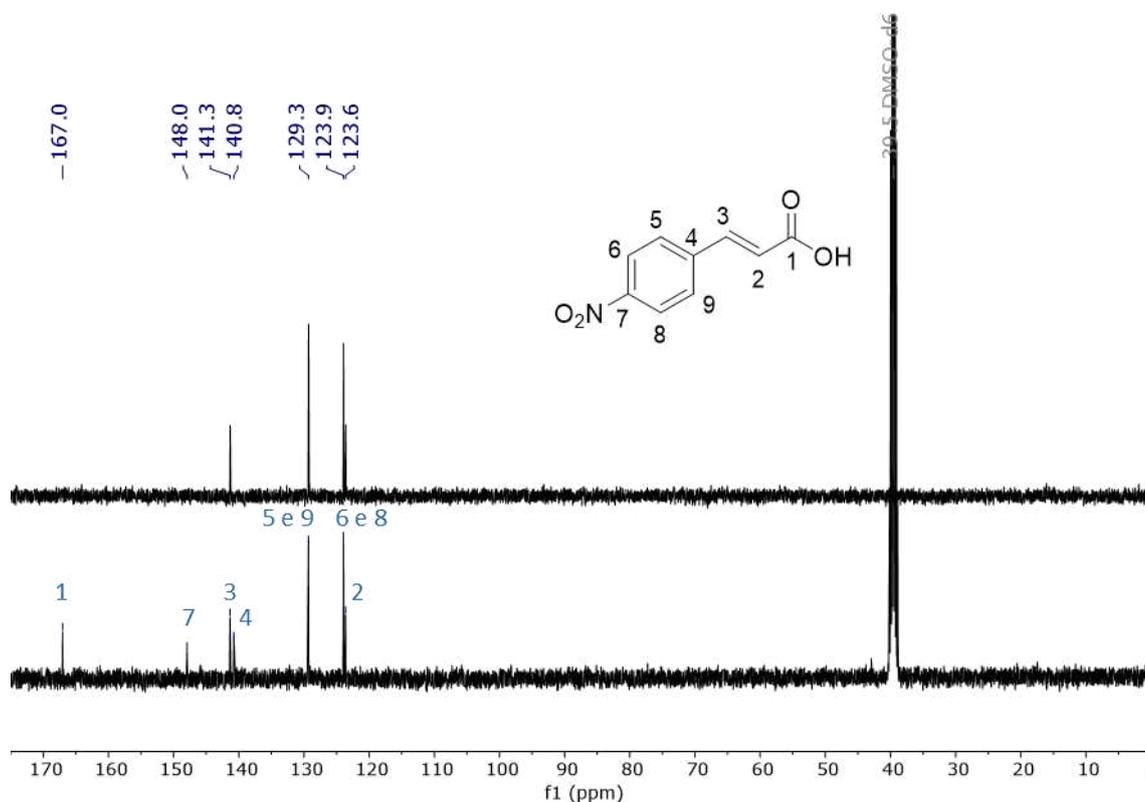


Figura 31. Espectros de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) para o composto **2i** (100 MHz, DMSO-d_6)

O espectro de RMN de ^1H para o composto **3i** é mostrado na Figura 32. Em relação ao espectro do composto **2i** é possível notar a presença do sinal em 3,75 ppm, evidenciando a formação do éster. Os espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (Figura 33) mostram o sinal em 51,8 ppm, corroborando a presença do grupo CH_3 .

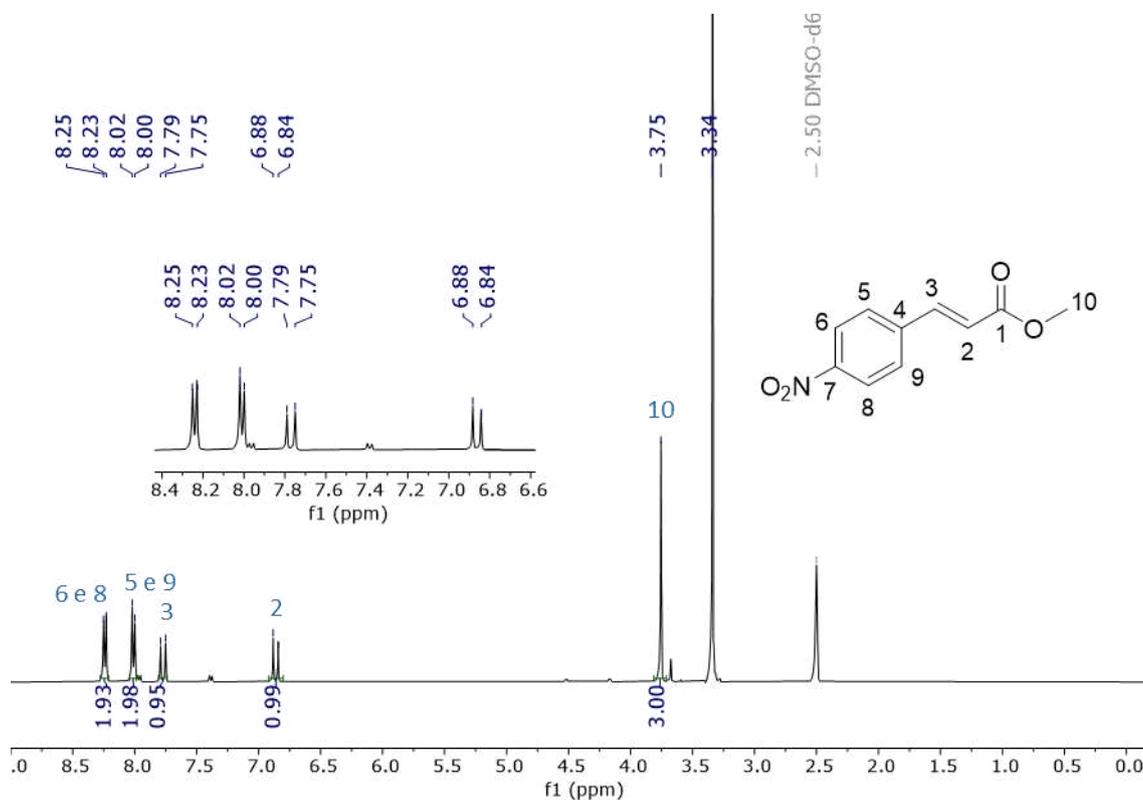


Figura 32. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o composto **3i**

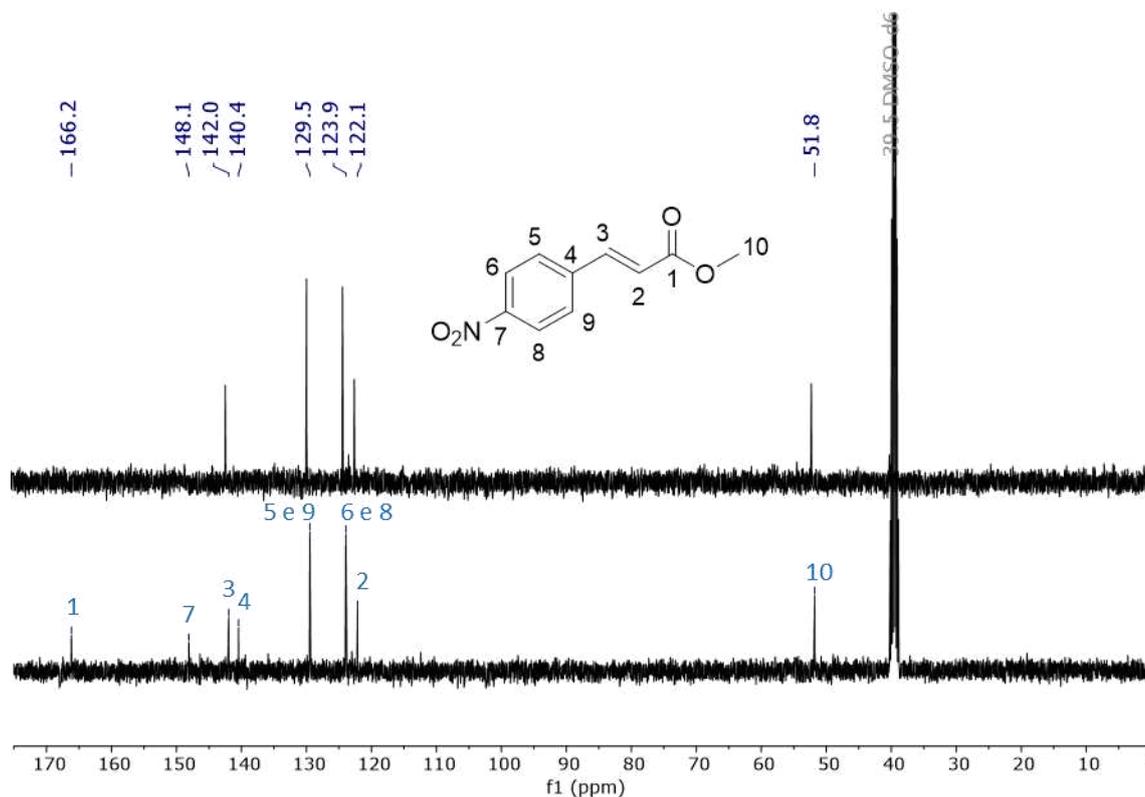


Figura 33. Espectros de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) para o composto **3i** (100 MHz, DMSO-d_6)

No espectro de RMN de ^1H para o ácido hidroxâmico **4i** (Figura **34**) é possível observar que os hidrogênios H2 (6,65 ppm), H3 (7,57 ppm), H5 e H9 (7,84 ppm) encontram-se mais blindados do que no ácido carboxílico **2i**, sendo esse resultado compatível com o efeito doador de densidade eletrônica do nitrogênio. Os sinais dos hidrogênios pertencentes ao grupo NHOH também podem ser vistos em 8,20 ppm (NH) e 10,94 ppm (OH). Os espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (Figura **35**) evidenciam o efeito doador do nitrogênio no deslocamento do carbono C1 do composto **4i**, sendo o sinal de C1 encontrado em 161,9 ppm, um valor inferior ao observado para o ácido cinâmico **2i**.

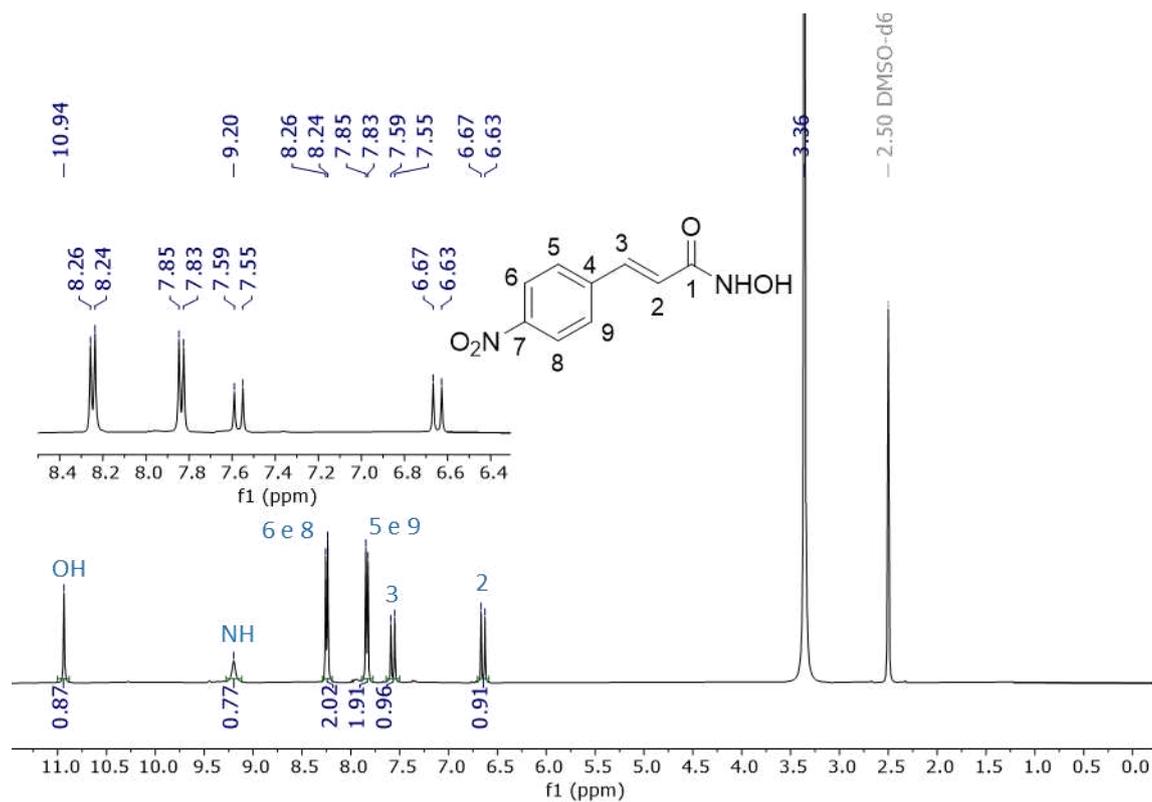


Figura 34. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) para o composto **4i**

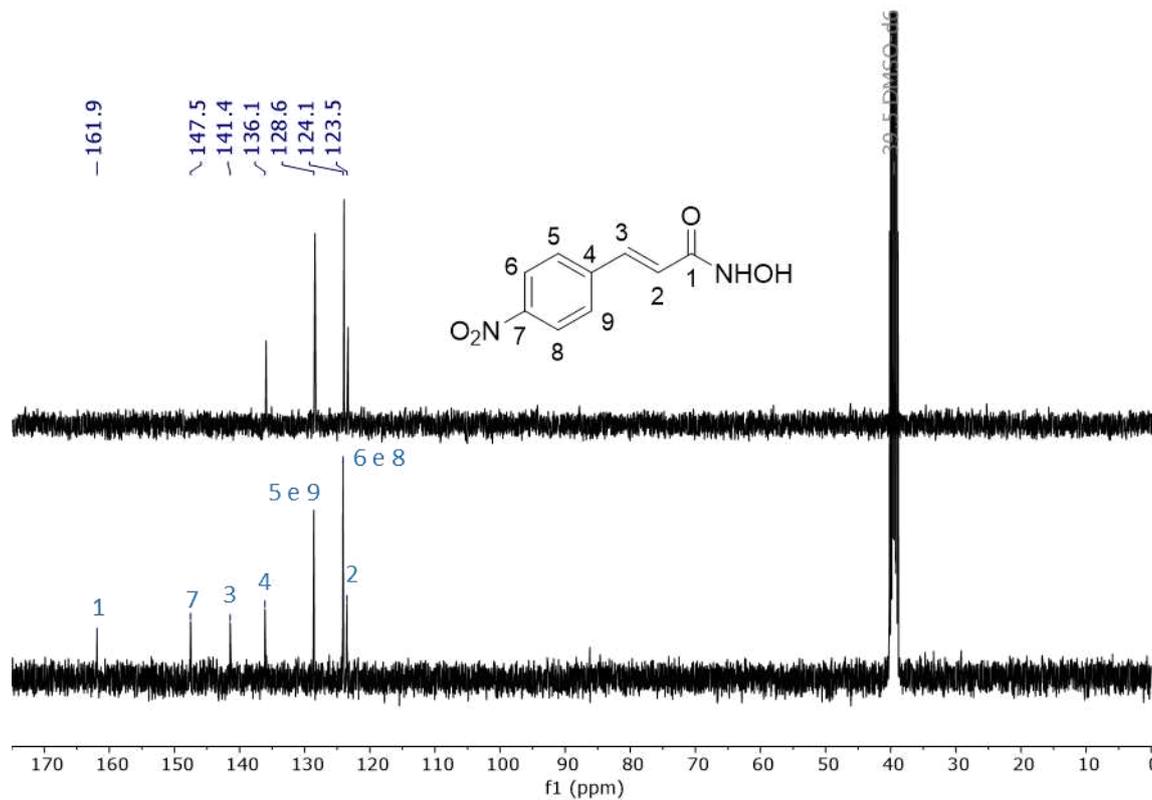
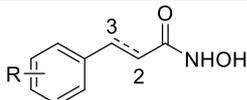


Figura 35. Espectros de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) para o composto **4i** (100 MHz, DMSO-d_6).

Na Tabela 3 encontram-se de forma comparativa os valores de deslocamento e constantes de acoplamento para os hidrogênios H2 e H3 dos ácidos hidroxâmicos sintetizados. É possível perceber que a presença de grupos doadores de densidade eletrônica resulta em menores valores de deslocamento químico, enquanto grupos retiradores produzem o efeito oposto. Por exemplo, os compostos **4i** e **4j** são os que possuem maiores valores de deslocamento para ambos hidrogênios devido a maior deficiência eletrônica causada pelo grupo nitro. O efeito doador/retirador do substituinte sobre a eletrofilia do carbono C3 será de fundamental importância para a discussão acerca da atividade anti-ureolítica dos ácidos hidroxâmicos no tópico 3 da seção Resultados.

Tabela 3. Deslocamentos químicos (δ) de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) e constantes de acoplamento (J) para H2 e H3 dos ácidos hidroxâmicos **4a** a **4k**

Composto	R	H ₃	H ₂	J (Hz)	Ref.
		δ (ppm); multiplicidade	δ (ppm); multiplicidade	acoplamento H ₂ -H ₃	
4a	4-H	7,38-7,48; m	6,47; d	16,0	113
4b	4-F	7,45; d	6,40; d	16,0	131
4c	4-Cl	7,43-7,47; m	6,46; d	16,0	132
4d	4-Br	7,43; d	6,48; d	16,0	131
4e	4-OMe	7,40; d	6,32; d	16,0	131
4f	4-NMe ₂	7,31-7,38; m	6,19; d	12,0	-
4g	4-CF ₃	7,53; d	6,59; d	16,0	133
4h	1,3-dioxolano	7,37; d	6,29; d	16,0	133
4i	4-NO ₂	7,57; d	6,65; d	16,0	131
4j	3-NO ₂	7,59; d	6,65; d	16,0	-
4k	4-NO ₂ reduzido	2,95; t	2,32; t	8,0	-

5.3. Atividade anti-ureolítica

5.3.1. Determinação dos valores de concentração inibitória média (CI₅₀)

Os testes de inibição enzimática foram conduzidos utilizando-se o método do indofenol na presença de urease de *Canavalia ensiformis* purificada. Inicialmente os compostos **4a** a **4i**

foram testados na concentração de 20 μ M para determinar quais apresentariam atividade inibitória superior ao composto referência, o ácido acetoidroxâmico (AAH). As médias de inibição encontradas são mostradas na Figura 36, assim como os valores de desvio padrão. Os resultados de média de inibição indicam uma tendência de crescimento da atividade inibidora com o caráter retirador de elétrons do grupo R. Uma comparação mais precisa dos resultados foi obtida aplicando-se *one-way* ANOVA às médias de inibição ($\alpha = 0,05$; pvalor < 0,0001) com pós-teste de Scott-Knott ($\alpha = 0,05$) para agrupamento dos compostos de acordo com suas capacidades inibidoras (Figura 36).

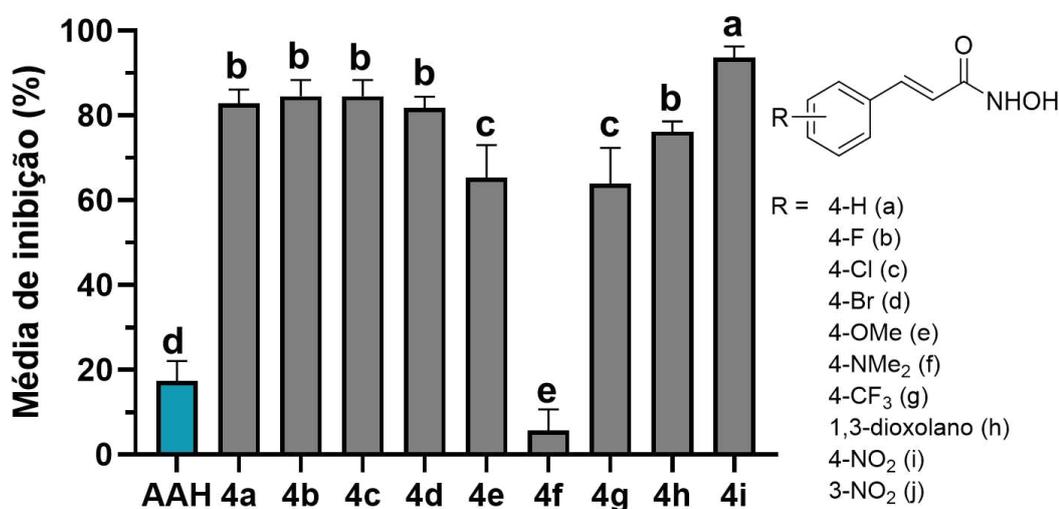


Figura 36. Médias de inibição e desvio padrão para urease de *Canavalia ensiformis* na concentração de 20 μ M dos compostos **4a-4i**. Letras distintas no topo das barras indicam diferenças significativas (teste de Scott Knott; $p < 0,05$). AAH, ácido acetohidroxâmico

Os compostos identificados pelas letras **a**, **b** e **c** foram mais ativos que o AAH (17,4% de inibição) como indicado pelas suas porcentagens de inibição superiores a 60%. Ao contrário dos demais ácidos cinamoilidroxâmicos, o composto **4f** (5,7% de inibição) apresentou média de inibição cerca de três vezes menor que o AAH, indicando que a presença de um forte doador de densidade eletrônica seria desfavorável a atividade.

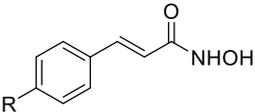
Os resultados da triagem inicial foram o critério determinante para quais compostos seriam incluídos nos estudos de CI_{50} , sendo que apenas os mais ativos que AAH seriam considerados. Considerando que o composto **4i** apresentou a maior capacidade inibidora na concentração de 20 μ M, a determinação dos valores de CI_{50} incluiu o composto **4j** a fim de se avaliar a influência da posição do grupo nitro no anel aromático na atividade inibitória. Semelhantemente, o composto **4k** foi sintetizado e testado para avaliar o efeito da ligação dupla

conjugada na atividade inibidora, uma vez que aceptores de Michael podem interagir com os resíduos de cisteína presentes no *flap* móvel da urease.

Os valores de CI_{50} , mostrados na Tabela 4, foram determinados utilizando-se o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO). AAH apresentou valor de CI_{50} igual a $101,0 \pm 10,3 \mu\text{M}$, similar ao descrito na literatura ($CI_{50} = 120 \mu\text{M}$) para urease de *Canavalia ensiformis*.⁶⁸ Os resultados obtidos sugerem uma relação direta entre o efeito retirador de elétrons do grupo R e a atividade anti-ureolítica, indicando que o potencial inibitório cresça com a eletrofilia do carbono β . Essa tendência é exemplificada quando observado que o composto **4i** (R=4-NO₂, $CI_{50} = 3,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$) exibe maior atividade que **4a** (R=4-H, $CI_{50} = 7,6 \pm 0,3 \mu\text{M}$) que, por sua vez, é mais ativo que **4e** (R= 4-OMe, $CI_{50} = 12,8 \pm 0,9 \mu\text{M}$). Os valores de CI_{50} para **4j** também estão de acordo com essa observação. A presença do grupo nitro na posição *meta* reduz o efeito retirador de elétrons no carbono β , resultando em um valor maior de CI_{50} quando comparado ao composto com o grupo nitro na posição *para*.

Os resultados da Tabela 4 também revelam uma redução significativa da atividade inibidora quando não há ligação dupla entre os C2-C3, como evidenciado pela potência do composto **4i** ser aproximadamente 10 vezes maior que a do composto **4k**. Estes resultados corroboram a hipótese de interação do resíduo de cisteína com a ligação dupla conjugada e ressaltam o aumento do efeito antiureolítico alcançado com híbridos moleculares de ácidos hidroxâmicos e aceptores de Michael.

Tabela 4. Porcentagens médias de inibição na concentração de 20 μM e valores de CI_{50} dos ácidos cinamoilidroxâmicos sintetizados para urease de *Canavalia ensiformis*

Composto	R	% Inibição a 20 μM	CI_{50} (μM)
		Média ^a \pm DP	Média ^b \pm DP
AAH	-	17,4 \pm 4,8	101,0 \pm 10,3
4a	4-H	82,9 \pm 3,2	7,6 \pm 0,3
4b	4-F	84,5 \pm 3,9	4,8 \pm 0,3
4c	4-Cl	80,1 \pm 1,8	5,9 \pm 0,5
4d	4-Br	81,8 \pm 2,7	5,7 \pm 1,4
4e	4-OMe	65,3 \pm 7,8	12,8 \pm 0,9
4f	4-NMe ₂	5,7 \pm 5,0	^c
4g	4-CF ₃	64,0 \pm 8,4	10,0 \pm 1,0
4h	1,3-dioxolano	76,3 \pm 2,4	10,1 \pm 2,4
4i	4-NO ₂	93,7 \pm 2,6	3,8 \pm 0,1
4j	3-NO ₂	^c	6,0 \pm 0,4
4k	4-NO ₂ reduzido	^c	43,0 \pm 2,7

^aNormalidade avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,05$; $p_{\text{valor}} = 0,0688$) e homocedasticidade pelo teste de Cochran ($\alpha = 0,05$; $C_{\text{tabelado}} = 0,3733$; $C_{\text{calculado}} = 0,2936$). ^bOs valores CI_{50} foram determinados utilizando-se MMQO. ^cNão foram avaliados no experimento.

5.3.2. Efeito dos ácidos hidroxâmicos sintetizados nos parâmetros cinéticos de urease de *Canavalia ensiformis*

Os compostos **4a**, **4e**, **4i** e **4k** foram escolhidos para os ensaios de avaliação dos parâmetros cinéticos de urease de *Canavalia ensiformis* para uma melhor compreensão dos seus mecanismos de inibição e, mais especificamente, explorar se as diferenças estruturais resultavam em diferentes tipos de inibição. Na Figura 37 está representado o gráfico da velocidade inicial (V_0) em função da concentração de ureia, obtido nos ensaios com **4i**, exemplificando o comportamento catalítico do tipo Michaelis-Menten para a urease. Esse comportamento foi observado para as análises com os demais ácidos hidroxâmicos, sendo encontrados valores de K_m igual a $4,0 \pm 1,2$ mM e velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) igual a $3,1 \pm 0,5$ $\mu\text{mol NH}_4^+$ por minuto por mg de proteína, de acordo com o encontrado na literatura.^{96,134}

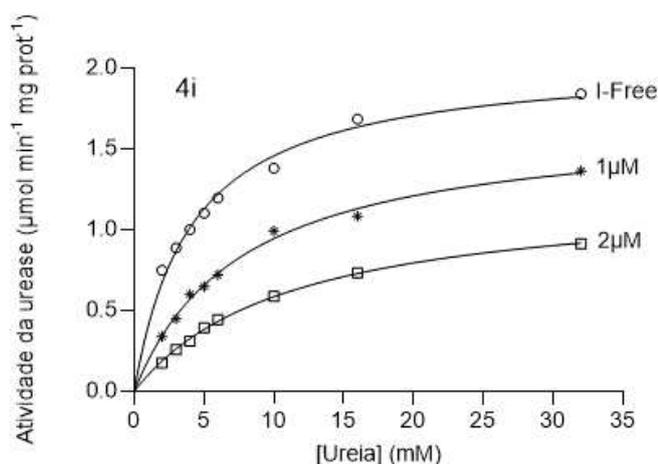


Figura 37. Gráfico do tipo Michaelis-Menten para urease de *Canavalia ensiformis* nos ensaios com o composto **4i** na presença e ausência de inibidor (I-Free). Concentrações de ureia entre 1-32 mM

Nos gráficos de Lineweaver-Burk (Figura 38) observa-se que para os compostos **4a** e **4i**, as linhas se interceptam no segundo quadrante, indicando uma inibição do tipo mista. Um inibidor misto clássico é definido pela sua capacidade de se ligar à enzima livre e ao complexo enzima-substrato (ES).¹³⁵ Duas constantes de equilíbrio de dissociação, K_i e K_i' , estão associadas a uma inibição mista, sendo K_i referente a dissociação do complexo enzima-inibidor (complexo EI) e K_i' , associada à dissociação do complexo enzima-inibidor-substrato (ESI). As constantes K_i e K_i' para **4a** e **4i** são mostradas na Tabela 5. Em contraposição, nos gráficos de **4e** e **4k** a intercepção das retas ocorre no eixo y, um padrão característico de inibições competitivas. Nesse caso, o inibidor é capaz de se ligar apenas à enzima livre, impedindo a ligação do substrato e resultando em uma única constante de equilíbrio de dissociação (K_i), relacionada ao complexo EI. Devido inibidores competitivos se ligarem a enzima de modo que impeça a ligação do substrato é possível assumir que tal tipo de inibidor se ligue diretamente ao sítio ativo enzimático. Todavia, como discutido por Copeland,¹³⁵ o inibidor competitivo também pode se ligar a um sítio alostérico da enzima impedindo a ligação do substrato com o sítio ativo.

As diferenças observadas entre os efeitos causados pelos compostos avaliados nos parâmetros cinéticos da urease mostram que os ácidos cinamoilidroxâmicos sintetizados inibem a enzima por mecanismos distintos. Em geral, ácidos hidroxâmicos são conhecidos como inibidores competitivos que se ligam aos íons níquel do sítio ativo através de seus átomos de oxigênio.¹³⁶⁻¹³⁹ Esse tipo de inibição foi observado para os compostos **4e** e **4k**, sendo possível inferir que interajam com o sítio ativo de maneira semelhante. Todavia, os compostos **4a** e **4i** comportaram-se como inibidores mistos. Apesar de inibidores mistos serem definidos pela sua

ligação a um sítio alostérico da enzima, na literatura são descritos derivados de ácido hidroxâmico que exibem padrão de inibição do tipo misto, mas interagem com o sítio ativo e com um sítio alostérico.¹⁴⁰⁻¹⁴² Semelhantemente, Copeland também discute as possibilidades mecânicas para que um inibidor que se ligue ao sítio ativo exiba um padrão típico de inibidores mistos.¹³⁵

Considerando-se as características estruturais dos ácidos cinamoilhidroxâmicos avaliados é possível sugerir que a eletrofilia do carbono β influencie no tipo de inibição por meio da sua possível ligação com o resíduo de cisteína presente no *flap* móvel da enzima. Nos compostos **4a** e **4i** o carbono β é suficientemente eletrofílico para se ligar ao sítio alostérico, podendo interagir com o sítio ativo via grupo hidroxamato e com o resíduo de cisteína via ligação dupla. Entretanto, no composto **4e**, o efeito doador de densidade eletrônica do grupo metoxila reduz a eletrofilia do carbono β , resultando em sua ação apenas como inibidor competitivo. A mesma conclusão pode ser aplicada ao composto **4k**, no qual não existe ligação dupla entre C2-C3, o que impede a ligação com sítio alostérico.

Os valores de constantes de equilíbrio de dissociação (Tabela 5) revelam que **4i** tem uma maior afinidade pela enzima livre e pelo complexo ES que os demais compostos testados, em concordância com os valores de CI_{50} observados. Os resultados para **4a** e **4i** também mostram que os valores de K_i são superiores aos de K_i' , evidenciando que esses compostos possuem maior afinidade pela enzima livre do que pelo complexo enzima-substrato.

*Tabela 5. Efeito dos ácidos hidroxâmicos na cinética de urease de *Canavalia ensiformis**

Composto	Tipo de inibição	K_i (μM)*	K_i' (μM)*
		Média \pm EP	Média \pm EP
4a	Mista	0,99 \pm 0,07	25,3 \pm 7,0
4e	Competitiva	3,3 \pm 0,3	-
4i	Mista	0,44 \pm 0,07	5,7 \pm 2,9
4k	Competitiva	7,3 \pm 2,1	-

* K_i representa a constante de equilíbrio de dissociação para o complexo EI e K_i' a constante de equilíbrio para o complexo ESI. Urease incubada com ureia (1-32 mM) na presença ou ausência de ácidos hidroxâmicos (1-60 μM).

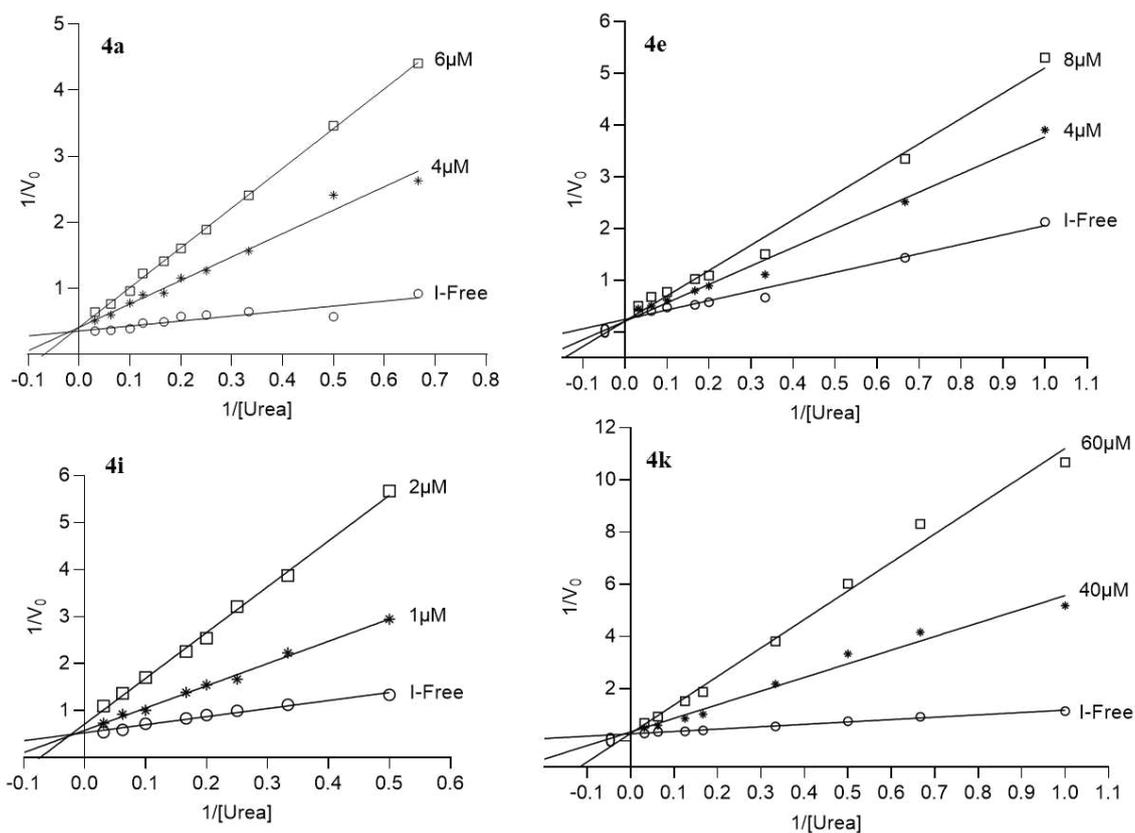


Figura 38. Gráficos de Lineweaver-Burk para os compostos **4a**, **4e**, **4i** e **4k** na presença ou ausência (*I-Free*) de inibidor e em concentrações de ureia variando entre 1-32 mM

5.4. Estudos de biofísica

5.4.1. Estudos de interação e parâmetros termodinâmicos

Os estudos discutidos abaixo foram realizados em parceria com o grupo de pesquisa do professor Dr. Josué C. C. Santos do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

Diante dos resultados obtidos pelos experimentos de cinética, estudos biofísicos de interação entre os ácidos hidroxâmicos **4a**, **4e**, **4i** e **4k** e a urease de *Canavalia ensiformis* foram conduzidos a fim de se investigar o mecanismo de ação desses compostos no processo de inibição da enzima. Normalmente, a fluorescência intrínseca das proteínas está associada a três fluoróforos: resíduos de triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe). Entretanto, para a urease, o resíduo Phe tem um baixo rendimento quântico de fluorescência ($\Phi = 0,04$) e a fluorescência do resíduo Tyr ($\Phi = 0,14$) é quase totalmente suprimida por interações com grupos carboxilas das cadeias peptídicas ou por transferência de energia para o resíduo de

Trp.^{122,143} Assim, a urease é uma enzima multitriptofano, possuindo quatro resíduos Trp nas posições 495, 648, 708 e 728, sendo esse o maior contribuinte da fluorescência intrínseca da proteína e utilizado para obter informações sobre processos de interação urease-ligante e mudança conformacional na estrutura nativa da enzima induzida pelo ligante ao redor do sítio ativo.¹⁴³⁻¹⁴⁵

O processo de interação entre os ácidos hidroxâmicos e a urease no estado estacionário foi avaliado a partir de titulações fluorimétricas baseando-se na fluorescência intrínseca dos resíduos de aminoácidos fluorogênicos da urease. A intensidade de fluorescência da urease na ausência e presença dos derivados **4a**, **4e**, **4i** e **4k** foi monitorada em 337 nm ($\lambda_{ex} = 280$ nm). Na Figura **39** está representado o gráfico da titulação da urease com **4i**, os demais compostos avaliados apresentaram perfil semelhante (Figura **S105**, encontrada na seção anexos). A adição de quantidades crescentes de **4i** à urease levou a supressão da intensidade de fluorescência e um deslocamento do $\lambda_{m\acute{a}x}$ de emissão de 337 para 346 nm (Figura **39A**). Para se avaliar a força da interação entre a urease e os ácidos hidroxâmicos sintetizados, a constante de ligação (K_b) foi calculada usando os modelos não-lineares descritos nas equações **1** e **2**.^{146,147}

$$\frac{F_0 - F}{F_0 - F_c} = \frac{[P]_t + [L]_a + K_d - \sqrt{([P]_t + [L]_a + K_d)^2 - 4 \times [P]_t \times [L]_a}}{2 \times [P]_t} \quad (1)$$

$$K_b = \left(\frac{1}{K_d} \right) \quad (2)$$

Na equação 1 F_0 e F correspondem a fluorescência na ausência e na presença do ligante, respectivamente. F_c é a fluorescência da proteína totalmente complexada, $[P]_t$ é a concentração total de proteína, $[L]_a$ é a concentração adicionada do ligante, K_d é a constante de dissociação e o inverso dessa confere K_b .¹⁴⁶ Para avaliar a afinidade dos derivados ácidos hidroxâmicos (**4a**, **4e**, **4i** e **4k**) estudados com a urease, os valores de K_d foram comparados (Figura **39B**), sendo que, quanto menor K_d , maior K_b e consequentemente maior a afinidade do composto à enzima.^{146,147} Assim, o derivado **4i** (R = 4-NO₂) apresentou uma maior interação com a urease que o **4a** (R = 4-H), seguido do **4e** (R = 4-OMe), tendo esse a maior afinidade à enzima, demonstrando a importância da eletrofilia da ligação dupla no processo de interação/reação, corroborando os resultados de inibição. Nesse sentido, a maior interação de **4i** com a urease pode estar associada a dois fatores: i) a ligação dupla do sistema α,β -insaturado, que pode levar a reações com grupos nucleofílicos presentes na urease; ii) ao grupo retirador de densidade

eletrônica (NO_2), que pode levar a ligações de hidrogênio ou eletrostáticas ou outras com resíduos de aminoácidos que são essenciais para que a enzima exerça sua função. No geral, os compostos avaliados seguiram a seguinte ordem de afinidade pela enzima: $4i > 4a > 4e > 4k$, corroborando os resultados de inibição. Avaliando a correlação das variáveis independentes K_d e CI_{50} (Figura S106, encontrada na seção anexos), bem como a influência dessas no mecanismo de ação dos compostos avaliados frente a urease, pôde-se notar uma correlação positiva ($R^2 = 0,72219$) com propriedades diretamente proporcionais, em que, quanto maior a afinidade do derivado ácido hidroxâmico (K_d menor), maior inibição (CI_{50} menor).

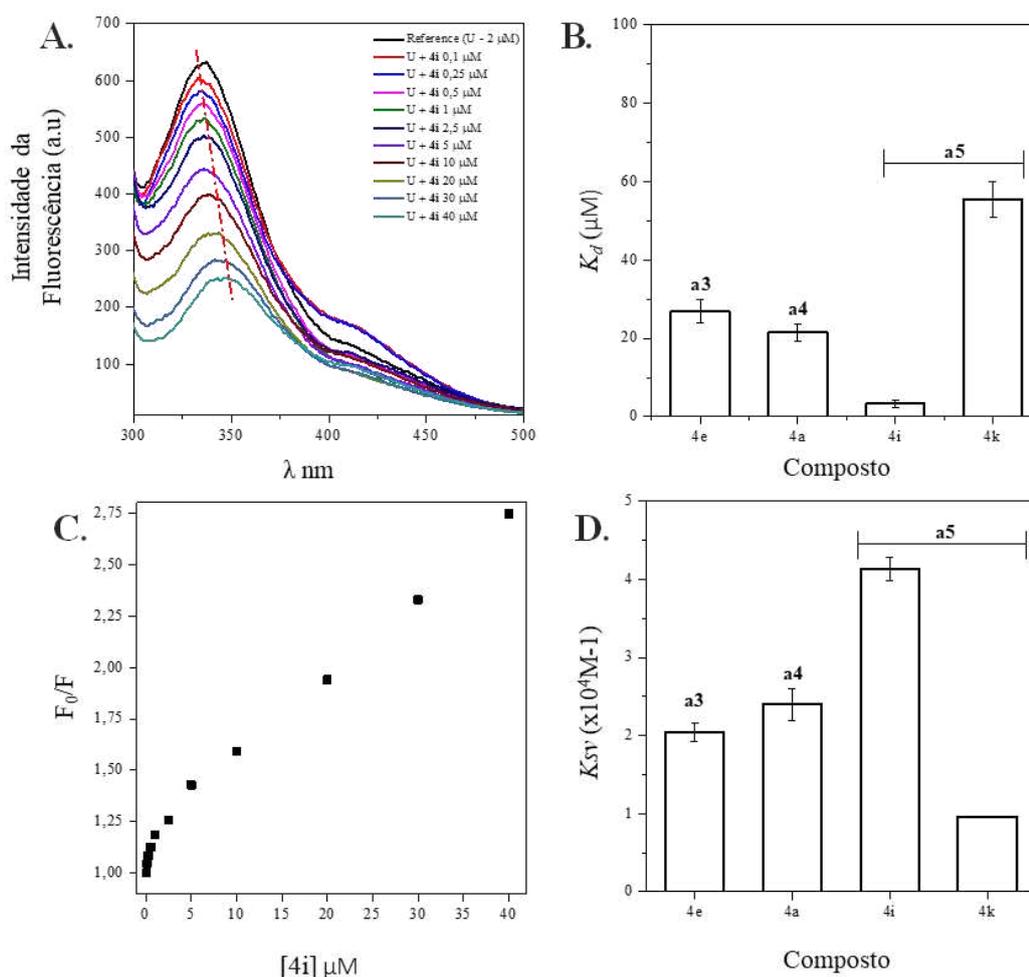


Figura 39. Interação da urease com os ácidos hidroxâmicos **4a**, **4e**, **4i** e **4k**. A) Titulação fluorimétrica da urease com o derivado **4i**; B) Constante de ligação K_d da urease com os derivados **4a**, **4e**, **4i** e **4k**; C) Gráfico de Stern-Volmer para o **4i**-urease em função da concentração de **4i**; D) Constante de quenching da urease com os derivados **4a**, **4e**, **4i** e **4k**

Utilizando-se a equação 3 calculou-se a constante de quenching (K_{sv}) para os compostos avaliados (Figura 39D), as quais seguiram a mesma tendência observada para constante de

ligação, **4i** (R = 4-NO₂) > **4a** (R = 4-H) > **4e** (R = 4-OMe), demonstrado que a ligação dupla do sistema α,β -insaturado também influencia no processo de supressão da intensidade de fluorescência. Além disso, a fim de saber a influência do substituinte no processo de inibição da urease, foi avaliado o mecanismo de *quenching* preferencial entre os derivados com o grupo eletroador (**4e**) e eletroretirador (**4i**), usando-se a equação de Stern-Volmer (Equação 3):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (3)$$

Nesta equação F_0 e F são, respectivamente, as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do derivado ácido hidroxâmico. K_q é a constante da taxa de extinção biomolecular, τ_0 é o tempo de vida média (10^{-8} s) e $[Q]$ é a concentração do ligante (*quencher*). Assim, o aumento da temperatura leva a um aumento no número de colisões entre o fluoróforo (urease) e a espécie *quencher*, gerando a ocorrência de um *quenching* dinâmico; o valor de K_{sv} será diretamente proporcional à temperatura. Por outro lado, no *quenching* estático, o aumento da temperatura ocasiona uma redução do valor de K_{sv} , ou seja, essas variáveis serão inversamente proporcionais, pois com o aumento da temperatura o complexo formado tende a se desestabilizar, reduzindo assim o valor da constante.¹⁴⁸ Assim, para os compostos **4e** e **4i**, o aumento da temperatura levou a diminuição de K_{sv} (Tabela 6), indicando o *quenching* estático como o dominante no complexo formado. Adicionalmente, como os valores de $K_q > 2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (constante de difusão limitante), o *quenching* dominante no sistema supramolecular formado é estático.^{119,148} Ademais, as forças preferenciais que estabilizam os sistemas **4e**-urease e **4i**-urease foram avaliadas a partir do cálculo dos parâmetros termodinâmicos obtidos, usando três temperaturas distintas (Tabela 6), a partir da linearização da equação de Van't Hoff (Equação 4):

$$\log K_b = - \frac{\Delta H}{R} X \left| \frac{1}{T} \right| + \frac{\Delta S}{R} \quad (4)$$

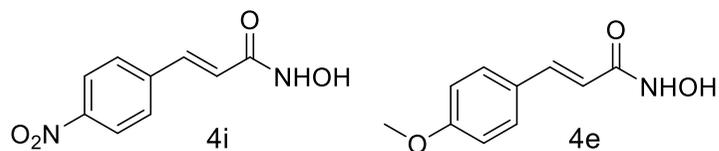
Nesta equação T é a temperatura em Kelvin (K) e R a constante dos gases ideais. Na Figura S108 (encontrada na seção anexos) representa a linearização gráfica da Equação 4. A energia livre de Gibbs (ΔG) foi calculada usando a Equação 5:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (5)$$

Considerando os valores negativos calculados para ΔG (Tabela 6), pode-se inferir que a formação dos sistemas **4e** e **4i**-urease ocorreu espontaneamente ($\Delta G < 0$). As forças de ligação preferenciais em ambos os sistemas foram interações eletrostáticas já que $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$, possivelmente sugerindo interação com íons Ni (II) no sítio ativo ou resíduos de aminoácidos carregados na cadeia lateral.¹²²

Tabela 6. Parâmetros de ligação e termodinâmicos entre os derivados do ácido hidroxâmico **4e** e **4i** e a urease de *Canavalia ensiformis*

Ligante	T (°C)	Parâmetros de ligação					Parâmetros termodinâmicos			
		K_{sv} ($\times 10^4 \text{ M}^{-1}$)	R	K_q ($\times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	K_d (μM)	K_b ($\times 10^5 \text{ M}^{-1}$)	r^2	ΔG (Kj mol^{-1})	ΔH (Kj mol^{-1})	ΔS (J mol^{-1})
4e	22	2,77 ($\pm 0,14$)	0,9762	2,77	15,67 ($\pm 1,66$)	0,64 ($\pm 0,07$)	0,9168	-4,42		
	30	2,75 ($\pm 0,22$)	0,9309	2,75	18,06 ($\pm 1,91$)	0,55 ($\pm 0,06$)	0,9457	-4,11	-18,8	+38,56
	38	2,33 ($\pm 0,09$)	0,9839	2,33	21,77 ($\pm 1,73$)	0,46 ($\pm 0,04$)	0,9592	-3,80		
4i	22	4,25 ($\pm 0,15$)	0,98499	4,25	2,15 ($\pm 0,31$)	4,65 ($\pm 0,66$)	0,9460	-31,24		
	30	4,14 ($\pm 0,15$)	0,99406	4,14	3,25 ($\pm 0,29$)	3,08 ($\pm 0,24$)	0,9736	-31,23	-31,6	+1,22
	38	3,95 ($\pm 0,09$)	0,98946	3,95	4,16 ($\pm 0,34$)	2,40 ($\pm 0,19$)	0,9811	-31,22		



5.4.2. Avaliações de mudanças conformacionais na cadeia polipeptídica da urease

As mudanças conformacionais nos resíduos de Tir e Trp da urease advindas da presença dos derivados **4e** e **4i** foram avaliadas por fluorescência tridimensional (3D) (Figura 40). Nos espectros de fluorescência 3D (Figura 40), podem ser avaliados três picos de emissão: *i*) o pico 1, que corresponde ao efeito de dispersão Rayleigh, caracterizada pela reemissão de radiação ($\lambda_{ex} = \lambda_{em}$) da água (solvente); *ii*) o pico 2, que corresponde à emissão dos resíduos Trp e Tir excitados a 280 nm; *iii*) e o pico 3 que corresponde à excitação de estados eletrônicos mais excitados dos resíduos aromáticos presentes na proteína, informando sobre o microambiente destes.¹⁴⁹

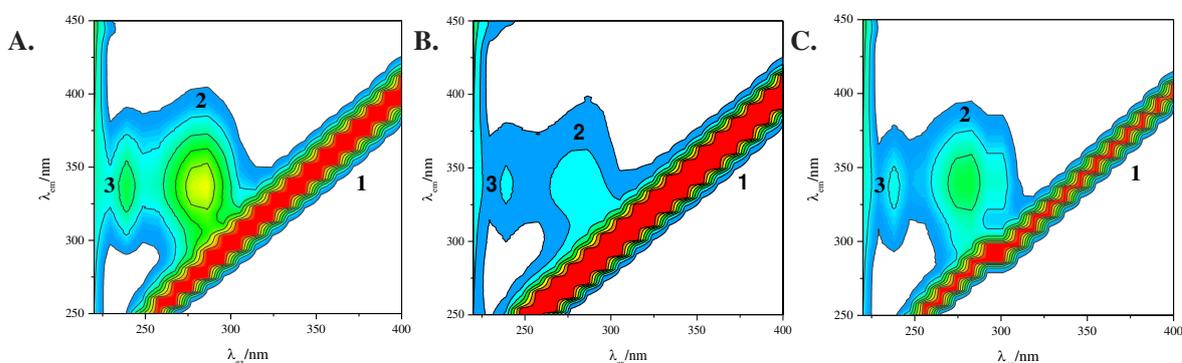


Figura 40. Espectros de fluorescência tridimensional da urease livre $2\mu\text{M}$ (A), na presença de $10\mu\text{M}$ de **4i** (B) e $10\mu\text{M}$ de **4e** (C). Condições: tampão fosfato de sódio 20mM pH 7,4, 30°C

Quando se avaliam os picos 2 e 3 da Figura 40 de modo quantitativo (Tabela 7), nota-se que as intensidades de fluorescência (IF) dessas regiões foram reduzidas entre 25-39% quando adicionados os ligantes (**4e** e **4i**). Esses resultados indicam que podem estar ocorrendo mudanças na estrutura nativa da urease, principalmente no microambiente próximo aos resíduos dos aminoácidos fluorogênicos Trp e Tir.^{122,149} Além disso, pode-se notar que o composto com substituinte eletroretirador (**4i**) reduz em até 10% a mais a IF em relação ao composto com o grupo eletrodoador (**4e**).

Tabela 7. Parâmetros de fluorescência 3D para urease livre (2 μ M) e na presença de **4e** e **4i** (10 μ M) em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, 30 °C

Ligante	Pico	Urease			(Ligante-Urease) 10 μ M		
		Posição ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)	Stokes* $\Delta\lambda$ (nm)	IF ² (a.u.)	Posição ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)	Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	IF (a.u.)
	1	$\lambda_{ex}^{150}=\lambda_{em}$	0	>1000	$\lambda_{ex}=\lambda_{em}$	0	>1000
4e	2	286/334	48	521,3 (100%)	286/336	50	379,7 (73%)
	3	238/336	98	383,4 (100%)	238/339	101	285,4 (74%)
	1	$\lambda_{ex}=\lambda_{em}$	0	>1000	$\lambda_{ex}=\lambda_{em}$	0	>1000
4i	2	286/338	52	742,3 (100%)	283/342	59	462,1 (62%)
	3	238/337	99	468,4 (100%)	238/339	101	295,2 (63%)

*Deslocamento de Stokes ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$); 2- IF = intensidade de fluorescência

Os estudos de fluorescência sincronizada também foram usados para avaliar as mudanças conformacionais no microambiente dos resíduos de aminoácidos fluorogênicos da urease (Tyr e Trp) e as interações preferenciais dos derivados **4e** e **4i** (Tabela 8). As diferenças entre os comprimentos de onda de excitação e emissão ($\Delta\lambda = \lambda_{ex} - \lambda_{em}$) foram usadas como parâmetro de avaliação da mudança de polaridade nos resíduos de aminoácidos, em que, $\Delta\lambda = 15$ nm e $\Delta\lambda = 60$ nm foram usados para avaliar o Tyr e Trp, respectivamente. A partir desse ensaio, pôde-se notar que o tipo de substituinte presente no derivado ácido hidroxâmico pode interferir em qual resíduo de aminoácido fluorogênico da urease o composto interage preferencialmente. Ambos os compostos (**4e** e **4i**) levaram à diminuição na polaridade no microambiente da Tyr (mudança negativa de $\lambda_{máx}$), entretanto, a magnitude de K_{sv} demonstrou que **4e** levou a uma mudança mais eficiente nessa região. Por outro lado, o microambiente do Trp sofreu um aumento da polaridade (mudança positiva de $\lambda_{máx}$), principalmente na presença de **4e**. Entretanto, **4i** apresentou uma maior influência nessa região, que pôde ser quantificada a partir da maior constante de *quenching*. Esses fatos estão associados a mudanças na estrutura nativa da urease.¹²²

Tabela 8. Parâmetros de ligação adquiridos no ensaio de fluorescência sincronizada para os derivados **4e** e **4i**

Composto	Parâmetros de Stern-Volmer (Ksv)			Deslocamento de emissão $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
	$\Delta\lambda$ (nm)	10^4 M^{-1}	r	
4e	15	6,02 ($\pm 0,298$)	0,98916	- 3
	60	3,32 ($\pm 0,189$)	0,98415	+ 6
4i	15	2,94 ($\pm 0,142$)	0,99083	- 3
	60	3,50 ($\pm 0,157$)	0,99401	+ 3

Assim, considerando que os resíduos de Tyr (410 e 544) da urease estão próximos do sítio ativo,^{120,122} infere-se que o substituinte eletrodoador (OMe) presente no **4e** pode influenciar no processo de interação nessa região. Os resíduos de Trp (495 e 648) da urease, por sua vez, estão próximos do sítio catalítico da enzima,^{120,122} como **4i** possui um grupo eletroretirador NO₂, esse pode auxiliar o processo de interação nessa região a partir de ligações de H.

5.4.3. Avaliação da formação do complexo via UV-vis

Os derivados do ácido hidroxâmico avaliados são compostos α,β -insaturados que podem reagir via adição de Michael na presença de compostos apropriados (nucleófilos). Assim, considerando que a urease possui resíduos de aminoácidos com grupamentos sulfidrila livres, que podem atuar como nucleófilos, foram realizados estudos para avaliar se o possível mecanismo de inibição da urease por esses compostos pode estar associado com essa via. Inicialmente, a reação/interação entre o **4e** ou **4i** e a cisteína (aminoácido modelo) ou urease foi avaliada utilizando espectrometria de absorção no UV-vis. Essa técnica possibilita a identificação da formação de complexos supramoleculares e eventuais modificações estruturais na macromolécula por meio de alterações espectrais.^{145,151} A Figura **41** apresenta o espectro de absorção (220 – 500 nm) de **4e/4i**, da Cis, da urease e do produto da reação/interação **4e**-Cis/urease e **4i**-Cis/urease.

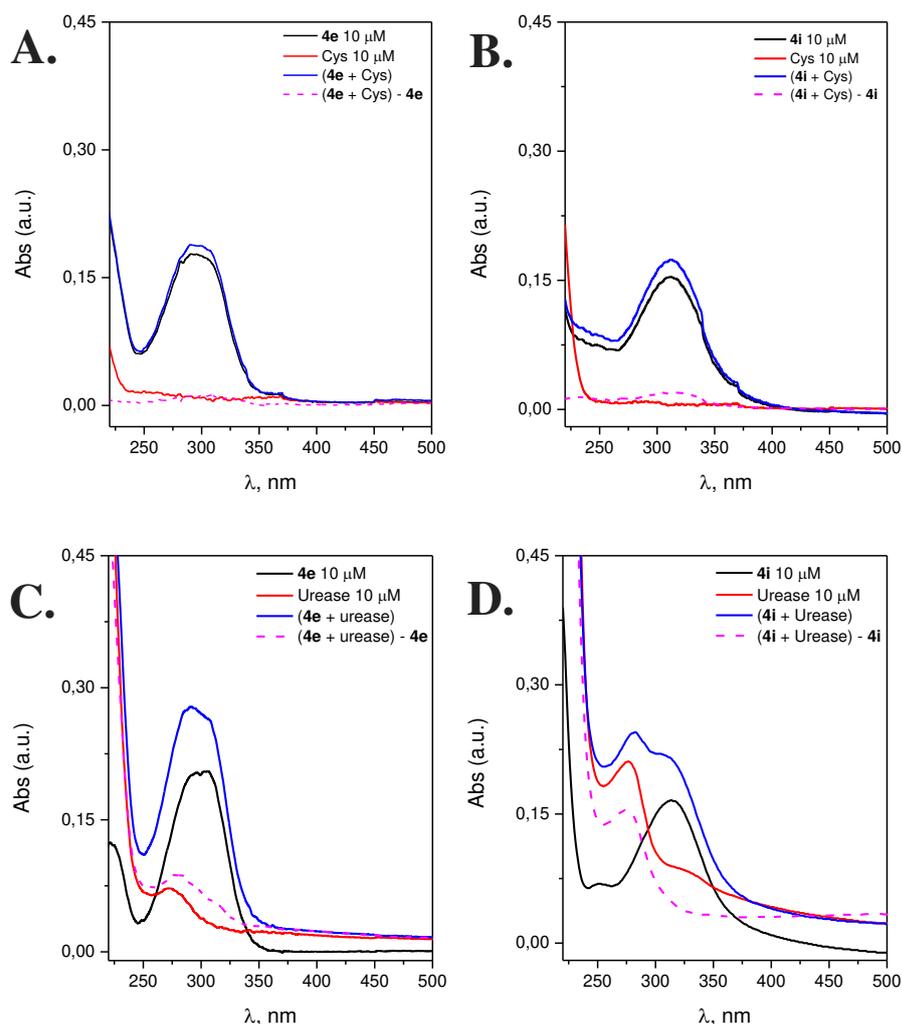


Figura 41. Espectro de absorção no UV-vis para os três sistemas avaliados. A. **4e** (10 μM), Cis (10 μM) e complexo **4e + Cis**; B. **4i** (10 μM), Cis (10 μM) e complexo **4i + Cis**; C. **4e** (10 μM), urease (10 μM) e o complexo **4e + urease**; D. **4i** (10 μM), urease (10 μM) e o complexo **4i + urease**. Condições: tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, 30 °C

Como pode ser observado nos perfis espectrais da Figura 41, o produto formado entre os compostos **4e** ou **4i** e a Cis levaram a um efeito hipercrômico e um deslocamento para o azul de ~7 nm em relação aos compostos livres. Além disso, a subtração da absorção de **4e** ou **4i** livre do espectro de absorção do produto formado entre os compostos e a Cis [(**4e + Cis**) - **4e** ou (**4i + Cis**) - **4i**] não se sobrepõem ao espectro da Cis livre, indicando que pode estar ocorrendo uma reação/interação no sistema avaliado. De modo semelhante, o produto formado entre os compostos citados acima e a urease levaram a ao aumento na intensidade de absorção e um efeito hipscrômico de ~ 7 nm em relação a absorção dos compostos livres, bem como, não houve sobreposição espectral entre (urease) e [(**4e + urease**) - **4e** ou (**4i + urease**) - **4i**],

confirmando que está ocorrendo reação/interação que leva a mudanças conformacionais nas cadeias polipeptídicas da enzima.¹⁵²

A reação entre o **4e** e/ou **4i** e os grupos sulfidrilas também foi avaliada usando o ensaio de Ellman, que se baseia na quantificação de tióis livres a partir da formação do agente cromóforo ácido 2-nitro-5-tiobenzóico (TNB, $\lambda_{\text{máx}} = 412 \text{ nm}$) resultante da reação entre o ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) e grupos tióis livres.¹²¹ Os estudos usando DTNB foram realizados usando a Cis (Figura 38 A1 e B1), ácido 3-mercaptopropiônico (MPA) (Figura 42 A2 e B2) e urease (Figura 42 A3 e B3) como fontes de grupos tióis (R-SH), na presença e na ausência dos ácidos hidroxâmicos **4e** (Figura 42 A1 -3) e **4i** (Figura 42 B1 - 3). O sinal de referência consiste no sistema contendo apenas DTNB + R-SH.

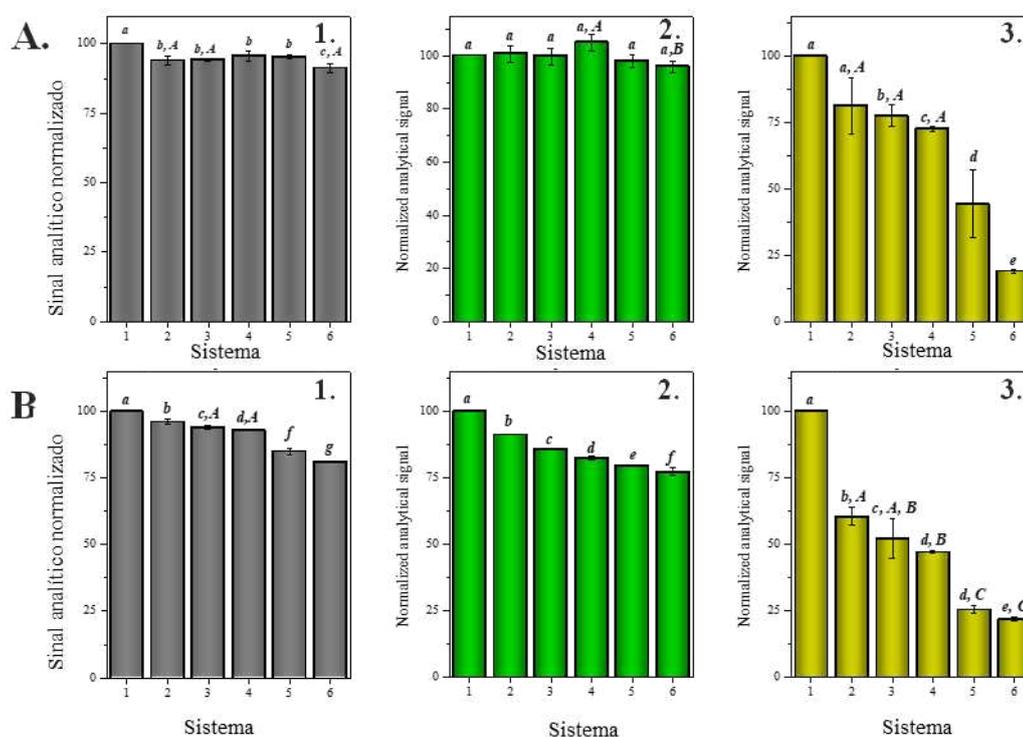


Figura 42. Sinal analítico normalizado dos sistemas contendo cisteína ($50 \mu\text{M}$, em cinza), MPA ($50 \mu\text{M}$, em verde) ou urease ($5 \mu\text{M}$, em amarelo), na presença de **4e** (gráficos indicados por A) ou **4i** (gráficos indicados por B) nas concentrações entre $0\text{-}50 \mu\text{M}$ (Sistemas 1 a 6) e DTNB ($50 \mu\text{M}$). Condições: tampão fosfato de sódio 20 mM pH $7,4$, 30°C . Os valores foram representados como média \pm SD ($n = 3$). As colunas seguidas por diferentes letras são correspondentes a diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Para os sistemas contendo cisteína ou MPA, pôde-se notar que o perfil do substituinte pode interferir bastante no processo de reação/interação. O composto **4i**, que apresenta o

substituinte eletroretirador, apresentou diferença significativa em relação ao sinal referência em todas as concentrações avaliadas (teste de Tukey, $p \leq 0,05$) para os dois R-SH citados. **4e** por sua vez, apresentou diferença significativa (teste de Tukey, $p \leq 0,05$) em relação ao sinal de referência apenas para o sistema contendo Cis, entretanto, o derivado com substituinte eletroretirador suprimiu o sinal com uma eficiência de aproximadamente duas vezes a mais que **4e**. Para o sistema contendo urease, todas as concentrações avaliadas do derivado **4i** apresentaram diferença significativa (teste de Tukey, $p \leq 0,05$) em relação ao sinal de referência, além disso, na menor concentração avaliada no ensaio, o composto apresentou uma eficiência ~4,5 vezes maior que **4e**. Assim, a presença do grupo eletrodoador (OMe) ou eletroretirador (NO₂), pode influenciar o processo de reação e/ou interação, deixando o sistema molecular com maior ou menor densidade eletrônica, o que pode interferir em possíveis reações ou em interações que possam vir a afetar o mecanismo de inibição da enzima.

Por apresentar a maior supressão do sinal analítico (TNB, $\lambda = 412$ nm) no sistema contendo Cis e urease em relação a **4e**, foi realizado um ensaio cinético (**4i**, $\lambda_{\text{máx}} = 312$ nm) durante 120 min em sistemas contendo **4i** e as duas biomoléculas para avaliar o comportamento de reação/interação dessas substâncias (**Figura S107**, encontrada na seção anexos). Para ambos os sistemas (**4i** + Cis) e (**4i** + urease) houve uma diminuição da intensidade de absorção em relação a **4i** livre e estabilização do produto formado durante o tempo de avaliação, indicando assim a possibilidade de o composto estar reagindo com a macromolécula e que essa reação pode estar acontecendo com resíduos de aminoácidos de Cis presentes na enzima. Tavares *et al.*,¹⁵² avaliando um composto da classe dos isotiocianatos, provou que a molécula reage com resíduos de Cis. Por outro lado, Krajewska; Zaborska,¹⁵³ avaliando o efeito de alguns inibidores padrão em resíduos do sítio ativo da urease, perceberam que o ácido acetoidroxâmico (AAH) não se liga a esses resíduos, sendo assim, a inibição da urease pelos derivados aqui avaliados pode estar associada ao grupo acceptor de Michael formado e não necessariamente ao grupamento cinamamida (**Figura 43**). Assim, a reação dos derivados **4e** e **4i** com o grupo tiol do resíduo Cis592 pode levar à formação de um produto que restringe a mobilidade do *flap* móvel do sítio ativo, resultando em uma diminuição da atividade enzimática.¹⁵²

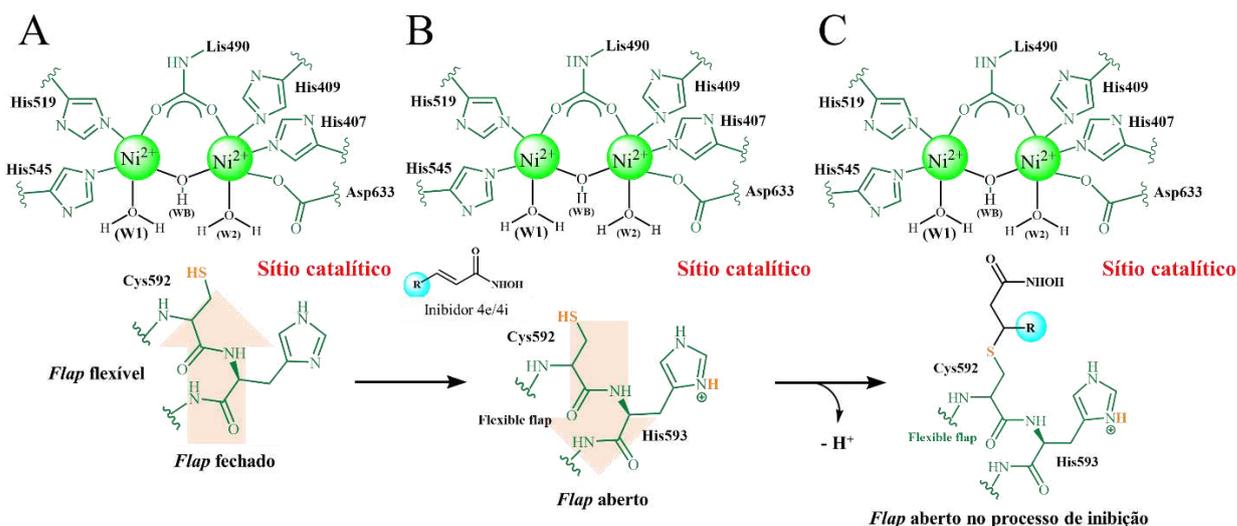


Figura 43. Proposta mecanicista para a reação que provoca a inibição da urease pelos derivados do AA - 4e/4i. A) A urease livre com flap fechado e sítio catalítico livre para hidrolisar ureia; B) presença dos derivados 4e ou 4i, na região do flap aberto para iniciar a reação com o resíduo de Cys; C) Produto formado entre os derivados 4e ou 4i e Cys592 e responsável pela redução da mobilidade do flap e bloqueio do sítio ativo

5.4.4. Avaliação da interação dos ligantes 4e e 4i com sítio ativo da urease

Normalmente, os inibidores clássicos da urease apresentam modos de inibição bem definidos, como ácido acetoidroxâmico (AAH), hidroxiiureia (HU), tioureia (TIO) e o (*N*-(*n*-butil) tiofosfórico triamida (NBPT), que são descritos como inibidores competitivos,^{119,122,154} sendo essas informações úteis para entender o mecanismo de ação de um possível inibidor. Assim, para entender um pouco mais o mecanismo de ação dos compostos **4e** e **4i**, foram realizados estudos de complexação dos ligantes com a urease utilizando-se UV-vis para entender o comportamento desses compostos frente ao cofator do sítio ativo da enzima (Ni(II)), bem como ensaios de competição com inibidores competitivos clássicos, por titulações espectrofluorimétricas (Tabela 9, página 100).

A capacidade dos compostos **4e** e **4i** em complexar com íons Ni(II) foi avaliada usando três sistemas (composto livre (10 μM), Ni(II) livre (10 μM) e composto + Ni(II)). De maneira geral, a subtração da absorbância dos compostos livres, da absorbância dos complexos, ou seja **4e**-Ni(II) ou **4i**-Ni(II), não se demonstrou sobreponível à absorbância do cofator Ni(II), ou seja, $(A_{4e} + A_{Ni(II)}) - A_{4e} \neq A_{Ni(II)}$, bem como, $(A_{4i} + A_{Ni(II)}) - A_{4i} \neq A_{Ni(II)}$, indicando que houve a formação de complexo entre os ligantes avaliados e o Ni(II), fato que pode estar associado à presença dos átomos de N e O presentes nos compostos (Figura 44).^{119,155}

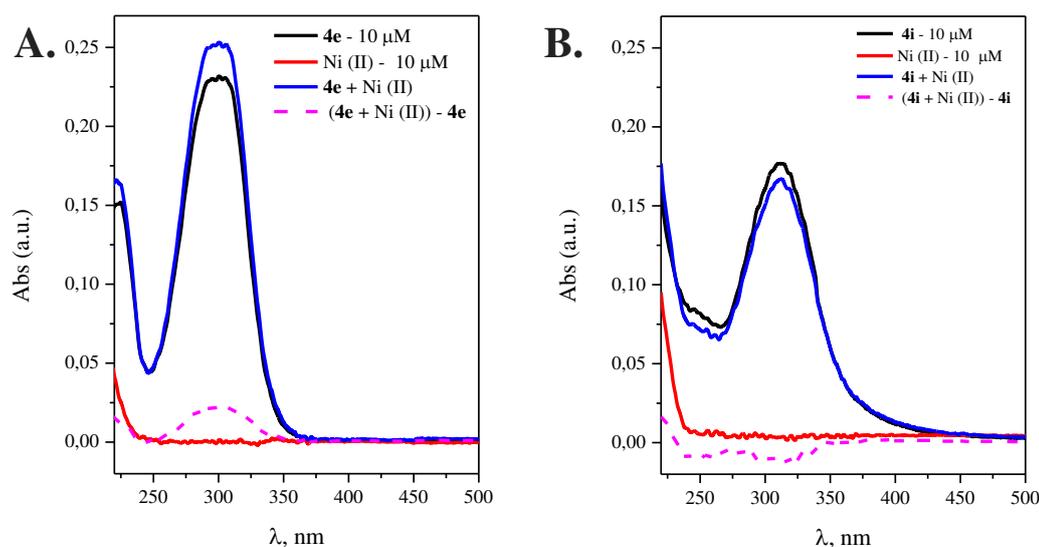


Figura 44. Espectro de absorção no UV-vis para os três sistemas avaliados. A. **4e** - 10 μM , Ni (II) - 10 μM e o complexo (**4e** + Ni (II)); B. **4i** - 10 μM , Ni (II) - 10 μM e o complexo (**4i** + Ni (II)). Condições: tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, 30 °C

Os estudos fluorimétricos, por sua vez, foram realizados na ausência e na presença dos inibidores clássicos AAH, HU, TIO e NBPT. Em seguida, para cada sistema, a constante de ligação (K_b) foi calculada e a razão das constantes de ligações (K_b'/K_b) foi usada como critério de avaliação do ligante, onde K_b e K_b' são, respectivamente, a constante de ligação na ausência e presença do inibidor clássico (competidor) (Tabela 9). Para os dois compostos (**4e** e **4i**), em todos os sistemas avaliados a razão $K_b'/K_b < 1$, indicando que ambos os compostos interagem com o sítio ativo da enzima. Para o ligante **4i**, os sistemas contendo os inibidores clássicos AAH e HU apresentaram as maiores razões K_b'/K_b em relação a **4e**, indicando que inibidores padrão bloqueiam o acesso ao sítio ativo com maior eficiência para compostos com grupos eletroretiradores, que para eletrodoadores. O sistema utilizando TIO por sua vez, apresentou comportamento contrário, em que a razão K_b'/K_b demonstrou-se maior para o composto com substituinte eletrodoador (**4e**). Além disso, como a razão $K_b'/K_b < 1$ para todos os sistemas avaliados, é um indício de que a formação do complexo foi desfavorecida.^{119,152}

Tabela 9. Razão da constante de ligação dos compostos **4e** e **4i** com a urease na ausência (K_b) e na presença de inibidores competitivos clássicos (K_b')

Competidor	4e	4i	4e	4i
	K_b'/K_b		Classificação	

AAH	0,133(±0,009)	0,981(±0,004)	Competitivo	Competitivo
HU	0,329(±0,002)	0,875(±0,002)	Competitivo	Competitivo
TIO	0,242(±0,009)	0,055(±0,002)	Competitivo	Competitivo
NBPT	0,199(±0,005)	0,198(±0,002)	Competitivo	Competitivo

5.4.5. Transferência de energia ressonante (FRET)

Os estudos via FRET foram realizados com os dois derivados ácidos hidroxâmicos (**4e** e **4i**) com o propósito de avaliar como a presença do substituinte (eletrodoador/eletroretirador) influencia na distância entre o derivado receptor e os resíduos de aminoácidos fluorogênicos (doadores) da urease no processo de transferência de energia. Normalmente, a eficiência do processo de FRET está associada a três fatores: *i*) sobreposição entre o espectro de emissão de fluorescência da espécie doadora (urease) e o espectro de absorção do receptor (**4e** ou **4i**); *ii*) orientação relativa dos dipolos do doador e receptor; *iii*) distância (r_0) entre a espécie doadora e a substância que irá receber energia (2-8 nm).^{119,145} A distância (r_0) entre a urease e os compostos **4e** e **4i**, assim como as energias E transferidas do doador para o receptor foram calculadas a partir da Equação 6:

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

Nesta equação R_0 é a distância crítica de Förster, quando 50% da energia de emissão do doador é transferida para o receptor.^{119,122} A equação da distância crítica (R_0) pode ser descrita como:

$$R_0^6 = \frac{8,8 \times 10^{-25} \times K^2 \times \phi \times J}{N^4} \quad (7)$$

Nesta equação K^2 é fator de orientação que está diretamente relacionado com a geometria do dipolo entre a urease e os derivados **4e** e **4i**, sendo igual a 2/3, para orientação aleatória em solução, N é o índice de refração médio do meio no comprimento de onda onde a sobreposição dos espectros é significativa, Φ é o rendimento quântico do doador, J , é a área de

sobreposição do espectro de emissão de fluorescência normalizado da enzima e em relação ao espectro de absorção dos ligantes (Figura 45).

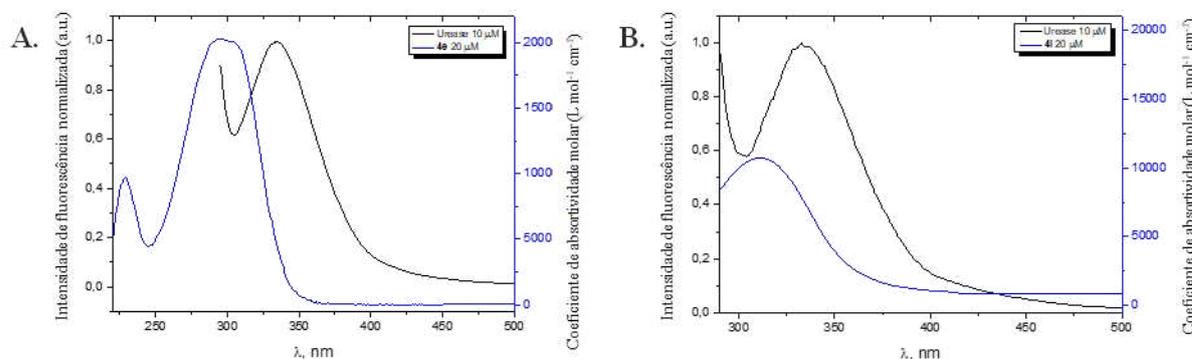


Figura 45. Ensaios FRET para urease com os derivados ácidos cinamoilhidroxâmicos **4e** (A) e **4i** (B).

Para ambos os derivados ácidos hidroxâmicos avaliados, bem como para os diferentes sistemas, a distância crítica de Foster (R_0), e a distância entre os resíduos fluorogênicos da urease e **4e** ou **4i** ficaram entre 1 – 3 nm (Tabela 10), o que indica uma alta eficiência na transferência de energia entre as espécies.¹⁴⁵ Para todas as concentrações de **4i** e para a concentração de 40 μM de **4e** a energia transferida (E) foi superior a 50 %, implicando em $R_0 > r_0$ para esses sistemas. De um modo geral, esses estudos demonstraram que a presença do substituinte eletroretirador em **4i** tende a diminuir a distância com os resíduos de aminoácidos fluorogênicos da urease em relação a **4e**, o que conseqüentemente aumentou a transferência de energia nos sistemas contendo o composto com tal substituinte, o que pode influenciar também na maior eficiência desse composto em inibir a urease.

Tabela 10. Parâmetros FRET para a urease na concentração de 10 μM utilizando os ligantes **4e** e **4i** na proporção 1:1, 1:2 e 1:4, enzima:composto

Ligante	Concentração (μM)	J ($10^{-15} \text{ cm}^3 \text{ L mol}^{-1}$)	R_0 (nm)	E (%)	r_0 (nm)
4e	10	6,529	2,19	43	2,30
	20	6,778	2,21	48	2,24
	40	5,034	2,10	66	1,88

	10	8,308	2,29	55	2,21
4i	20	7,278	2,24	62	2,06
	40	7,069	2,22	76	1,84

6. CONCLUSÃO

A execução do projeto proposto permitiu a obtenção de uma série de ácidos cinamoilhidroxâmicos com potente atividade inibidora de urease (CI_{50} entre 3,8 e 12,8 μM). Os ácidos hidroxâmicos sintetizados são estruturalmente simples e obtidos em poucas etapas de síntese, tornando-os atrativos para futuras aplicações agrícolas ou medicinais.

Os testes *in-vitro* de inibição de urease revelaram que a presença da ligação dupla conjugada promove uma maior atividade anti-ureolítica, sendo esse aumento proporcional ao aumento da eletrofilia do carbono β . Desse modo, compostos contendo grupos fortemente eletroretiradores apresentam os melhores resultados, enquanto compostos com grupos doadores de densidade eletrônica são menos ativos. Portanto, a estratégia de hibridação molecular mostrou-se eficaz na obtenção de inibidores mais potentes.

Os estudos biofísicos de interação entre inibidor-urease realizados sugerem que o ácido hidroxâmico poderia interagir com o sítio ativo da enzima, enquanto a ligação dupla conjugada (acceptor de Michael) poderia interagir com um resíduo de cisteína próximo ao centro catalítico. Os resultados também mostraram que o derivado contendo um grupo doador de densidade eletrônica como substituinte (**4e**) apresenta menor interação com o resíduo de cisteína que o composto **4i**, contendo o grupo retirador de densidade eletrônica. Esses resultados estão em concordância com a hipótese de que o quanto menor a eletrofilia do carbono β menor a interação observada com o resíduo de cisteína.

Os dados obtidos nos experimentos de cinética que mostraram uma inibição puramente competitiva para os derivados **4e** e **4k**, enquanto os derivados **4a** e **4i** comportaram-se como inibidores mistos. Apesar de um inibidor misto clássico interagir com um sítio alósterico, observa-se que tanto **4e** quanto **4i** são capazes de se ligar ao sítio ativo através do grupo hidroxamato.

Os resultados obtidos durante a execução deste trabalho mostram que os ácidos cinamoilhidroxâmicos são potenciais candidatos a fármacos no tratamento de infecções causadas por micro-organismos ureolíticos, sendo as próximas etapas a avaliação da atividade anti-*Helicobacter pylori* e estudos de citotoxicidade desses compostos.

REFERÊNCIAS

1. Krajewska B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *J Mol Catal B Enzym.* 2009;59(1-3):9-21. doi:10.1016/j.molcatb.2009.01.003
2. Hausinger RP. Biochemistry of nickel. In: *Biochemistry of Elements*. 1st ed. Springer Science Business Media; 1993:23-57.
3. Kappaun K, Piovesan AR, Carlini CR, Ligabue-Braun R. Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – A review. *J Adv Res.* 2018;13:3-17. doi:10.1016/j.jare.2018.05.010
4. Bordeaux JJ. The Decomposition of Urea in Aqueous Media. *Journal of American Chemical Society.* 1955;866(1953).
5. Blakeley RL, Zerner B. Jack bean urease: the first nickel enzyme. *Journal of Molecular Catalysis.* 1984;23(2-3):263-292. doi:10.1016/0304-5102(84)80014-0
6. Callahan BP, Yuan Y, Wolfenden R. The Burden Borne by Urease Scheme 1. Alternate Mechanisms of Urea Decomposition in Water. *J Am Chem Soc.* 2005;127(Table 1):10828-10829.
7. Maroney MJ, Ciurli S. Nonredox nickel enzymes. *Chem Rev.* 2014;114(8):4206-4228. doi:10.1021/cr4004488
8. Carlini CR, Ligabue-Braun R. Ureases as multifunctional toxic proteins: A review. *Toxicon.* 2016;110:90-109. doi:10.1016/j.toxicon.2015.11.020
9. Follmer C, Barcellos GBS, Zingali RB, et al. Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5) : biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochem J.* 2001;224:217-224.
10. Marshall BJ, Warren JR. The Nobel Prize in Physiology or Medicine The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2005 was awarded. Published online 2021:1-7.
11. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified Curved Bacilli in the Stomach of Patients With Gastritis and Peptic Ulceration. *The Lancet.* 1984;323(8390):1311-1315. doi:10.1016/S0140-6736(84)91816-6
12. Sumner JB. Enzyme Urease. *J Biol Chem.* 1926;69:435-441. <http://www.jbc.org/content/69/2/435.full.pdf+html>
13. Dixon NE, Gazzola C, Blakeley RL, Zerner B. Jack Bean Urease (EC 3.5.1.5). A Metalloenzyme. A Simple Biological Role for Nickel? *J Am Chem Soc.* 1975;97(14):4131-4133. doi:10.1021/ja00847a045

14. Dixon NE, Gazzola C, Watters JJ, Blakeley RL, Zerner B. Inhibition of Jack Bean Urease (EC 3.5.1.5) by Acetohydroxamic Acid and by Phosphoramidate. An Equivalent Weight for Urease. *J Am Chem Soc.* 1975;97(14):4130-4131. doi:10.1021/ja00847a044
15. Fearon WR. Urease. Part I. The Chemical Changes Involved in the Zymolysis of Urea. *Biochemical Journal.* 1923;17(1):84-93. doi:10.1042/bj0170084
16. The Nobel Prize.org. Nobel Media AB 2021. The Nobel Prize in Chemistry 1946. Accessed May 3, 2021. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1946/summary/>
17. Jabri E, Carr MB, Hausinger RP, Karplus PA. The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. *Science* (1979). 1995;268(5213):998-1004. doi:10.1126/science.7754395
18. Benini S, Rypniewski WR, Wilson KS, Ciurli S, Mangani S. The complex of *Bacillus pasteurii* urease with β -mercaptoethanol from X-ray data at 1.65-Å resolution. *Journal of Biological Inorganic Chemistry.* 1998;3(3):268-273. doi:10.1007/s007750050231
19. 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. *J Mol Biol.* 2010;400(3):274-283. doi:10.1016/j.jmb.2010.05.009
20. Mazzei L, Musiani F, Ciurli S. The structure-based reaction mechanism of urease, a nickel dependent enzyme: tale of a long debate. *Journal of Biological Inorganic Chemistry.* 2020;25(6):829-845. doi:10.1007/s00775-020-01808-w
21. Dixon E, Blakeley L. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). 111. The involvement of active-site nickel ion in inhibition by P-mercaptoethanol, phosphoramidate, and fluoride. *Can J Biochem.* 1980;58:1-8.
22. Hasnain SS, Piggott B. An EXAFS study of jack bean urease, a nickel metalloenzyme. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983;112(1):279-283.
23. Alagna L, Hasnain SS, Piggott B, Williams DJ. The nickel ion environment in jack bean urease. *Biochem J.* 1984;220(2):591-595. doi:10.1042/bj2200591
24. Clark PA, Wilcox DE. Magnetic properties of the nickel enzyme urease, nickel-substituted carboxypeptidase A, and nickel-substituted carbonic anhydrase. *Inorg Chem.* 1989;28:1326-1333.
25. Clark PA, Wilcox DE, Scott R. X-ray absorption spectroscopic evidence for binding of the competitive inhibitor 2-mercaptoethanol to the nickel sites of jack bean urease. A new Ni-Ni substituted carbonic anhydrase. *Inorg Chem.* 1990;29:579-581.
26. Day EP, Peterson J, Sendova MS, Todd MJ, Hausinger RP. Saturation Magnetization of Ureasases from *Klebsiella aerogenes* and Jack Bean: No Evidence for Exchange Coupling between the Two Active Site Nickel Ions in the Native Enzymes. *Inorg Chem.* 1993;32(5):634-638. doi:10.1021/ic00057a024

27. Wang S, Lee MH, Hausinger RP, Clark PA, Wilcox DE, Scott RA. Structure of the Dinuclear Active Site of Urease. X-ray Absorption Spectroscopic Study of Native and 2-Mercaptoethanol-Inhibited Bacterial and Plant Enzymes. *Inorg Chem.* 1994;33(8):1589-1593.
28. Benini S, Ciurli S, Nolting HF, Mangani S. X-ray absorption spectroscopy study of native and phenylphosphorodiamidate-inhibited *Bacillus pasteurii* urease. *Eur J Biochem.* 1996;239(1):61-66. doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0061u.x
29. Pearson MA, Michel LO, Hausinger RP, Karplus PA. Structures of Cys319 variants and acetohydroxamate-inhibited *Klebsiella aerogenes* urease. *Biochemistry.* 1997;36(26):8164-8172. doi:10.1021/bi970514j
30. Zambelli B, Mazzei L, Ciurli S. Intrisec disorder in the nickel-dependent urease network. In: Uversky VN, ed. *Dancing Protein Clouds: Intrinsically Disordered Proteins in Health and Disease, Part B.* Volume 174. Elsevier; 2020:307-330.
31. Mazzei L, Cianci M, Benini S, Ciurli S. The impact of pH on catalytically critical protein conformational changes: the case of the urease, a nickel enzyme. *Chemistry - A European Journal.* Published online 2019:4-34. doi:10.1002/chem.201902320
32. 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. *J Mol Biol.* 2010;400(3):274-283. doi:10.1016/j.jmb.2010.05.009
33. Dixon NE, Riddles PW, Gazzola C, Blakeley RL, Zerner B. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). V. On the mechanism of action of urease on urea, formamide, acetamide, N-methylurea, and related compounds. *Can J Biochem.* 1980;58(12):1335-1344. doi:10.1139/o80-181
34. Karplus PA, Pearson MA, Hausinger RP. 70 Years of Crystalline Urease: What Have We Learned? *Acc Chem Res.* 1997;30(8):330-337. doi:10.1021/ar960022j
35. Benini S, Rypniewski WR, Wilson KS, Miletti S, Ciurli S, Mangani S. The complex of *Bacillus pasteurii* urease with acetohydroxamate anion from X-ray data at 1.55 Å resolution. *Journal of Biological Inorganic Chemistry.* 2000;5(1):110-118. doi:10.1007/s007750050014
36. Benini S, Rypniewski WR, Wilson KS, 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.* 1999;7(2):205-216. doi:10.1016/S0969-2126(99)80026-4
37. Ciurli S, Benini S, Rypniewski WR, Wilson KS, Miletti S, Mangani S. Structural properties of the nickel ions in urease: Novel insights into the catalytic and inhibition mechanisms. *Coord Chem Rev.* 1999;190-192:331-355. doi:10.1016/S0010-8545(99)00093-4
38. Benini S, Rypniewski W, Wilson K, Ciurli S, Mangani S. Structure-based rationalization of urease inhibition by phosphate: Novel insights into the enzyme

mechanism. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2001;6(8):778-790. doi:10.1007/s007750100254

39. Benini S, Rypniewski WR, Wilson KS, Mangani S, Ciurli S. Molecular Details of Urease Inhibition by Boric Acid: Insights into the Catalytic Mechanism. *J Am Chem Soc*. 2004;126(12):3714-3715. doi:10.1021/ja049618p

40. Musiani F, Arnofi E, Casadio R, Ciurli S. Structure-based computational study of the catalytic and inhibition mechanisms of urease. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2001;6(3):300-314. doi:10.1007/s007750000204

41. Burne RA, Chen Y ywan M. Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes Infect*. 2000;2:533-542.

42. Mora D, Arioli S. Microbial Urease in Health and Disease. *PLoS Pathog*. 2014;10(12):10-13. doi:10.1371/journal.ppat.1004472

43. Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012;486(7402):222-227. doi:10.1038/nature11053

44. Liu YL, Nascimento M, Burne RA. Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries. *Int J Oral Sci*. 2012;4(3):135-140. doi:10.1038/ijos.2012.54

45. Burne RA, Zeng L, Ahn SJ, et al. Progress dissecting the oral microbiome in caries and health. *Adv Dent Res*. 2012;24(2):77-80. doi:10.1177/0022034512449462

46. Montecucco C, Rappuoli R. Living dangerously: How helicobacter pylori survives in the human stomach. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(6):457-466. doi:10.1038/35073084

47. Mendis AHW, Marshall BJ. Helicobacter Pylori and Bismuth. *Biological Chemistry of Arsenic, Antimony and Bismuth*. Published online 2010:241-262. doi:10.1002/9780470975503.ch10

48. Ahmed N. 23 years of the discovery of Helicobacter pylori: Is the debate over? *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2005;4:3-5. doi:10.1186/1476-0711-4-17

49. Marshall BJ, Armstrong JA, Mcgechie DB, Glancy RJ. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric campylobacter. 1985;142(0):436-439. doi:10.5694/j.1326-5377.1985.tb113443.x

50. Konieczna I, Zarnowiec P, Kwinkowski M, et al. Bacterial Urease and its Role in Long-Lasting Human Diseases. *Curr Protein Pept Sci*. 2013;13(8):789-806. doi:10.2174/138920312804871094

51. Rutherford JC. The Emerging Role of Urease as a General Microbial Virulence Factor. *PLoS Pathog*. 2014;10(5):1-3. doi:10.1371/journal.ppat.1004062

52. Witte C peter. Plant Science Urea metabolism in plants. *Plant Science*. 2011;180(3):431-438. doi:10.1016/j.plantsci.2010.11.010
53. Leghari SJ, Laghari GM, Laghari AH, Ahmed T. Role of Nitrogen for plant growth and development: a review. *Advances on Enviromental Biology*. 2016;10(September):209-218.
54. Polacco JC, Mazzafera P, Tezotto T. Opinion - Nickel and urease in plants: Still many knowledge gaps. *Plant Science*. 2013;199-200:79-90. doi:10.1016/j.plantsci.2012.10.010
55. International Fertilizer Association. *Fertilizer Outlook 2020-2024*. Vol 1.; 2020. doi:10.1021/jf60017a002
56. Cantarella H, Otto R, Soares JR, Silva AG de B. Agronomic efficiency of NBPT as a urease inhibitor: A review. *J Adv Res*. 2018;13:19-27. doi:10.1016/j.jare.2018.05.008
57. Sutton MA, Erisman JW, Dentener F, Möller D. Ammonia in the environment: From ancient times to the present. *Environmental Pollution*. 2008;156(3):583-604. doi:10.1016/j.envpol.2008.03.013
58. Kafarski P, Talma M. Recent advances in design of new urease inhibitors: A review. *J Adv Res*. 2018;13:101-112. doi:10.1016/j.jare.2018.01.007
59. Benini S, Kosikowska P, Berlicki Ł, Ciurli S. The crystal structure of *Sporosarcina pasteurii* urease in a complex with citrate provides new hints for inhibitor design. Published online 2013:391-399. doi:10.1007/s00775-013-0983-7
60. Upadhyay LSB. Urease inhibitors: A review. *Indian J Biotechnol*. 2012;11(4):381-388.
61. Habala L, Devínsky F, Egger AE. REVIEW: metal complexes as urease inhibitors. *J Coord Chem*. 2018;71(7):907-940. doi:10.1080/00958972.2018.1458228
62. Marmion CJ, Griffith D, Nolan KB. Hydroxamic acids - An intriguing family of enzyme inhibitors and biomedical ligands. *Eur J Inorg Chem*. 2004;(15):3003-3016. doi:10.1002/ejic.200400221
63. Gupta SP, Sharma A. The Chemistry of Hydroxamic acids. In: Gupta SP, ed. *Hydroxamic Acids: A Unique Family of Chemicals with Multiple Biological Activities*. Vol 1. 1st ed. Springer Berlin Heidelberg; 2013:1-13. doi:10.1007/978-3-642-38111-9
64. Muri E, Nieto M, Williamson J, Sindelar RD. Hydroxamic Acids as Pharmacological Agents. *Curr Med Chem*. 2002;9(17):1631-1653. doi:10.2174/1567203043401572
65. Kobashi K, Hase J, Uehara K. Specific inhibition of urease by hydroxamic acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1962;62:380-383.

66. Kosikowska P, Berlicki Ł. Urease inhibitors as potential drugs for gastric and urinary tract infections: A patent review. *Expert Opin Ther Pat.* 2011;21(6):945-957. doi:10.1517/13543776.2011.574615
67. Muri EMF, Barros TG. Hydroxamic acids as inhibitors of urease in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. In: Gupta SP, ed. *Hydroxamic Acids: A Unique Family of Chemicals with Multiple Biological Activities*. Vol 1. 1st ed. Springer Berlin Heidelberg; 2013:241-250. doi:10.1007/978-3-642-38111-9
68. Tanaka T, Kawase M, Tani S. Urease inhibitory activity of simple α,β -unsaturated ketones. *Life Sci.* 2003;73(23):2985-2990. doi:10.1016/S0024-3205(03)00708-2
69. Amtul Z, Atta-ur-Rahman BSP, Siddiqui R, Choudhary M. Chemistry and Mechanism of Urease Inhibition. *Curr Med Chem.* 2012;9(14):1323-1348. doi:10.2174/0929867023369853
70. Kobashi K, Kumaki K, Hase J. Effect of acyl residues of hydroxamic acids on urease inhibition. *BBA - Enzymology.* 1971;227(2):429-441. doi:10.1016/0005-2744(71)90074-X
71. Kobashi K, Takebe S, Terashima N, Hase J. Inhibition of urease activity by hydroxamic acid derivatives of amino acids. *J Biochem.* 1975;77(4):837-843. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a130791
72. Odake S, Nakahashi K, Morikawa T, Takebe S, Kobashi K. Inhibition of urease by dipeptidyl hydroxamic acids. *Chem Pharm Bull.* 1992;40(10):2764-2768.
73. Odake S, Morikawa T, Tsuchiya M, Imamura L, Kobashi K. Inhibition of *Helicobacter pylori* urease activity by hydroxamic acids derivatives. *Biol Pharm Bull.* 1994;17(10):1329-1332file:///C:/Luciana/Trabalhos, matérias/DO.
74. Munakata K, Tanaka S, Toyoshima S. Therapy for urolithiasis with hydroxamic acids. Synthesis of new N-(aroyl)glycinohydroxamic acid derivatives and related compounds. *Chem Pharm Bull.* 1980;28(7):2045-2051.
75. Muri EMF, Mishra H, Stein SM, Williamson JS. Molecular Modeling , Synthesis And Biological Evaluation of Heterocyclic Hydroxamic Acids Designed as *Helicobacter Pylori* Urease Inhibitors. *Lett Drug Des Discov.* Published online 2004:30-34.
76. Liu Q, Shi W kang, Ren S zhen, Ni W wei, Li W yi, Chen H min. Arylamino containing hydroxamic acids as potent urease inhibitors for the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Med Chem.* 2018;156:126-136. doi:10.1016/j.ejmech.2018.06.065
77. Ni WW, Liu Q, Ren SZ, et al. The synthesis and evaluation of phenoxyacylhydroxamic acids as potential agents for *Helicobacter pylori* infections. *Bioorg Med Chem.* 2018;26(14):4145-4152. doi:10.1016/j.bmc.2018.07.003

78. Mamidala R, Bhimathati SRS, Vema A. Discovery of Novel Dihydropyrimidine and hydroxamic acid hybrids as potent *Helicobacter pylori* Urease inhibitors. *Bioorg Chem.* 2021;114. doi:10.1016/j.bioorg.2021.105010
79. Song WQ, Liu ML, Yuan LC, et al. Synthesis, evaluation and mechanism exploration of 2-(N-(3-nitrophenyl)-N-phenylsulfonyl)aminoacetohydroxamic acids as novel urease inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2022;78. doi:10.1016/j.bmcl.2022.129043
80. Mattos MC, Marzorati L. Aspectos mecanísticos da adição de Michael. *Quim Nova.* 1999;22(5):710-714. doi:10.1590/S0100-40421999000500014
81. Michael A. Ueber die addition von natriumacetessig-und natriummalonsaurethern zu den aethern ungesattigter sauren. *Journal für Praktische Chemie* . 1887;2(35):349-356. doi:10.1002/prac.18870350136
82. Singh J, Petter RC, Baillie TA, Whitty A. The resurgence of covalent drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(4):307-317. doi:10.1038/nrd3410
83. Johansson MH. Reversible Michael Additions: Covalent Inhibitors and Prodrugs. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry.* 2012;12:1330-1344. doi:10.2174/138955712804586693
84. Baillie TA. Drug–protein adducts: past, present, and future. *Medicinal Chemistry Research.* 2020;29(7):1093-1104. doi:10.1007/s00044-020-02567-8
85. Jackson PA, Widen JC, Harki DA, Brummond KM. Covalent Modifiers: A Chemical Perspective on the Reactivity of α,β -Unsaturated Carbonyls with Thiols via Hetero-Michael Addition Reactions. *J Med Chem.* 2017;60(3):839-885. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00788
86. Macegoniuk K, Kowalczyk R, Rudzińska A, Psurski M, Wietrzyk J, Berlicki Ł. Potent covalent inhibitors of bacterial urease identified by activity-reactivity profiling. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017;27(6):1346-1350. doi:10.1016/j.bmcl.2017.02.022
87. Ntatsopoulos V, Macegoniuk K, Mucha A, Vassiliou S, Berlicki Ł. Structural exploration of cinnamate-based phosphonic acids as inhibitors of bacterial ureases. *Eur J Med Chem.* 2018;159:307-316. doi:10.1016/j.ejmech.2018.09.074
88. Howell SF, Sumner JB. the Specific Effects of Buffers Upon Urease Activity. *Journal of Biological Chemistry.* 1934;104(3):619-626. doi:10.1016/s0021-9258(18)75737-2
89. Lethbridge G, Burns RG. Inhibition of soil Urease By organophosphorus insecticides. *Soil Biol Biochem.* 1976;8:99-102.
90. Oliveira FM, Barbosa LCA, Ismail FMD. The diverse pharmacology and medicinal chemistry of phosphoramidates – a review. *RSC Adv.* 2014;4:18998-19012. doi:10.1039/c4ra01454e

91. Mazzei L, Cianci M, Contaldo U, Musiani F, Ciurli S. Urease inhibition in the presence of N- (n -butyl) thiophosphoric triamide , a suicide substrate : structure and kinetics. *Biochemistry*. 2017;56(40):5391-5404. doi:10.1021/acs.biochem.7b00750
92. de Fátima Â, Braga TC, Neto L da S, et al. A mini-review on Biginelli adducts with notable pharmacological properties. *J Adv Res*. 2015;6(3):363-373. doi:10.1016/j.jare.2014.10.006
93. Rashid U, Batool I, Wadood A, Khan A, Iqbal M, Latif F. Structure based virtual screening-driven identification of monastrol as a potent urease inhibitor. *J Mol Graph Model*. 2013;43:47-57. doi:10.1016/j.jmgm.2013.04.006
94. Khan A, Hashim J, Arshad N, et al. Dihydropyrimidine based hydrazine dihydrochloride derivatives as potent urease inhibitors. *Bioorg Chem*. 2016;64:85-96. doi:10.1016/j.bioorg.2015.12.007
95. Tariq S, Kamboj P, Amir M. Therapeutic advancement of benzothiazole derivatives in the last decennial period. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2019;352(1):1-17. doi:10.1002/ardp.201800170
96. Araújo DP, Morais VSS, de Fátima Â, Modolo L V. Efficient sodium bisulfite-catalyzed synthesis of benzothiazoles and their potential as ureases inhibitors. *RSC Adv*. 2015;5:28814-28821. doi:10.1039/C5RA01081K
97. Taha M, Ismail NH, Imran S, et al. Hybrid benzothiazole analogs as antiurease agent: Synthesis and molecular docking studies. *Bioorg Chem*. 2016;66:80-87. doi:10.1016/j.bioorg.2016.03.010
98. Barreiro E, Mansour Fraga CA. *Química Medicinal As Bases Moleculares Da Ação Dos Fármacos*. Vol 1. 2nd ed. (Artmed, ed.). Artmed ; 2008.
99. Claudio Viegas-Junior, Eliezer J. Barreiro, Carlos Alberto Manssour Fraga. Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. *Curr Med Chem*. 2007;14(17):1829-1852. doi:10.2174/092986707781058805
100. Pellón RF, Mamposo T, González E, Calderón O. Synthesis of cinnamic acid derivatives using ethanol as solvent or microwave assisted method. *Synth Commun*. 2000;30(20):3769-3774. doi:10.1080/00397910008087005
101. Song CX, Chen P, Tang Y. Carboxylation of styrenes with CBr₄ and DMSO via cooperative photoredox and cobalt catalysis. *RSC Adv*. 2017;7(19):11233-11243. doi:10.1039/c6ra28744a
102. Zhang P, Hu HR, Bian SH, Huang ZH, Chu Y, Ye DY. Design, synthesis and biological evaluation of benzothiazepinones (BTZs) as novel non-ATP competitive inhibitors of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β). *Eur J Med Chem*. 2013;61:95-103. doi:10.1016/j.ejmech.2012.09.021

103. Klein J, Bergmann ED, Klein BJ. The Reaction of Acetals with Malonic Acid and its Derivatives. A Contribution to the Knowledge of the Knoevenagel-Doebner Reaction. *J Am Chem Soc.* 1957;79:3452-3454. doi:10.1021/ja01570a037
104. Shil AK, Kumar S, Reddy CB, Dadhwal S, Thakur V, Das P. Supported Palladium Nanoparticle-Catalyzed Carboxylation of Aryl Halides, Alkenylsilanes, and Organoboronic Acids Employing Oxalic Acid as the C1 Source. *Org Lett.* 2015;17(21):5352-5355. doi:10.1021/acs.orglett.5b02701
105. Palani E, Govindhasamy C, Subramani M, Kolli MK. Pore size engineering of hexagonal mesoporous carbon nitride (HMCN) for high catalytic performance in the synthesis of α β -unsaturated acid and its derivatives. *Appl Surf Sci.* 2019;463:481-491. doi:10.1016/j.apsusc.2018.07.191
106. Britsun VN, Esipenko AN, Chernega AN, Lozinskii MO. Synthesis and Transformations of 5-Substituted 2-Aryl-7H-[1,2,4]triazolo[3,2-b][1,3]thiazin-7-ones and 2-Aryl-2,3-dihydro-4H-[1,3]thiazino[3,2-a]benzimidazol-4-ones. *Russian Journal of Organic Chemistry* . 2005;41(1):108-113. doi:10.1007/s11178-005-0130-1
107. Eras Joli J, Vilaró Jordana F, Canela Garayo R. Chlorotrimethylsilane, a suitable reagent for the esterification of diverse functionalized carboxylic acids. *Tumbaga* . 2007;2:85-89.
108. Imashiro R, Seki M. A catalytic asymmetric synthesis of chiral glycidic acid derivatives through chiral dioxirane-mediated catalytic asymmetric epoxidation of cinnamic acid derivatives. *Journal of Organic Chemistry.* 2004;69(12):4216-4226. doi:10.1021/jo049893u
109. Oger N, Le Callonnec F, Jacquemin D, Fouquet E, Le Grogne E, Felpin FX. Heck-Matsuda arylation of olefins through a bicatalytic approach: Improved procedures and rationalization. *Adv Synth Catal.* 2014;356(5):1065-1071. doi:10.1002/adsc.201301144
110. Moghaddam FM, Pourkaveh R, Karimi A. Oxidative heck reaction as a tool for para-selective olefination of aniline: A DFT supported mechanism. *Journal of Organic Chemistry.* 2017;82(19):10635-10640. doi:10.1021/acs.joc.7b01570
111. Ortega V, Del Castillo E, Csáky AG. Transition-Metal-Free Stereocomplementary Cross-Coupling of Diols with Boronic Acids as Nucleophiles. *Org Lett.* 2017;19(22):6236-6239. doi:10.1021/acs.orglett.7b03192
112. Tomašić T, Zidar N, Šink R, et al. Structure-based design of a new series of d-glutamic acid based inhibitors of bacterial UDP-N-acetylmuramoyl-l-alanine: D-glutamate ligase (MurD). *J Med Chem.* 2011;54(13):4600-4610. doi:10.1021/jm2002525
113. Wagner FF, Olson DE, Gale JP, et al. Potent and selective inhibition of histone deacetylase 6 (HDAC6) does not require a surface-binding motif. *J Med Chem.* 2013;56(4):1772-1776. doi:10.1021/jm301355j

114. Couturier M, Tucker JL, Proulx C, et al. 5,5-Dimethyl-1,4,2-dioxazoles as versatile aprotic hydroxamic acid protecting groups. *Journal of Organic Chemistry*. 2002;67(14):4833-4838. doi:10.1021/jo0256890
115. Sainsbury PD, Mineyeva Y, Mycroft Z, Bugg TDH. Chemical intervention in bacterial lignin degradation pathways: Development of selective inhibitors for intradiol and extradiol catechol dioxygenases. *Bioorg Chem*. 2015;60:102-109. doi:10.1016/j.bioorg.2015.05.002
116. Usachova N, Leitis G, Jirgensons A, Kalvinsh I. Synthesis of hydroxamic acids by activation of carboxylic acids with N,N'-carbonyldiimidazole: Exploring the efficiency of the method. *Synth Commun*. 2010;40(6):927-935. doi:10.1080/00397910903026723
117. Vassiliou S, Węglarz-Tomczak E, Berlicki, et al. Structure-guided, single-point modifications in the phosphinic dipeptide structure yield highly potent and selective inhibitors of neutral aminopeptidases. *J Med Chem*. 2014;57(19):8140-8151. doi:10.1021/jm501071f
118. Weatherburn MW. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal Chem*. 1967;39(8):971-974. doi:10.1021/ac60252a045
119. Tavares MC, dos Santos Nascimento IJ, de Aquino TM, et al. The influence of N-alkyl chains in benzoyl-thiourea derivatives on urease inhibition: Soil studies and biophysical and theoretical investigations on the mechanism of interaction. *Biophys Chem*. 2023;299:107042. doi:10.1016/j.bpc.2023.107042
120. Lage T, Maciel T, Mota Y, et al. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* and interaction studies of lichen natural products with jack bean urease. *New J Chemical*. 2018;42:5356-5366. doi:10.1039/C8NJ00072G
121. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961;7(2):88-95. doi:10.1016/0006-2952(61)90145-9
122. Braga TC, Silva TF, Maciel TMS, et al. Ionic liquid assisted synthesis of dihydropyrimidin(thi)one biginelli adducts and investigation of their mechanism of urease inhibition. *New J Chemistry*. 2019;43:15187-15200. doi:10.1039/C9NJ03556G
123. Clayden J, Greeves N, Warren S. *Organic Chemistry*. Vol 1. 2nd ed. (Oxford University Press, ed.); 2012.
124. Brook MA, Chan TH. A simple procedure for the esterification of carboxylic acids. *Synthesis (Stuttg)*. 1983;2:201-203.
125. Staab HA. Syntheses Using Heterocyclic Amides (Azolides). *Agew Chem Internat Edt*. 1962;1(7):351-367.
126. Staab HA, Maleck G. Über den Mechanismus der Reaktion von N,N'-Carbon yl-di-azolen mit Carbonsauren zu Carbonsaure-azoliden. *Organische Chemie der Universität Heidelberg*. Published online 1966:2955-2961.

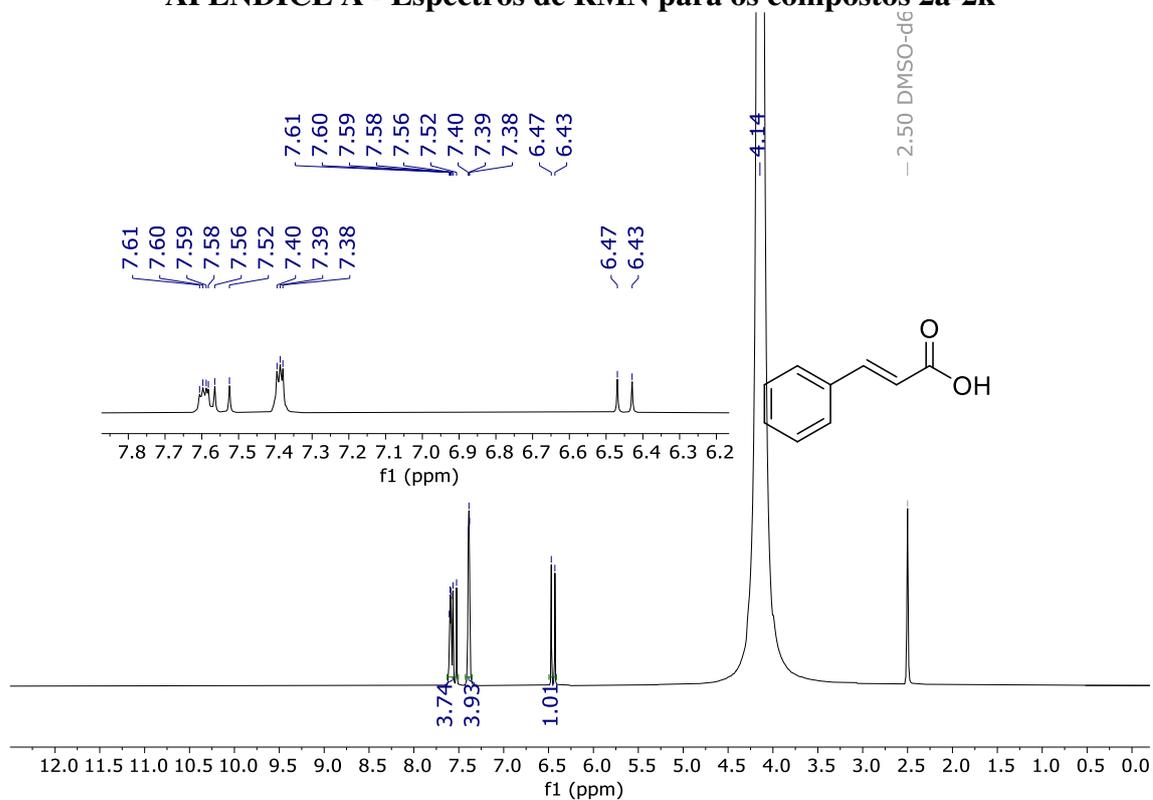
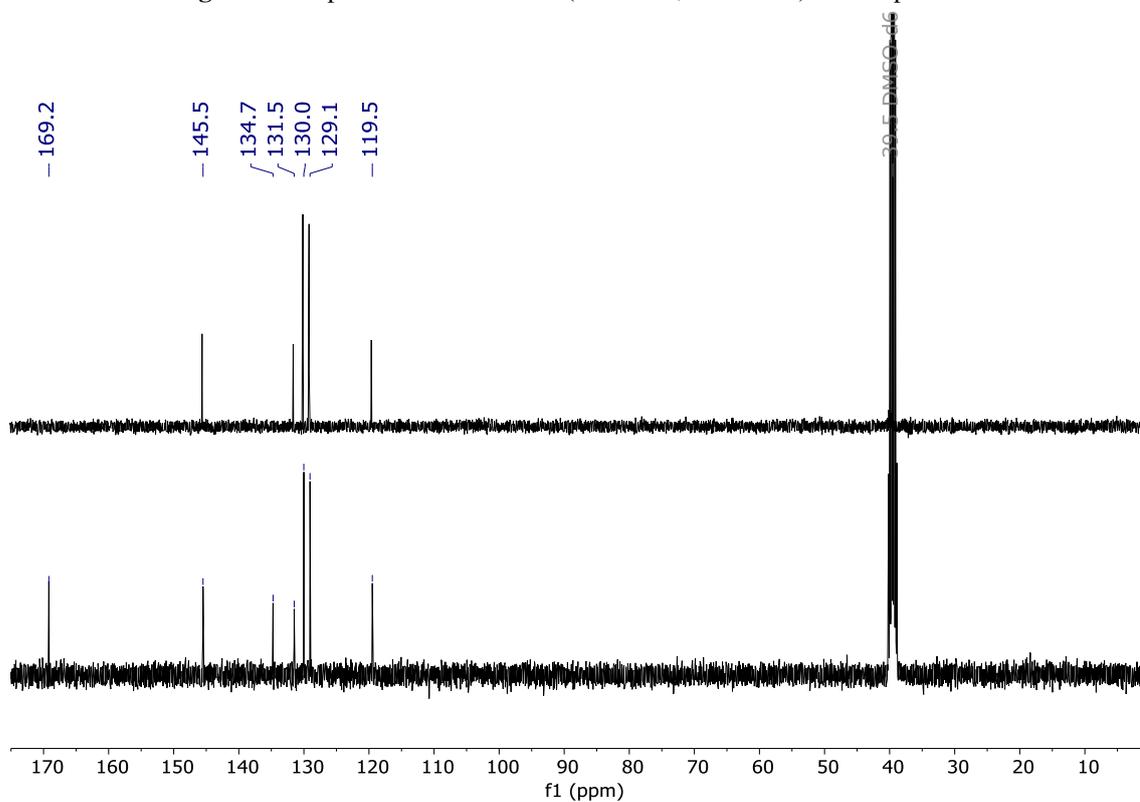
127. Siengalewicz P, Mulzer J, Rinner U. Synthesis of Esters and Lactones. In: *Comprehensive Organic Synthesis: Second Edition*. Vol 6. Elsevier Ltd.; 2014:356-405. doi:10.1016/B978-0-08-097742-3.00612-1
128. Birch AJ, Williamson DH. Homogeneous hydrogenation catalyst in organic synthesis. In: *Organic Reactions*. ; :1-185.
129. Rodrigues C. *Estudo Sobre o Mecanismo de Reações de Hidrogenação Em Complexos Do Tipo [RuCl₂(P)₂(N)₂]*. Tese. Universidade Federal de São Carlos; 2010.
130. Viesser R V., Ducati LC, Tormena CF, Autschbach J. The unexpected roles of σ and π orbitals in electron donor and acceptor group effects on the ¹³C NMR chemical shifts in substituted benzenes. *Chem Sci*. 2017;8(9):6570-6576. doi:10.1039/c7sc02163a
131. Boldt GE, Kennedy JP, Janda KD. Identification of a potent botulinum neurotoxin A protease inhibitor using in situ lead identification chemistry. *Org Lett*. 2006;8(8):1729-1732. doi:10.1021/ol0603211
132. Bayer T, Chakrabarti A, Lancelot J, et al. Synthesis, Crystallization Studies, and in vitro Characterization of Cinnamic Acid Derivatives as SmHDAC8 Inhibitors for the Treatment of Schistosomiasis. *ChemMedChem*. 2018;13(15):1517-1529. doi:10.1002/cmdc.201800238
133. Mavrikaki V, Pagonis A, Poncin I, et al. Design, synthesis and antibacterial activity against pathogenic mycobacteria of conjugated hydroxamic acids, hydrazides and O-alkyl/O-acyl protected hydroxamic derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*. 2022;64. doi:10.1016/j.bmcl.2022.128692
134. Brito TO, Souza AX, Mota YCC, et al. Design, syntheses and evaluation of benzoylthioureas as urease inhibitors of agricultural interest. *RSC Adv*. 2015;5(55):44507-44515. doi:10.1039/C5RA07886E
135. Copeland RA. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*. Wiley; 2013. doi:10.1002/9781118540398
136. Stemmler AJ, Kampf JW, Kirk ML, Pecoraro VL. A Model for the Inhibition of Urease by Hydroxamates. *J Am Chem Soc*. 1995;117(23):6368-6369. doi:10.1021/ja00128a031
137. Blakeley RL, Hinds JA, Kunze HE, Webb EC, Zerner B. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). Demonstration of a carbamoyl-transfer reaction and inhibition by hydroxamic acids. *Biochemistry*. 1969;8(5):1991-2000. doi:10.1021/bi00833a032
138. Ha NC, Oh ST, Sung JY, Cha KA, Lee MH, Oh BH. Supramolecular Assembly and Acid Resistance of Helicobacter Pylori Urease. *Nat Struct Biol*. 2001;8(6):505-509. doi:10.1038/88563
139. Arnold M, Brown DA, Deeg O, et al. Hydroxamate-Bridged Dinuclear Nickel Complexes as Models for Urease Inhibition. *Inorg Chem*. 1998;37(12):2920-2925. doi:10.1021/ic9711628

140. Mamidala R, Bhimathati SRS, Vema A. Discovery of Novel Dihydropyrimidine and hydroxamic acid hybrids as potent *Helicobacter pylori* Urease inhibitors. *Bioorg Chem.* 2021;114:105010. doi:10.1016/j.bioorg.2021.105010
141. Xiao ZP, Peng ZY, Dong JJ, et al. Synthesis, molecular docking and kinetic properties of β -hydroxy- β -phenylpropionyl-hydroxamic acids as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2013;68:212-221. doi:10.1016/j.ejmech.2013.07.047
142. Shi WK, Deng RC, Wang PF, et al. 3-Arylpropionylhydroxamic acid derivatives as *Helicobacter pylori* urease inhibitors: Synthesis, molecular docking and biological evaluation. *Bioorg Med Chem.* 2016;24(19):4519-4527. doi:10.1016/j.bmc.2016.07.052
143. Yan-Qing W, Hong-Mei Z. Spectral studies on the interaction between Cu^{2+} and urease. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2012;96:352-357. doi:10.1016/j.saa.2012.05.014
144. Omar S. Dissociation and unfolding of jack bean urease studied by fluorescence emission spectroscopy. *J Biotechnol.* 1995;39(3):221-228. doi:10.1016/0168-1656(95)00016-J
145. Wang YQ, Zhang GC, Zhang HM. Study on the Interaction of Pentachlorophenol with Urease in Aqueous Solution by Multiple Spectroscopic Techniques. *J Solution Chem.* 2011;40(3):458-469. doi:10.1007/s10953-011-9664-8
146. van de Weert M, Stella L. Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology. *J Mol Struct.* 2011;998(1-3):144-150. doi:10.1016/j.molstruc.2011.05.023
147. Bakar KA, Feroz SR. A critical view on the analysis of fluorescence quenching data for determining ligand–protein binding affinity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2019;223:117337. doi:10.1016/j.saa.2019.117337
148. de Barros WA, Nunes C da S, Souza JA da CR, et al. The new psychoactive substances 25H-NBOMe and 25H-NBOH induce abnormal development in the zebrafish embryo and interact in the DNA major groove. *Curr Res Toxicol.* 2021;2:386-398. doi:10.1016/j.crtox.2021.11.002
149. Li Y, Koopal LK, Chai Y, et al. Spectroscopic investigation of conformational changes in urease caused by interaction with humic acid. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2022;215:112510. doi:10.1016/j.colsurfb.2022.112510
150. Silva MM, Savariz FC, Silva EF, et al. Interaction of β -carbolines with DNA: Spectroscopic studies, correlation with biological activity and molecular docking. *J Braz Chem Soc.* 2016;27(9):1558-1568. doi:10.5935/0103-5053.20160035
151. Silva MM, Savariz FC, Silva-Júnior EF, et al. Interaction of β -Carbolines with DNA: Spectroscopic Studies, Correlation with Biological Activity and Molecular Docking. *J Braz Chem Soc.* Published online 2016. doi:10.5935/0103-5053.20160035

152. Tavares MC, Olímpio CRSDG, de Fátima Â, et al. Interaction and inhibition mechanism of urease in vitro and soil system by a natural benzylisothiocyanate isolated from *Moringa oleifera*. *Ind Crops Prod.* 2022;178:114580. doi:10.1016/j.indcrop.2022.114580
153. Krajewska B, Zaborska W. Jack bean urease: The effect of active-site binding inhibitors on the reactivity of enzyme thiol groups. *Bioorg Chem.* 2007;35(5):355-365. doi:10.1016/j.bioorg.2007.02.002
154. Manunza B, Deiana S, Pintore M, Gessa C. The binding mechanism of urea, hydroxamic acid and N-(N-butyl)-phosphoric triamide to the urease active site. A comparative molecular dynamics study. *Soil Biol Biochem.* 1999;31(5):789-796. doi:10.1016/S0038-0717(98)00155-2
155. Selvakumaran N, Pratheepkumar A, Ng SW, Tiekink ERT, Karvembu R. Synthesis, structural characterization and cytotoxicity of nickel(II) complexes containing 3,3-dialkyl/aryl-1-benzoylthiourea ligands. *Inorganica Chim Acta.* 2013;404:82-87. doi:10.1016/j.ica.2013.04.024

APÊNDICE

APÊNDICE A - Espectros de RMN para os compostos 2a-2k

Figura S1. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto 2aFigura S2. Espectros de RMN de ¹³C e DEPT-135 (100 MHz, DMSO-*d*₆) para o composto 2a

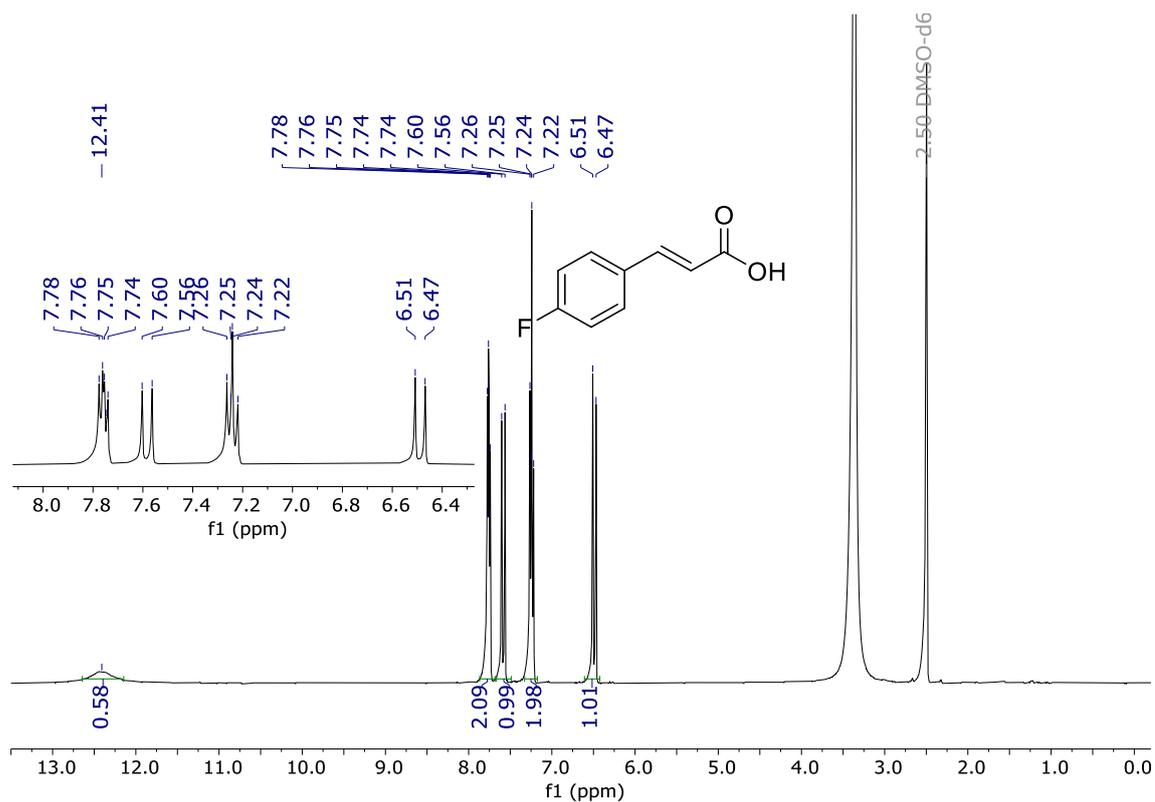


Figura S3. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **2b**

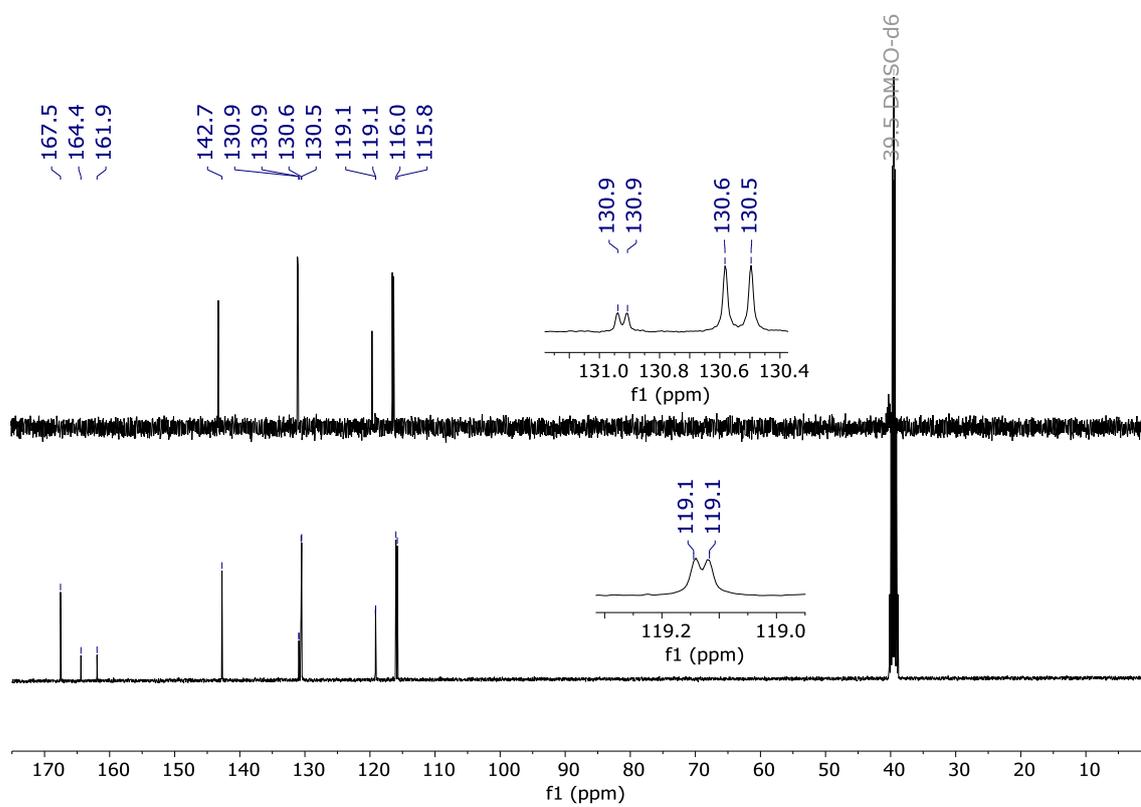


Figura S4. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o composto **2b**

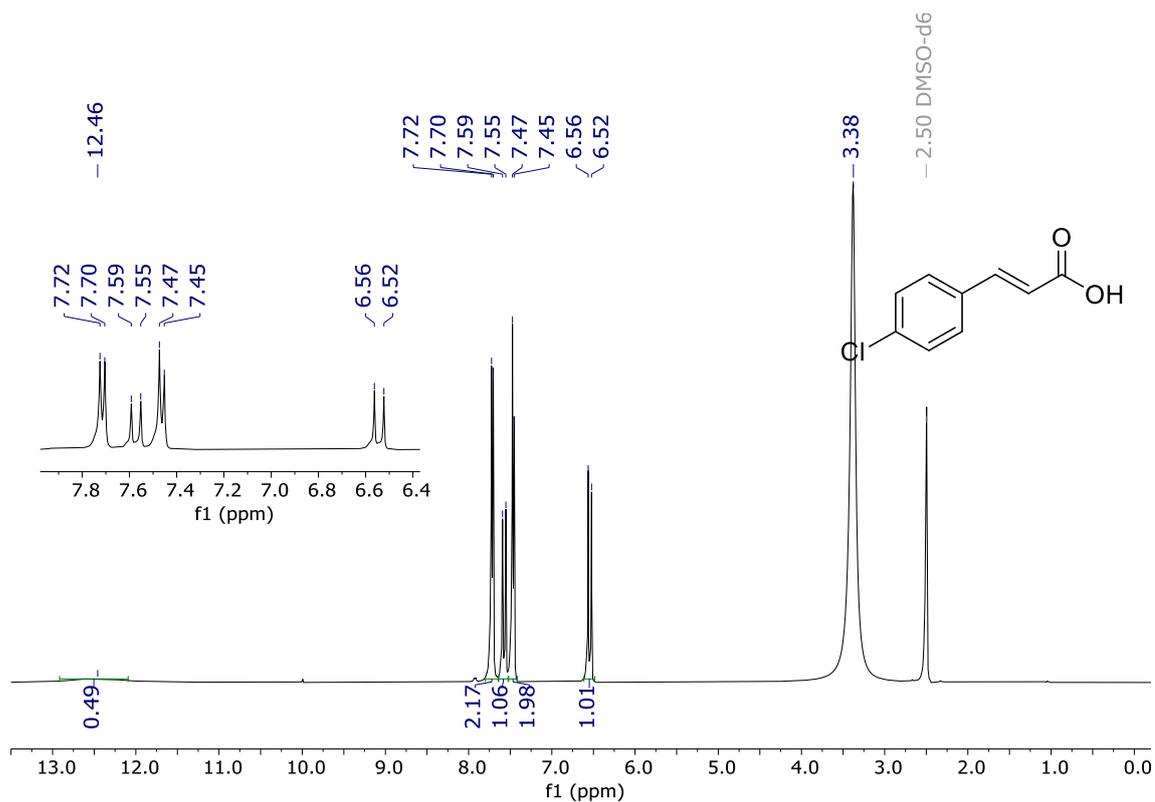


Figura S5. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **2c**

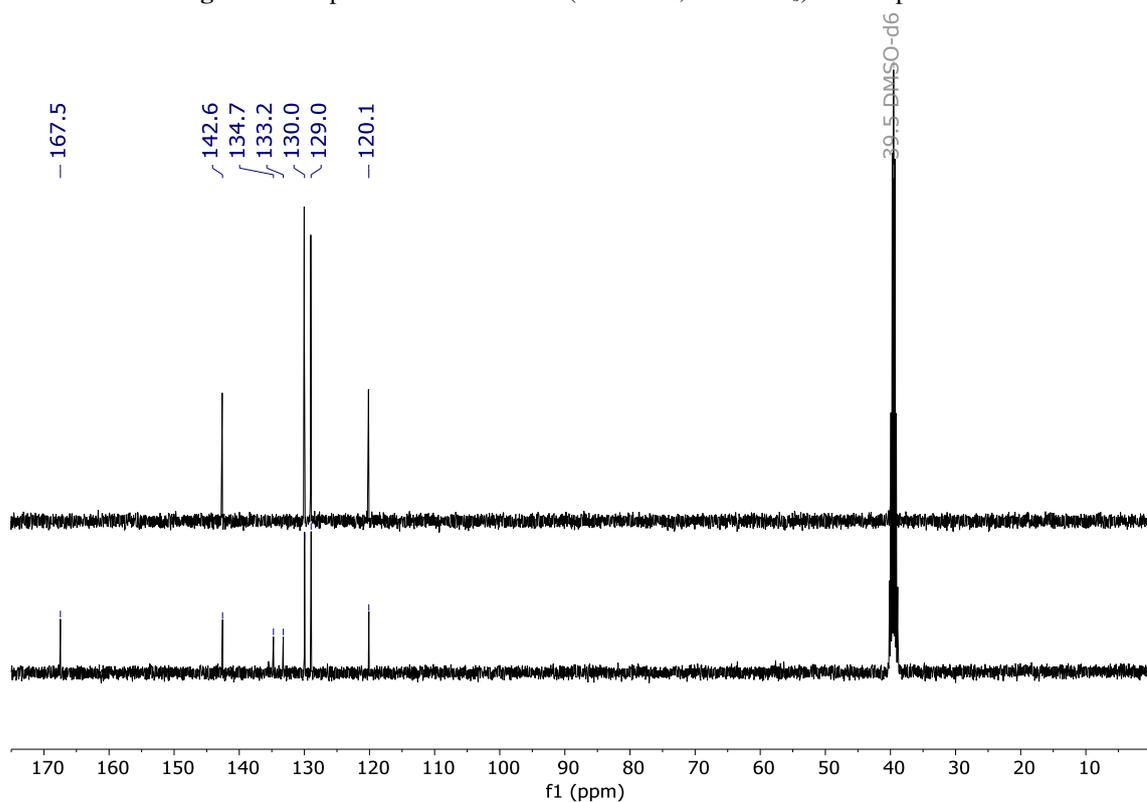


Figura S6. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o composto **2c**

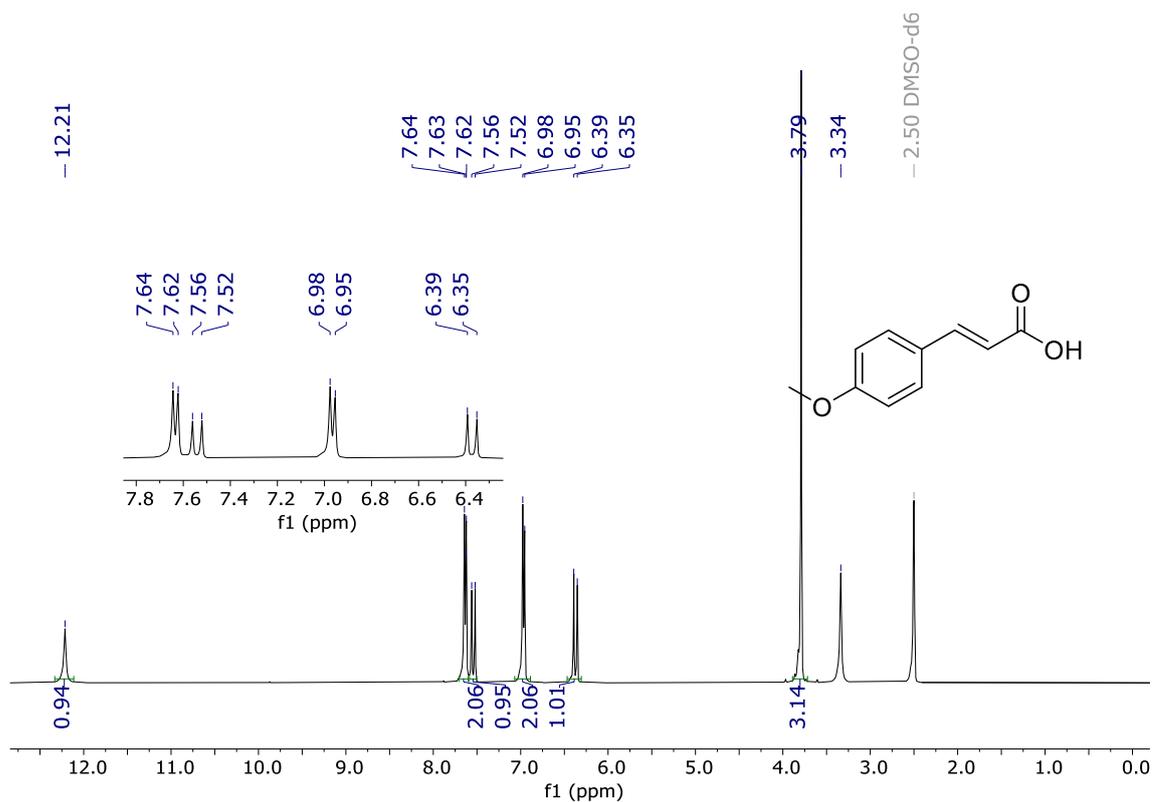


Figura S7. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **2e**

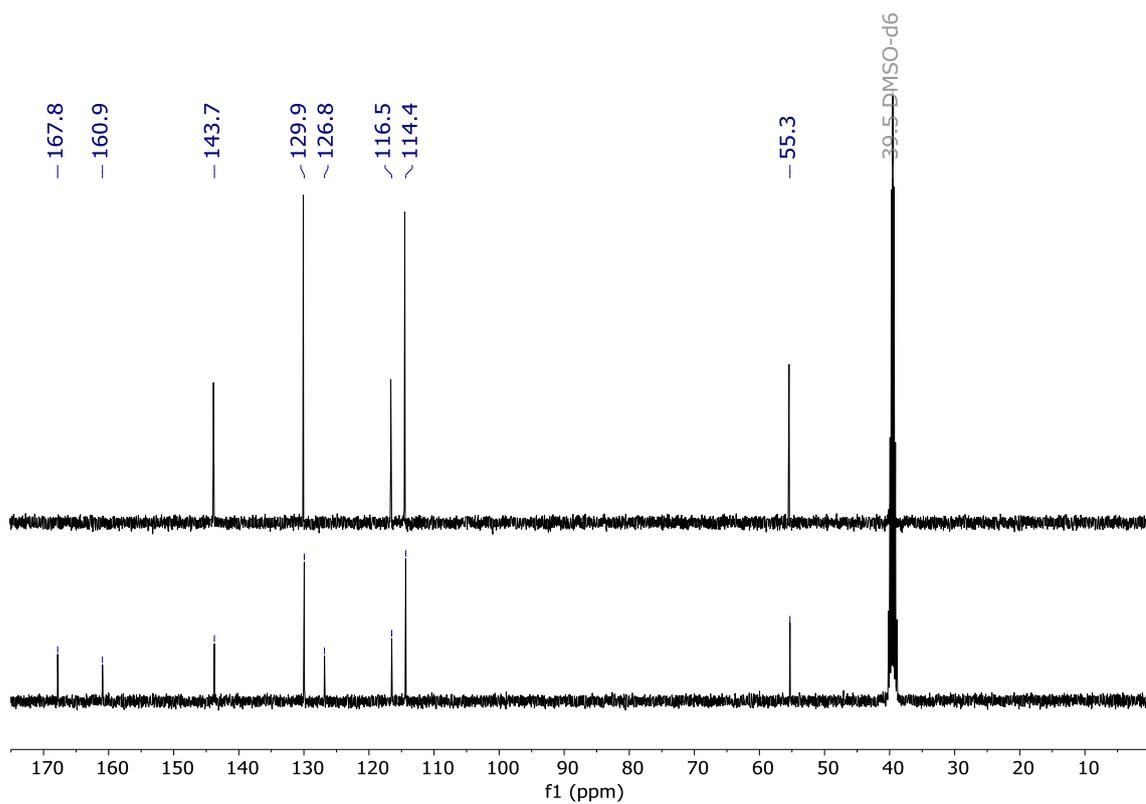


Figura S8. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o composto **2e**

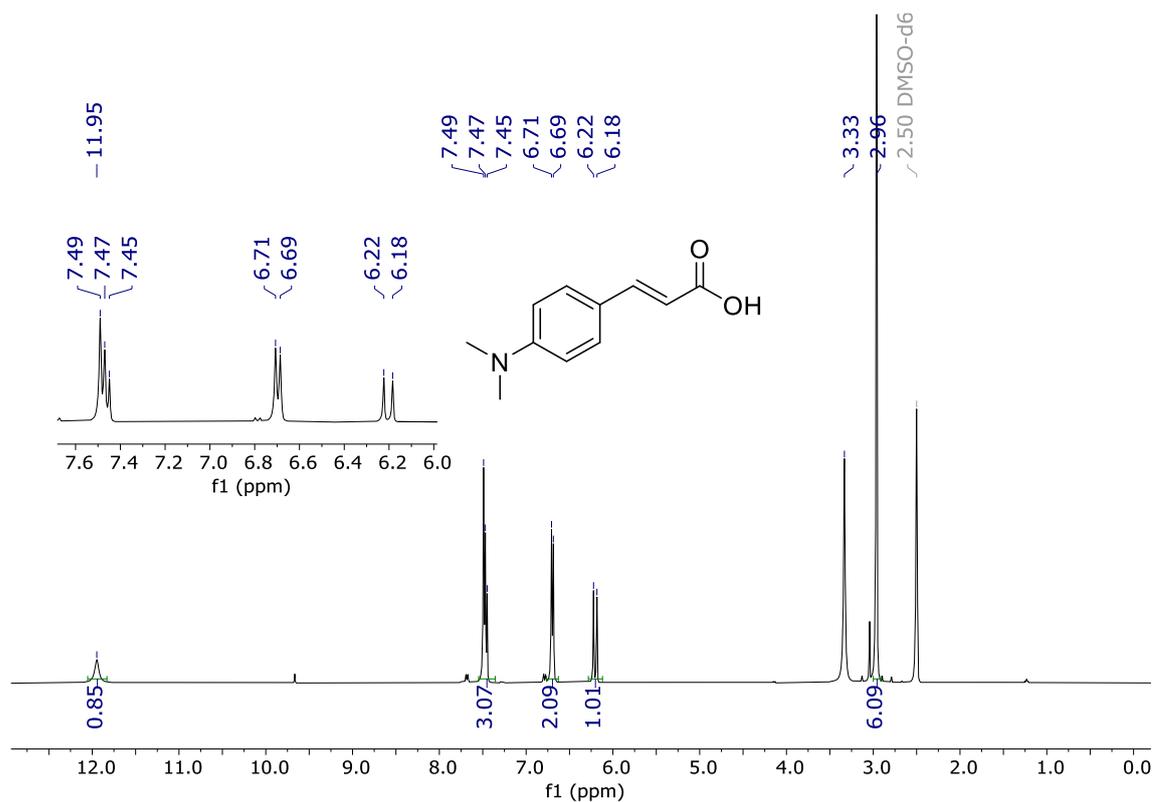


Figura S9. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto **2f**

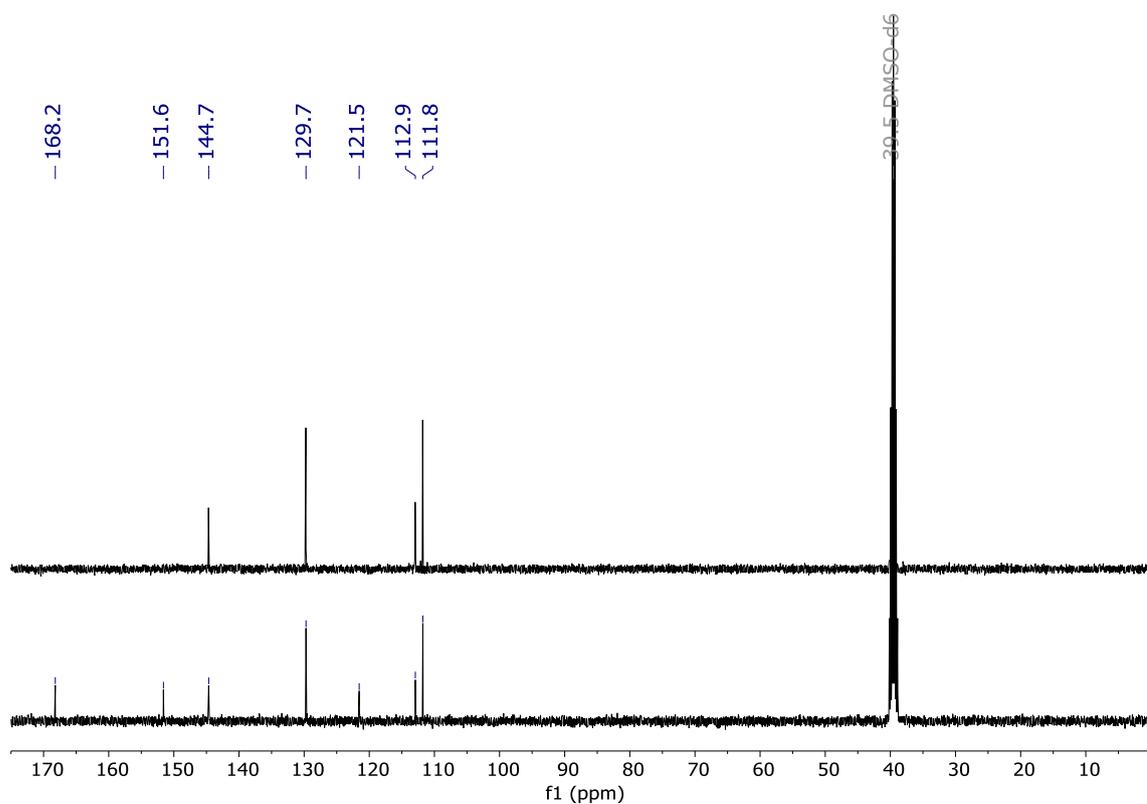


Figura S10. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (100 MHz, DMSO- d_6) para o composto **2f**

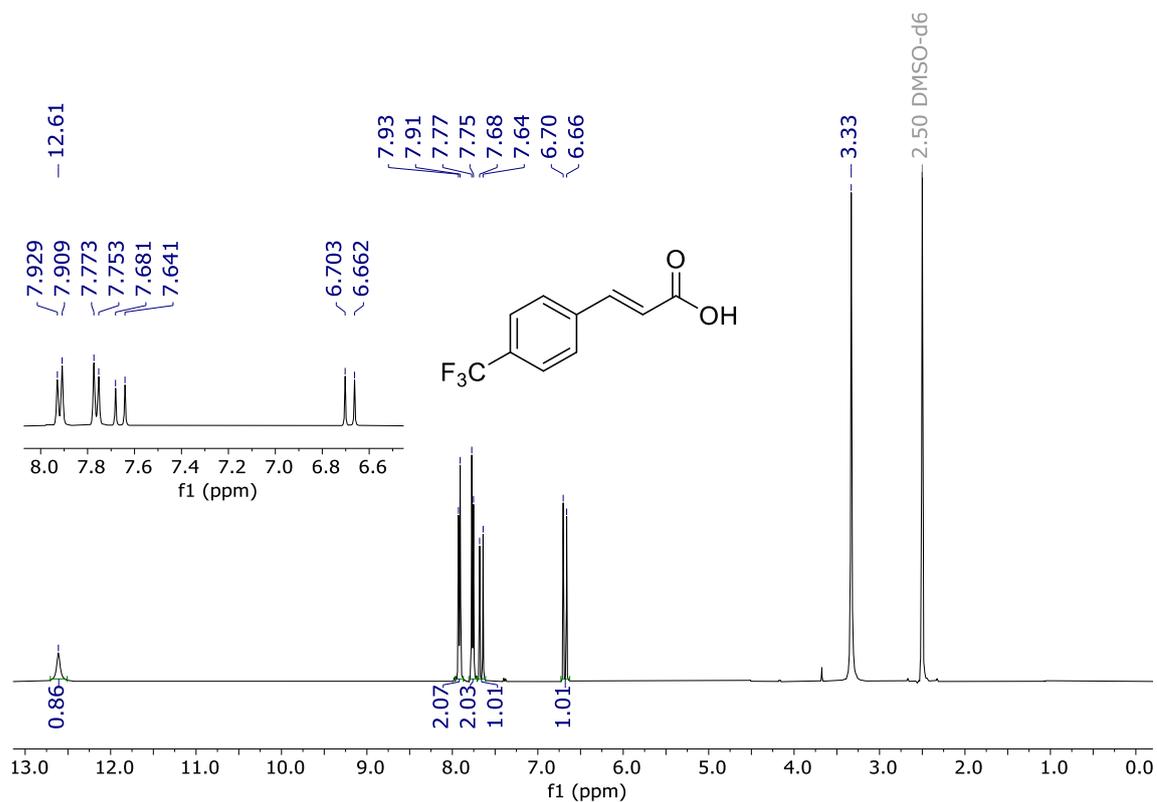


Figura S11. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **2g**

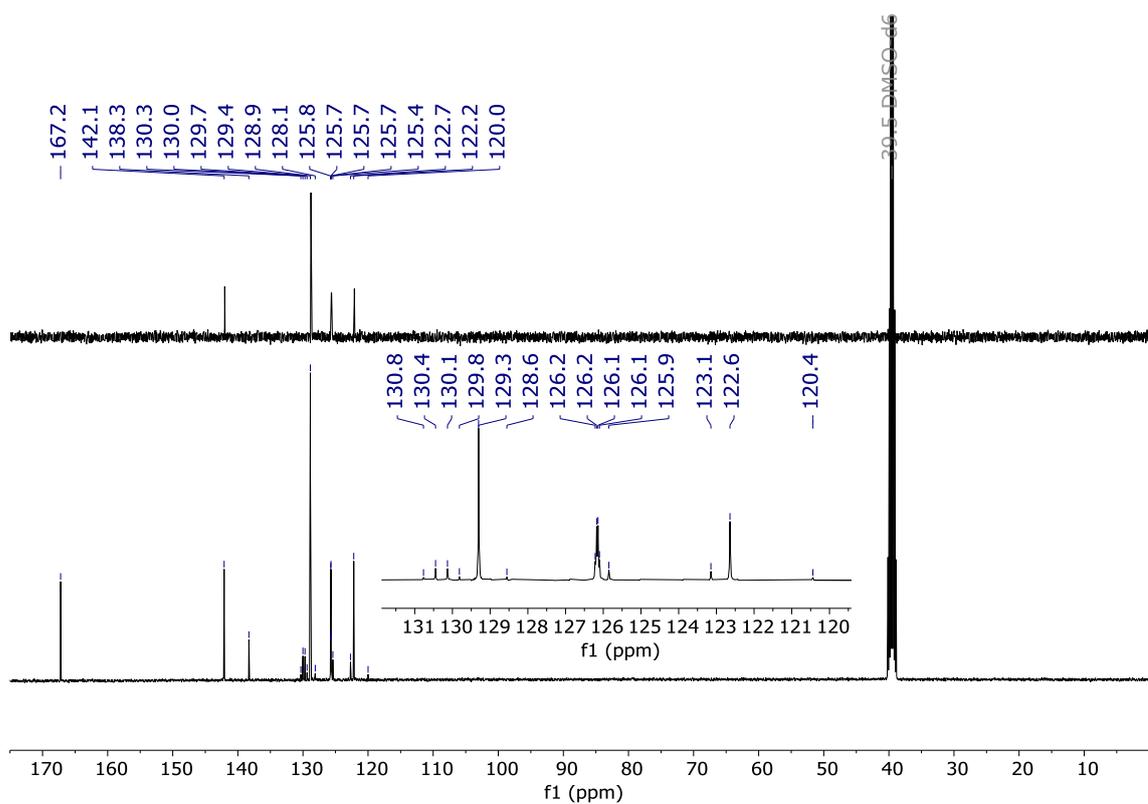


Figura S12. Espectros de RMN de ¹³C e DEPT-135 (100 MHz, DMSO-*d*₆) para o composto **2g**

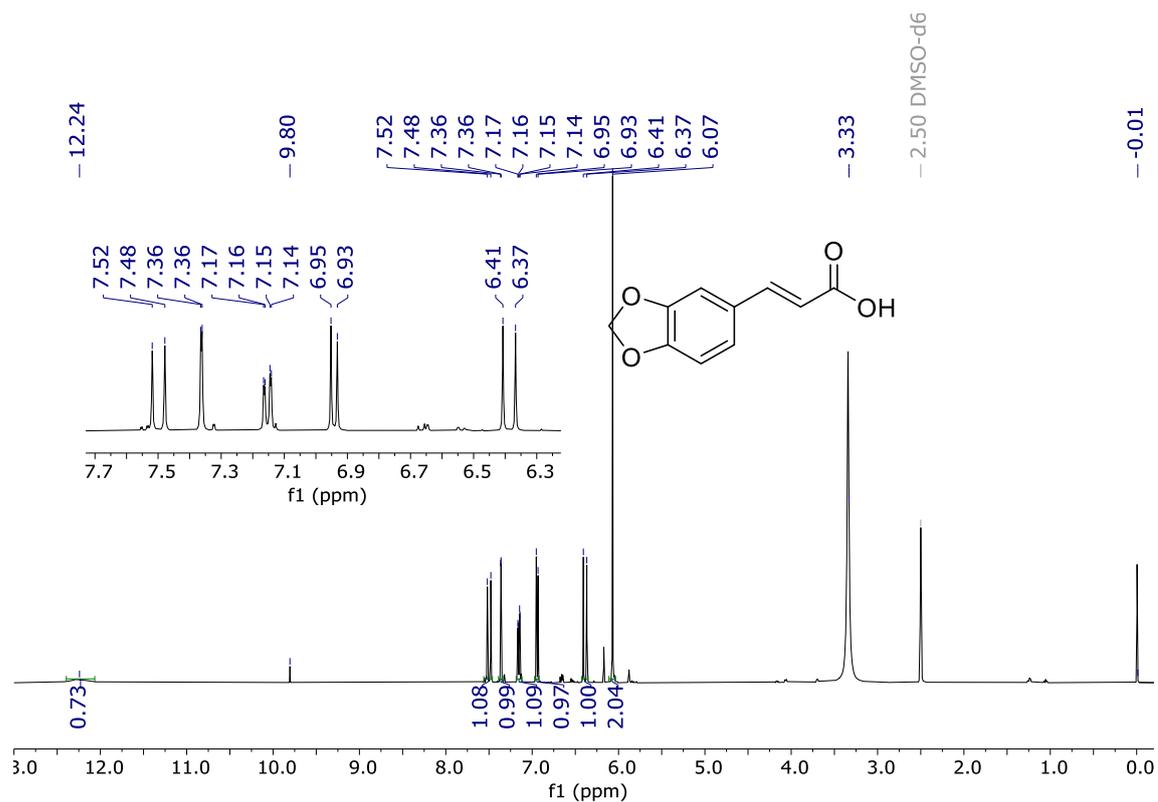


Figura S13. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **2h**

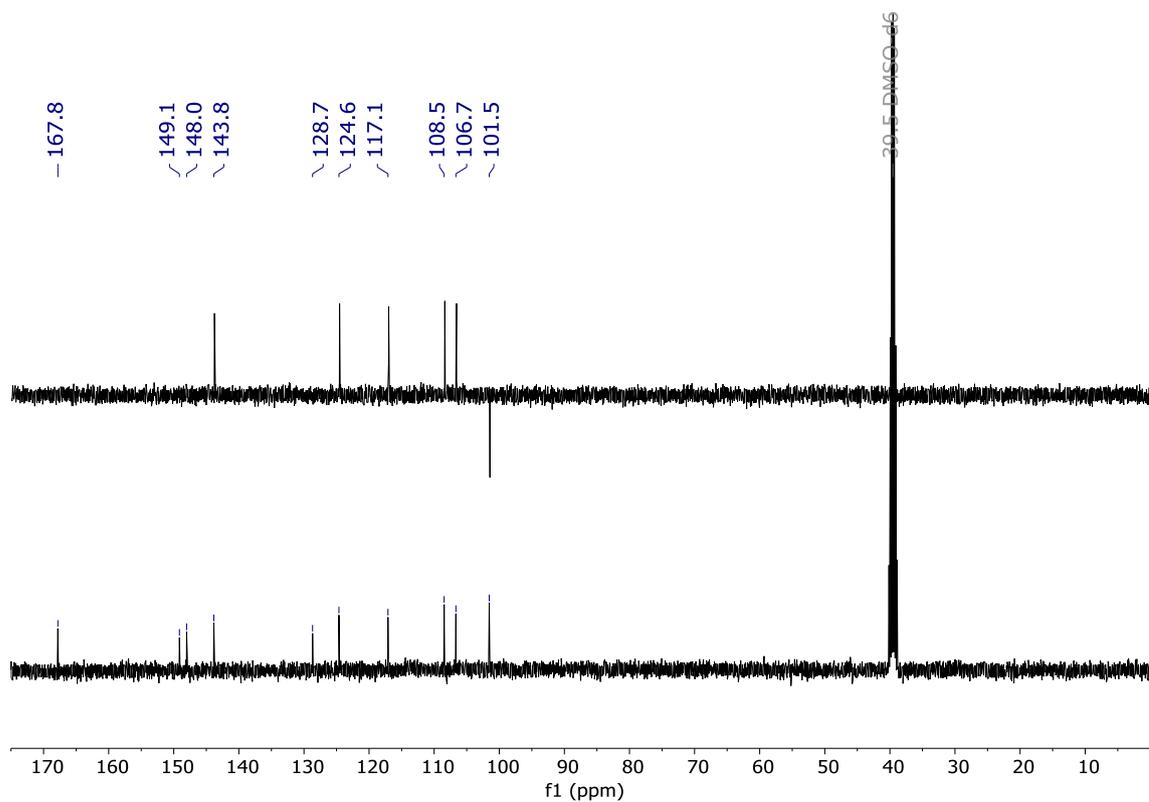


Figura S14. Espectros de RMN de ¹³C e DEPT-135 (100 MHz, DMSO-*d*₆) para o composto **2h**

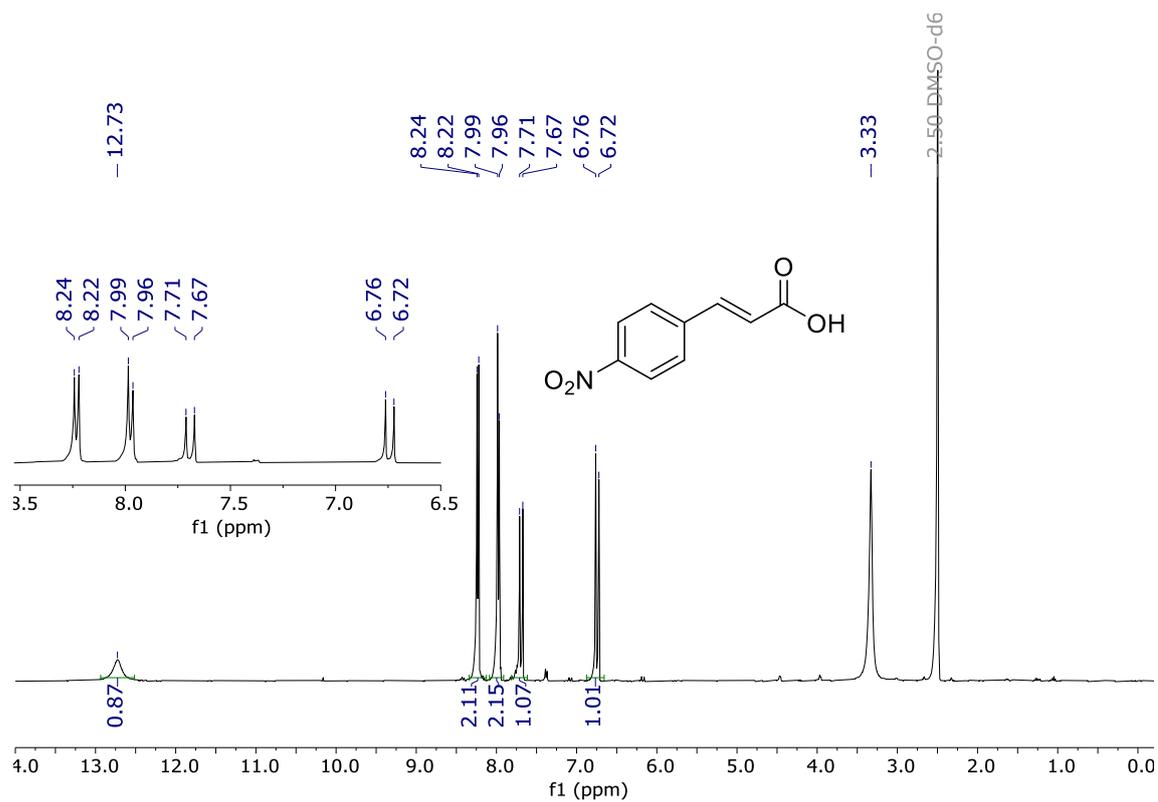


Figura S15. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **2i**

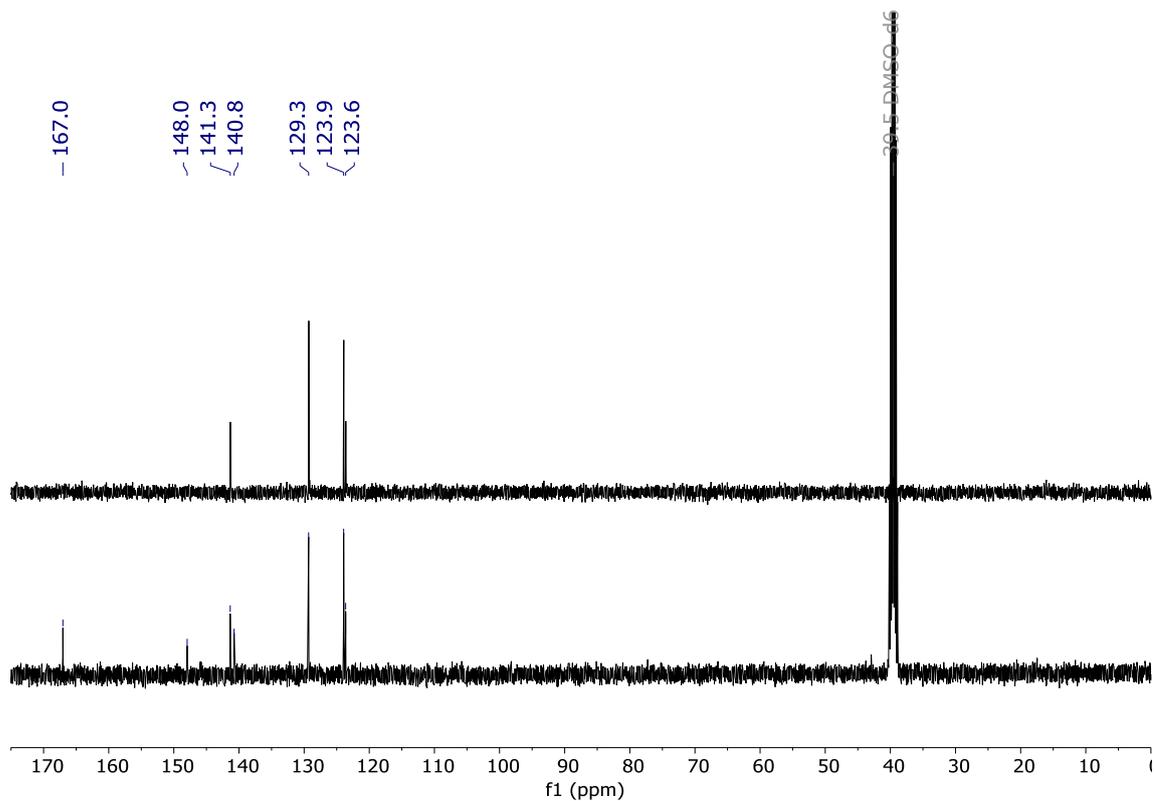


Figura S16. Espectros de RMN de ¹³C e DEPT-135 (100 MHz, DMSO-*d*₆) para o composto **2i**

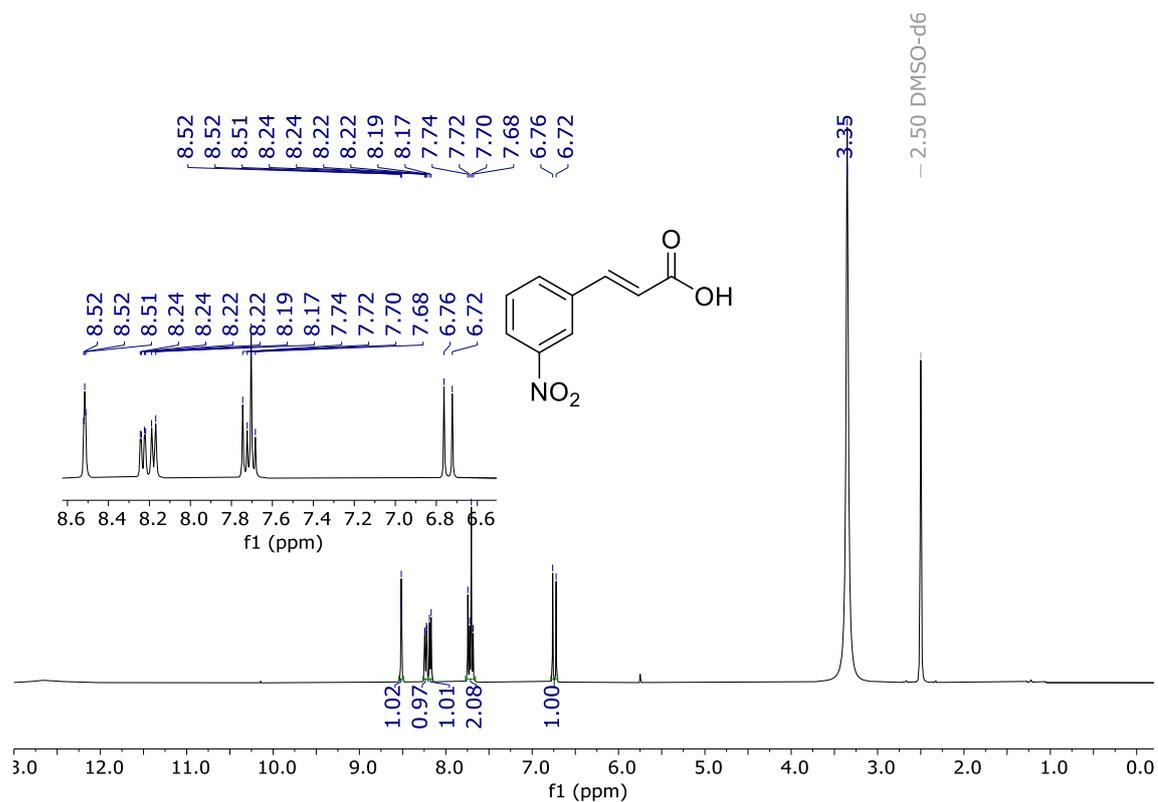


Figura S17. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **2j**

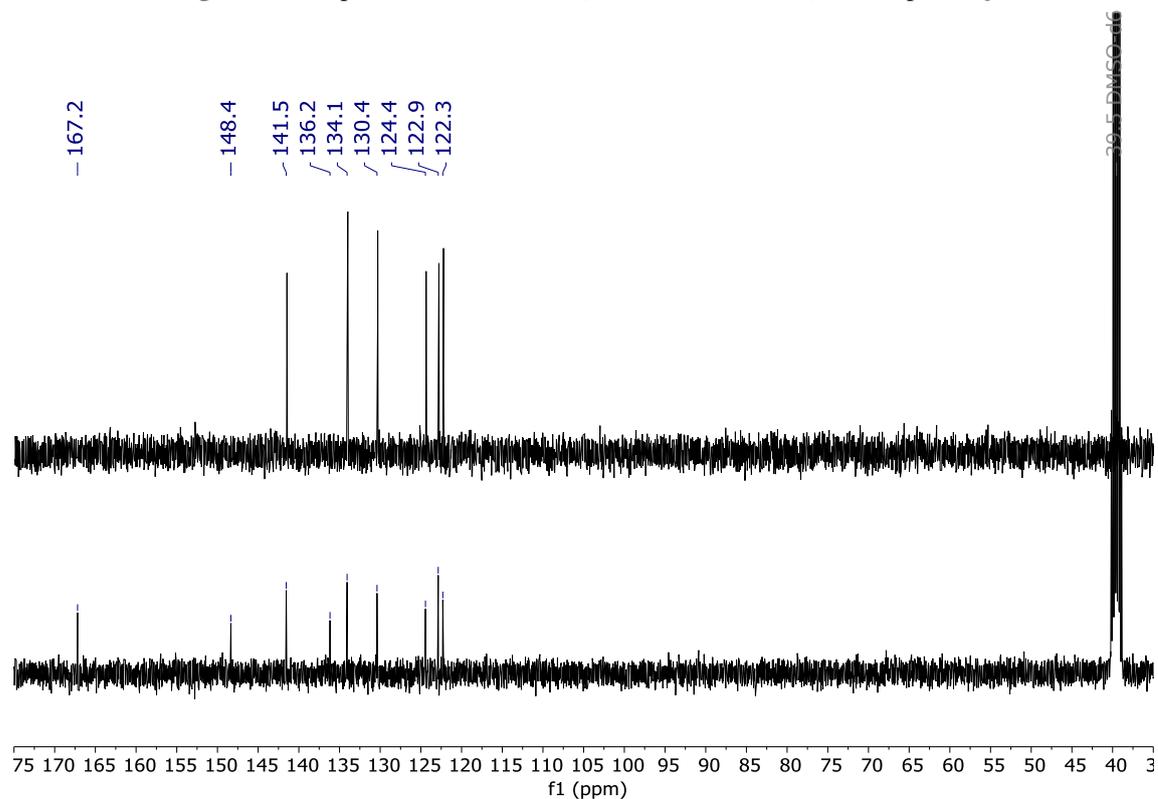


Figura S18. Espectros de RMN de ¹³C e DEPT-135 (100 MHz, DMSO-*d*₆) para o composto **2j**

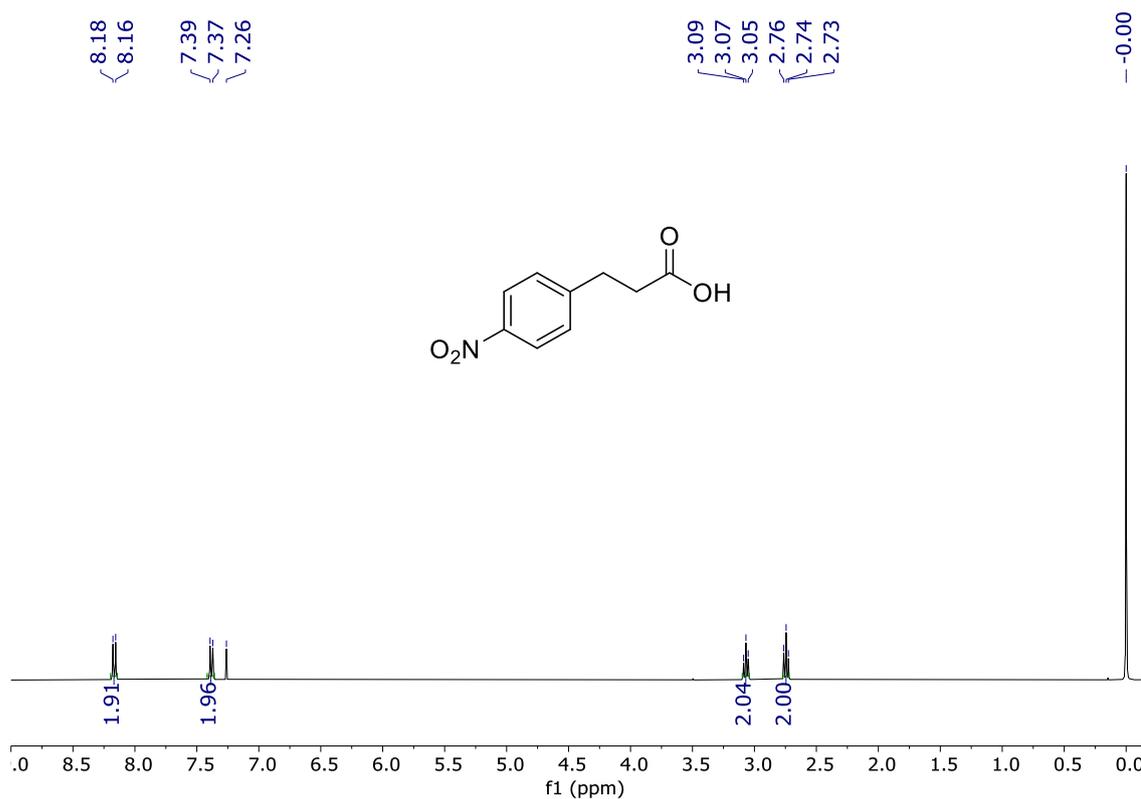


Figura S19. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **2k**

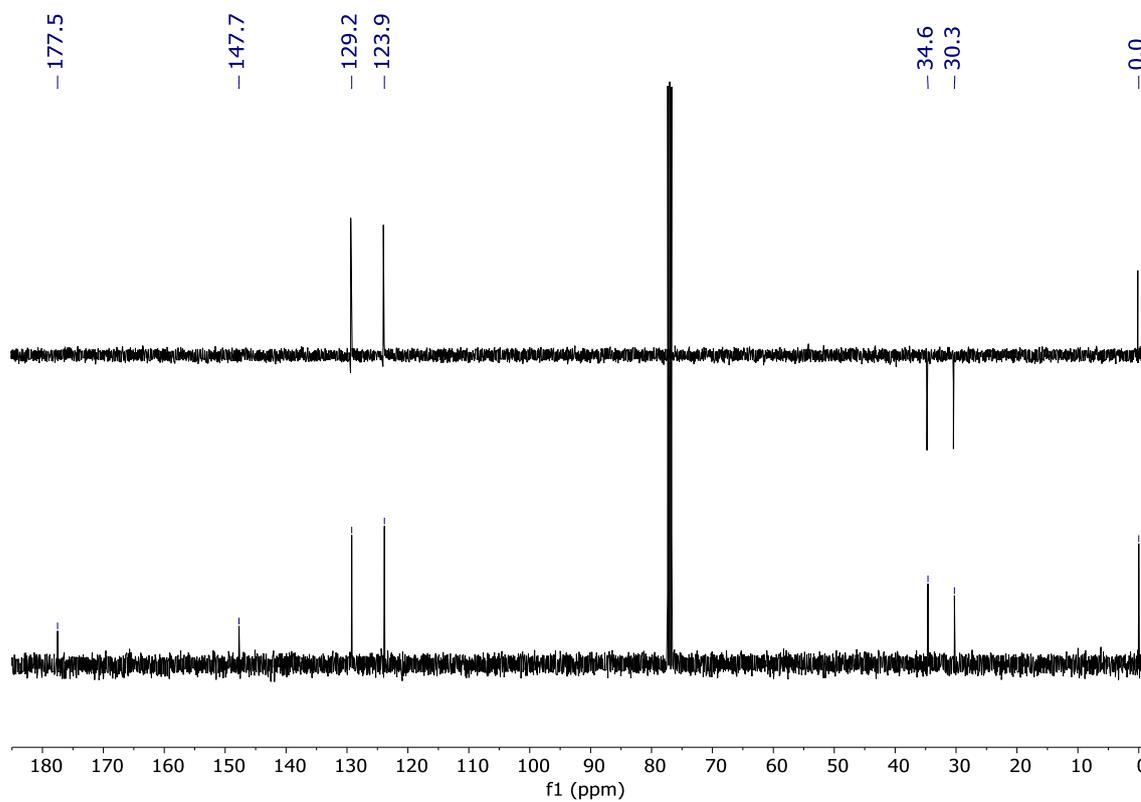


Figura S20. Espectros de RMN de ¹³C e DEPT-135 (100 MHz, CDCl₃) para o composto **2k**

APÊNDICE B - Espectros de RMN para os compostos 3a-3i

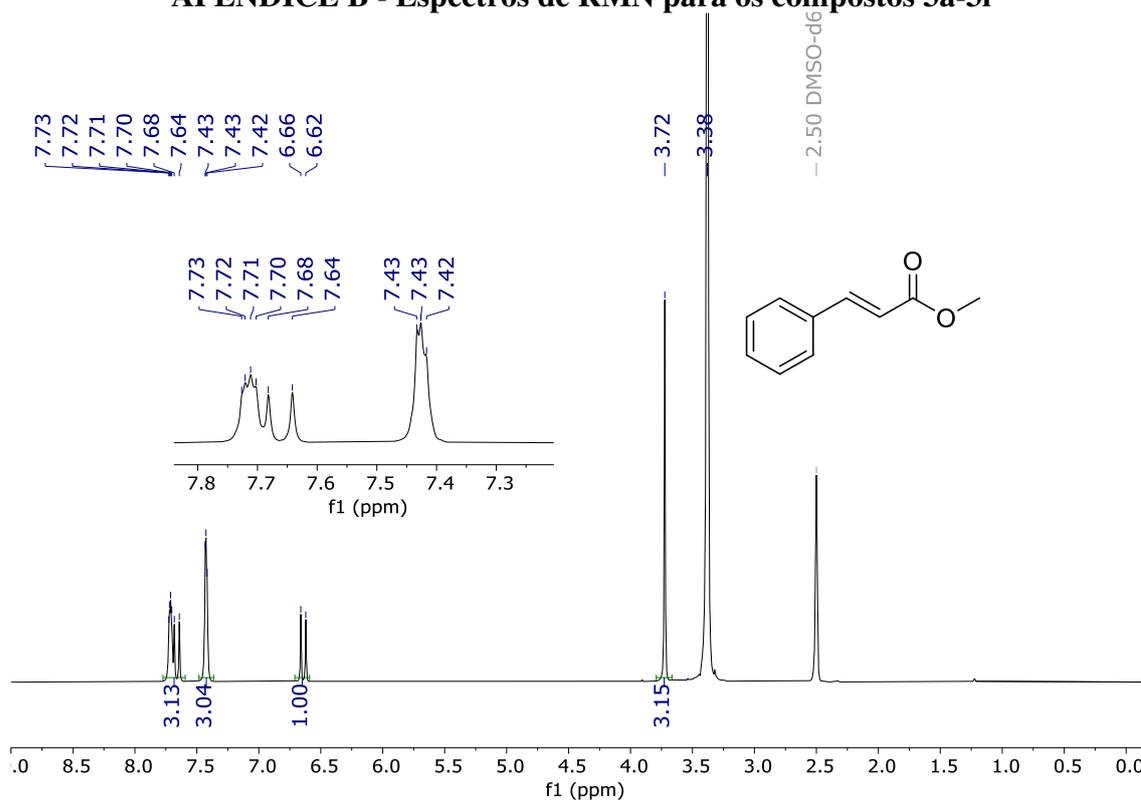


Figura S21. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto 3a

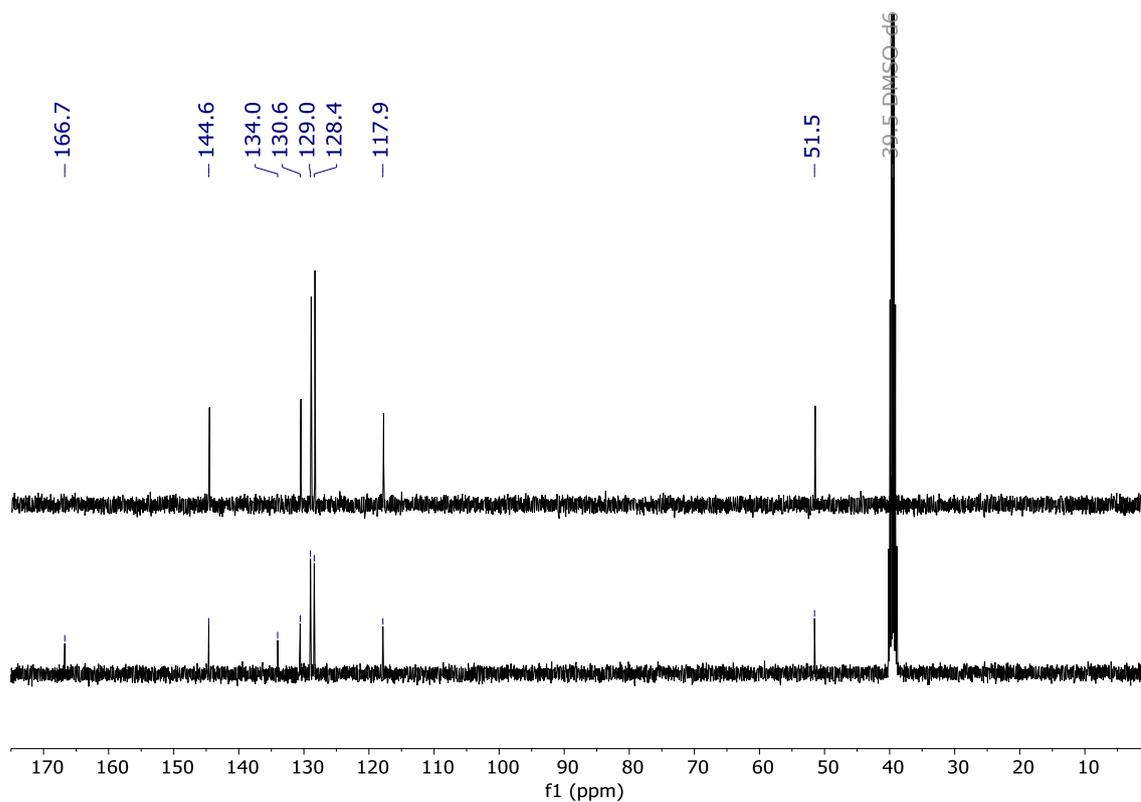


Figura S22. Espectros de RMN de ¹³C e DEPT-135 (100 MHz, DMSO-*d*₆) para o composto 3a

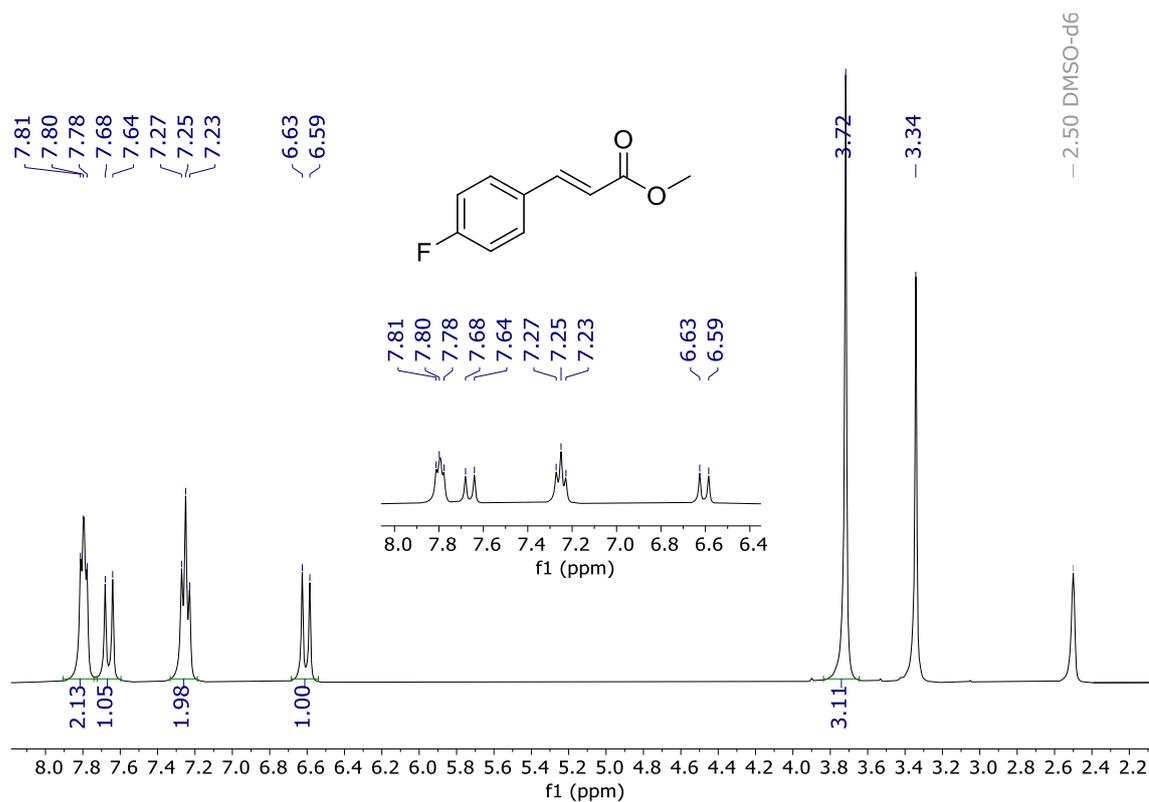


Figura S23. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **3b**

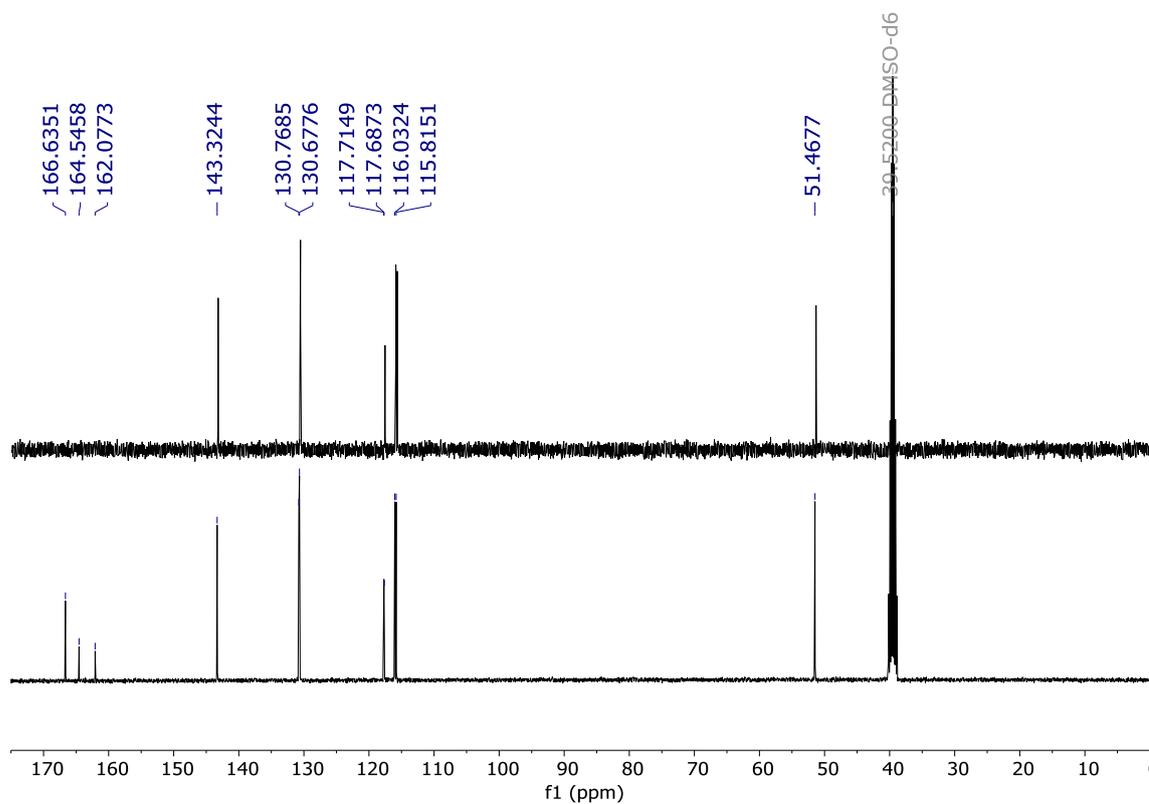


Figura S24. Espectros de RMN de ¹³C e DEPT-135 (100 MHz, DMSO-*d*₆) para o composto **3b**

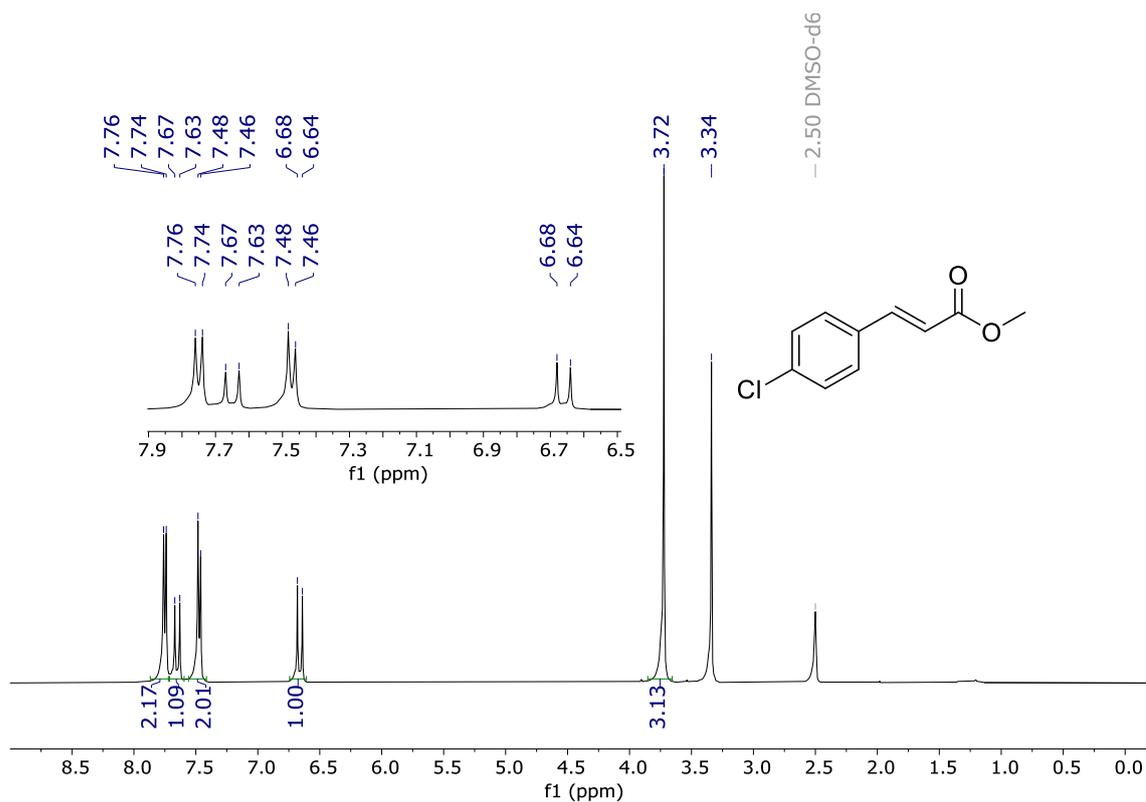


Figura S25. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **3c**

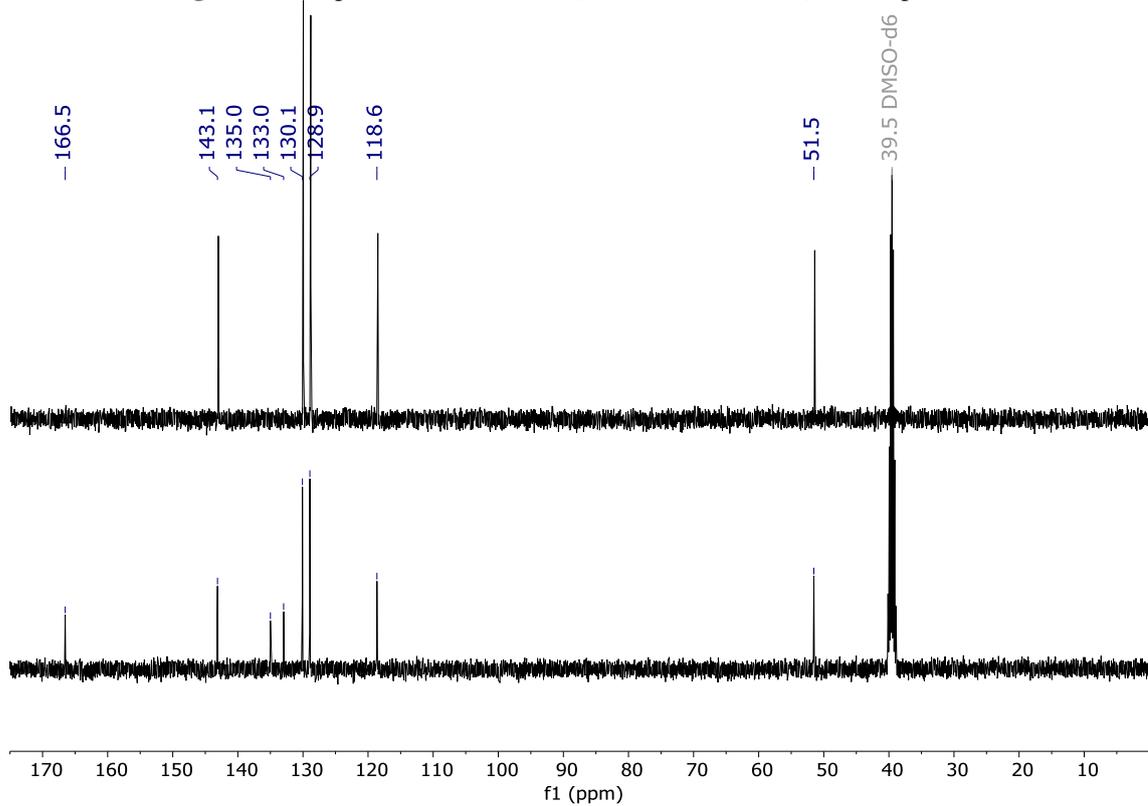


Figura S26. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (100 MHz, DMSO-*d*₆) para o composto **3c**

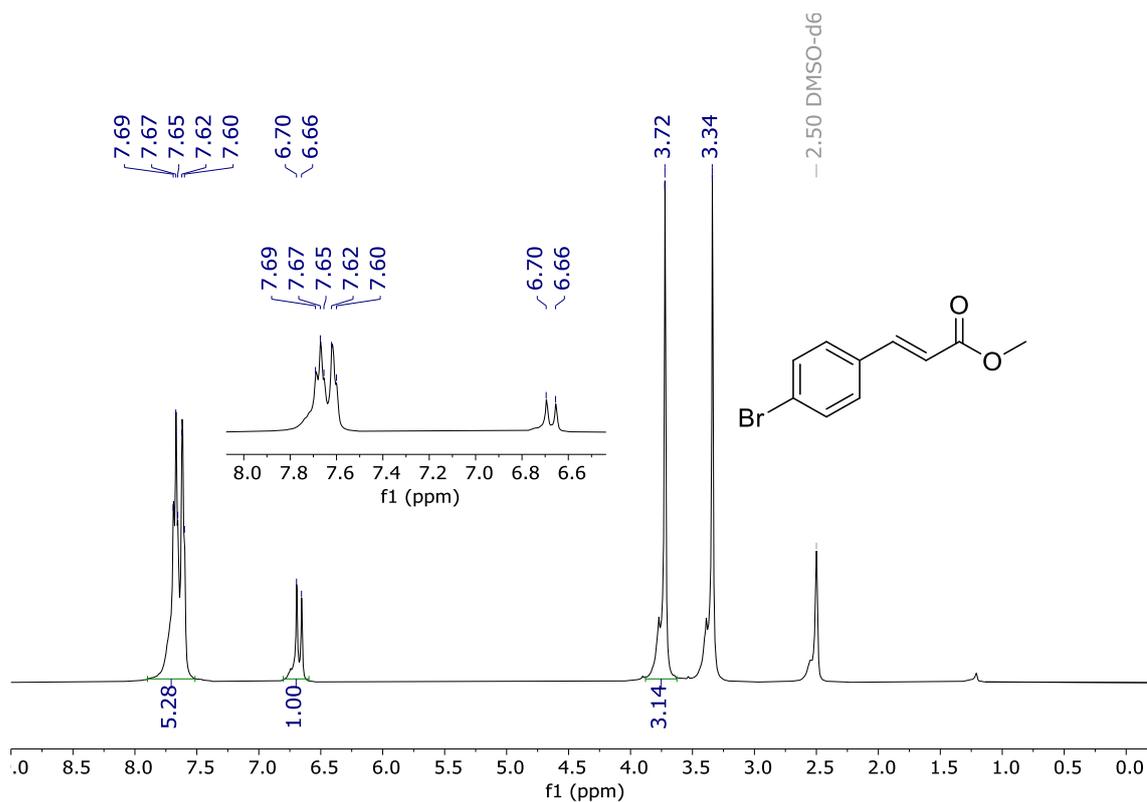


Figura S27. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **3d**

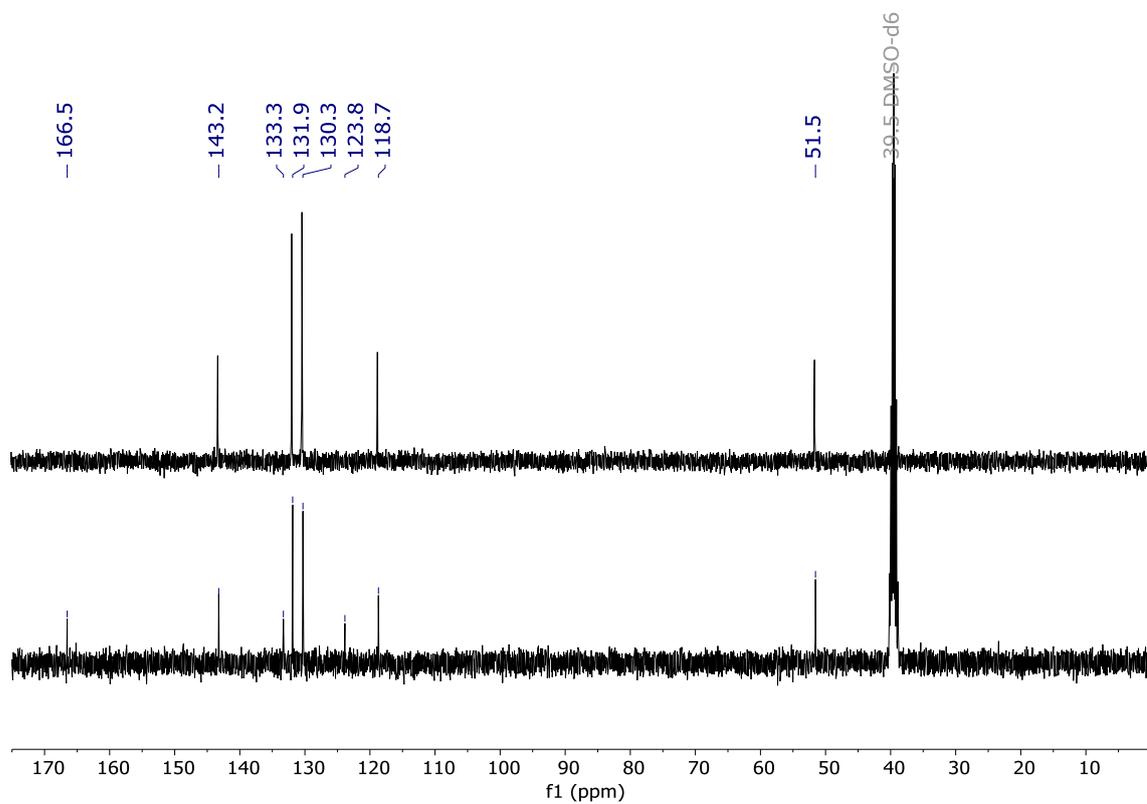


Figura S28. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o composto **3d**

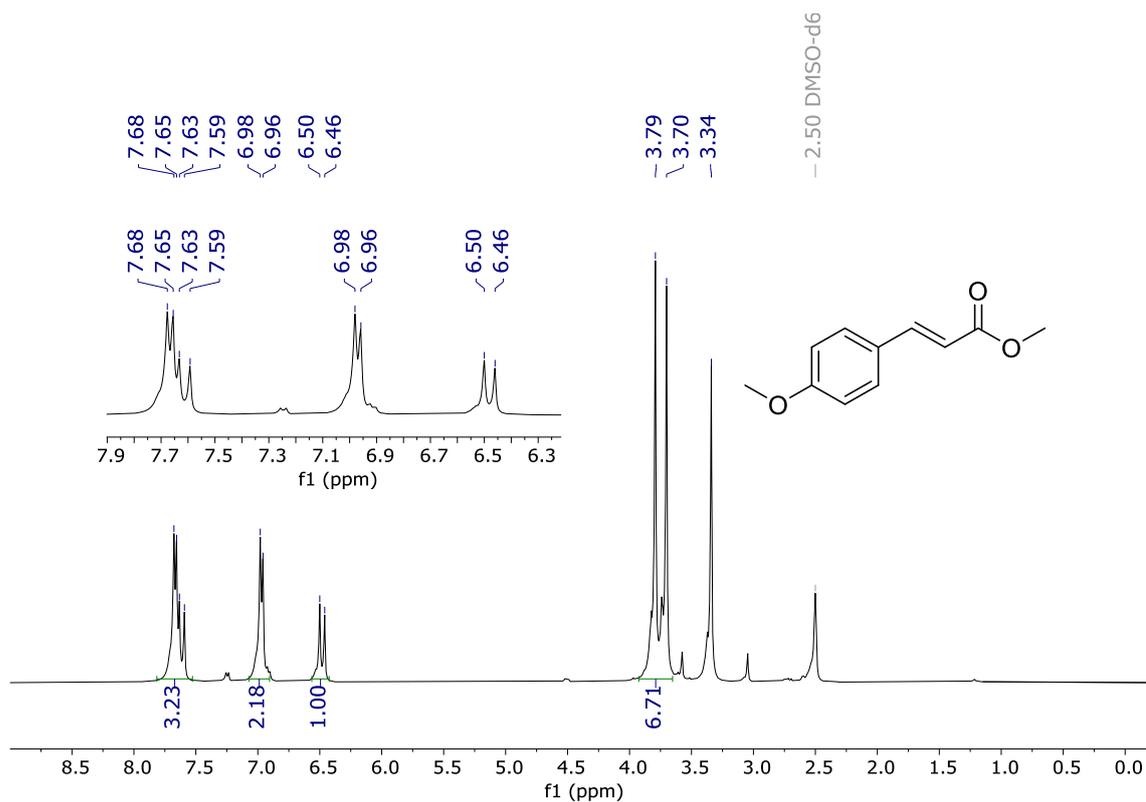


Figura S29. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **3e**

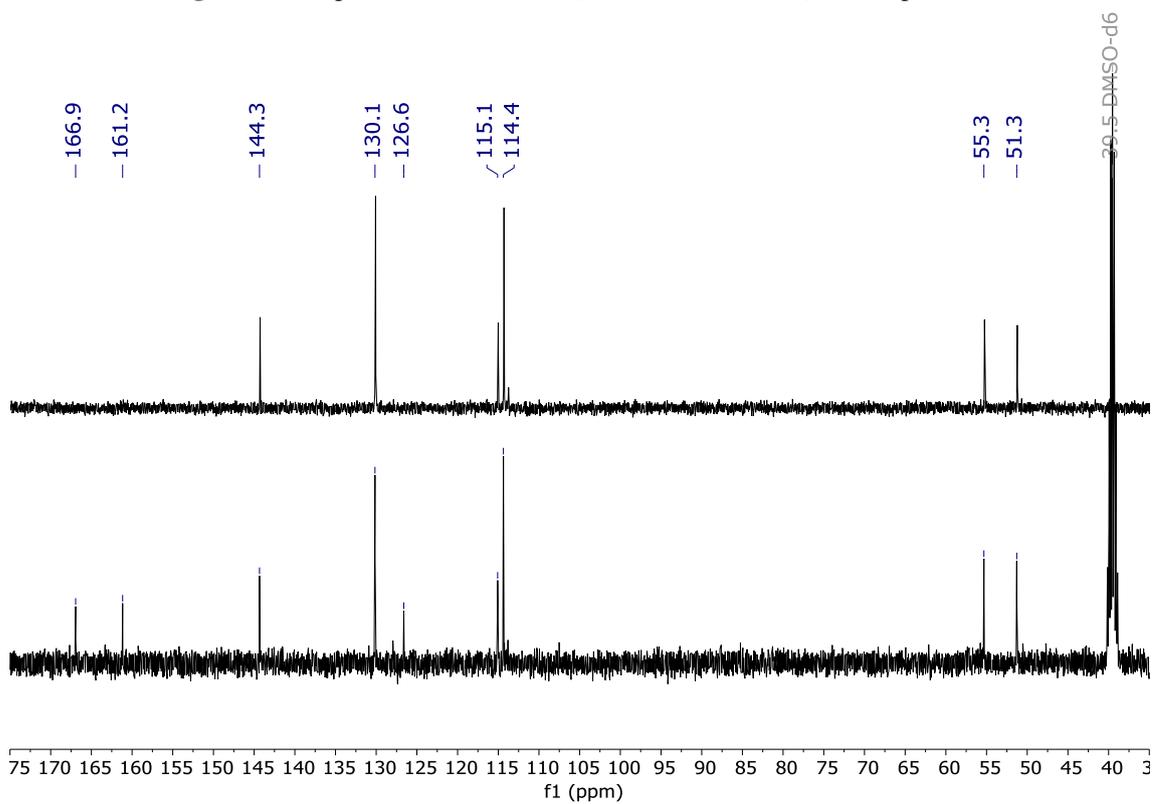


Figura S30. Espectros de RMN de ¹³C e DEPT-135 (100 MHz, DMSO-*d*₆) para o composto **3e**

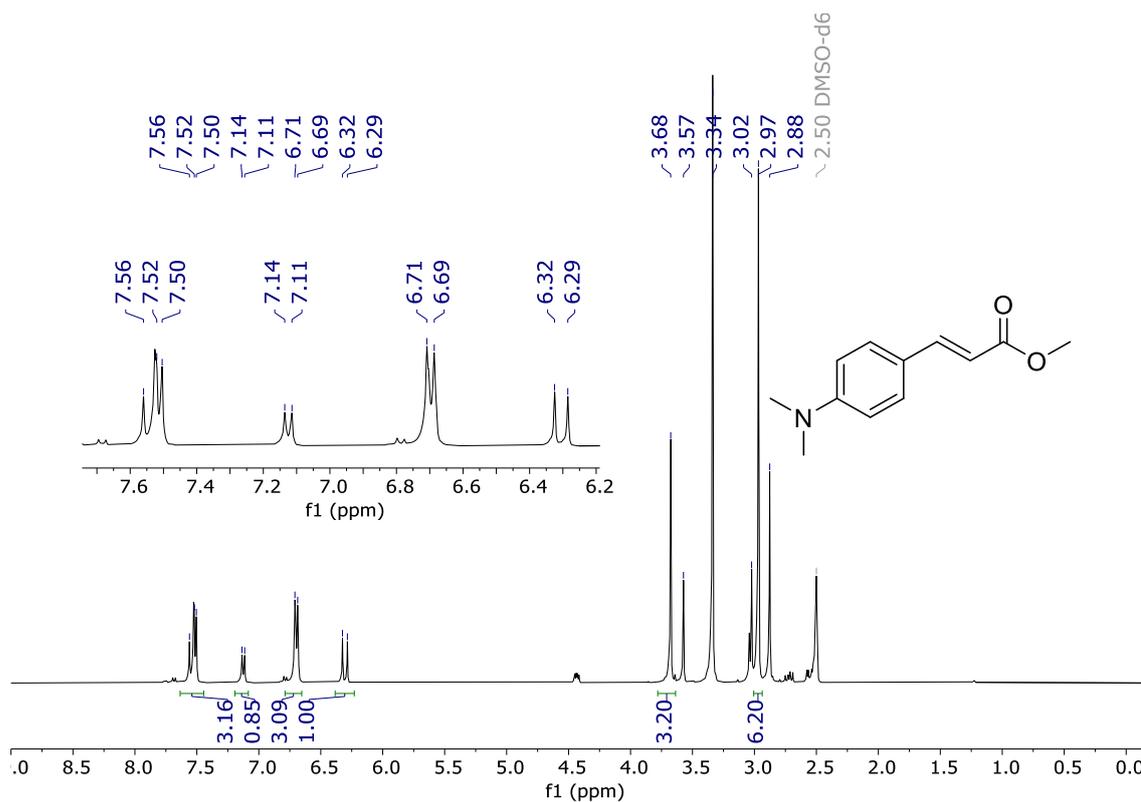


Figura S31. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto 3f

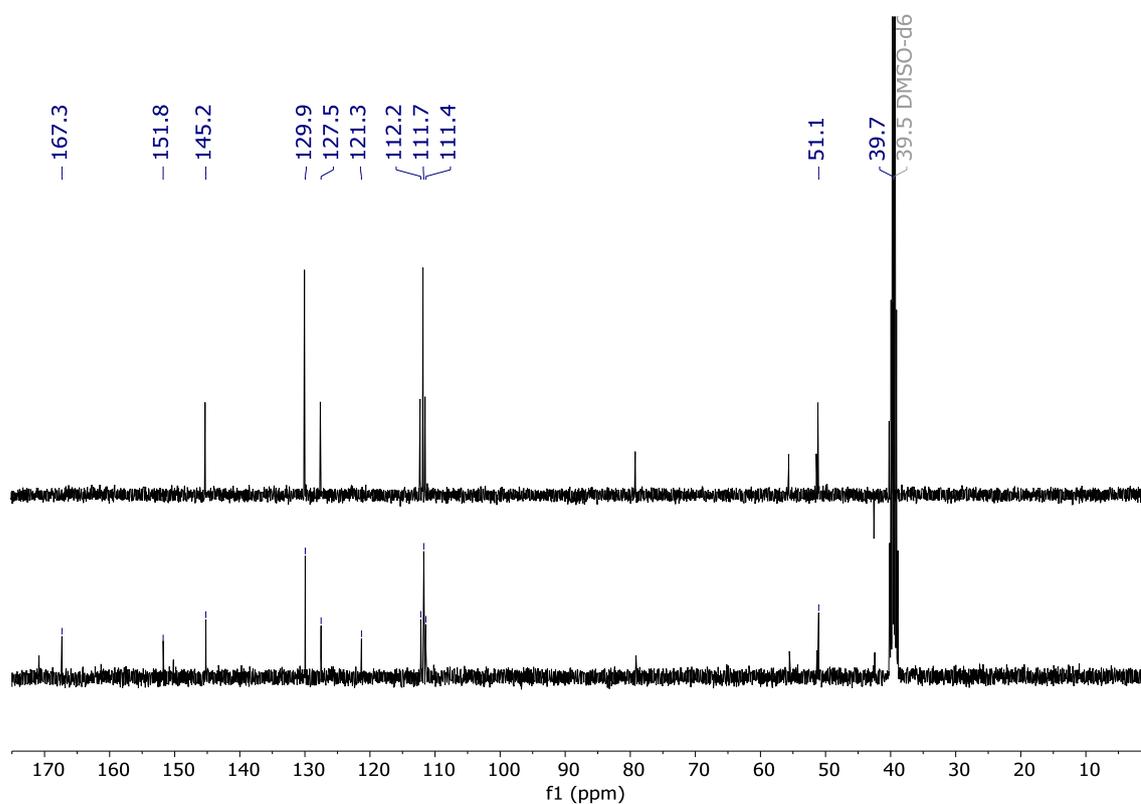


Figura S32. Espectros de RMN de ¹³C e DEPT-135 (100 MHz, DMSO-*d*₆) para o composto 3f

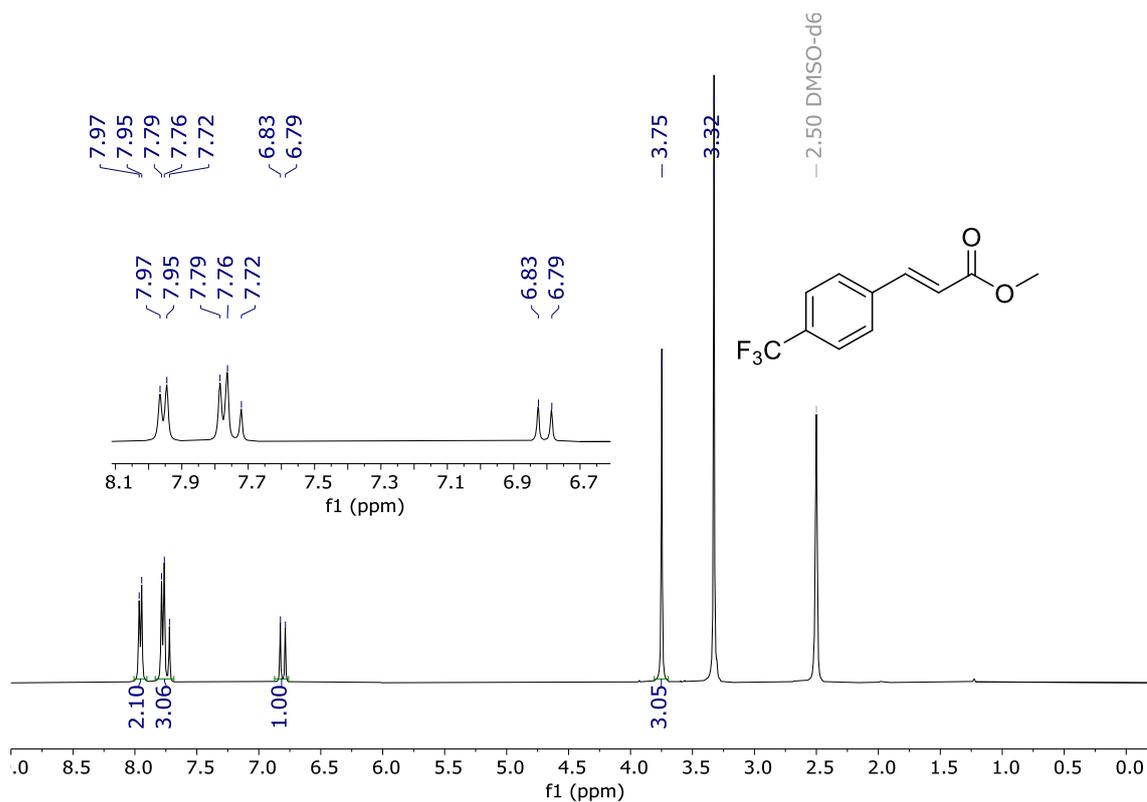


Figura S33. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **3g**

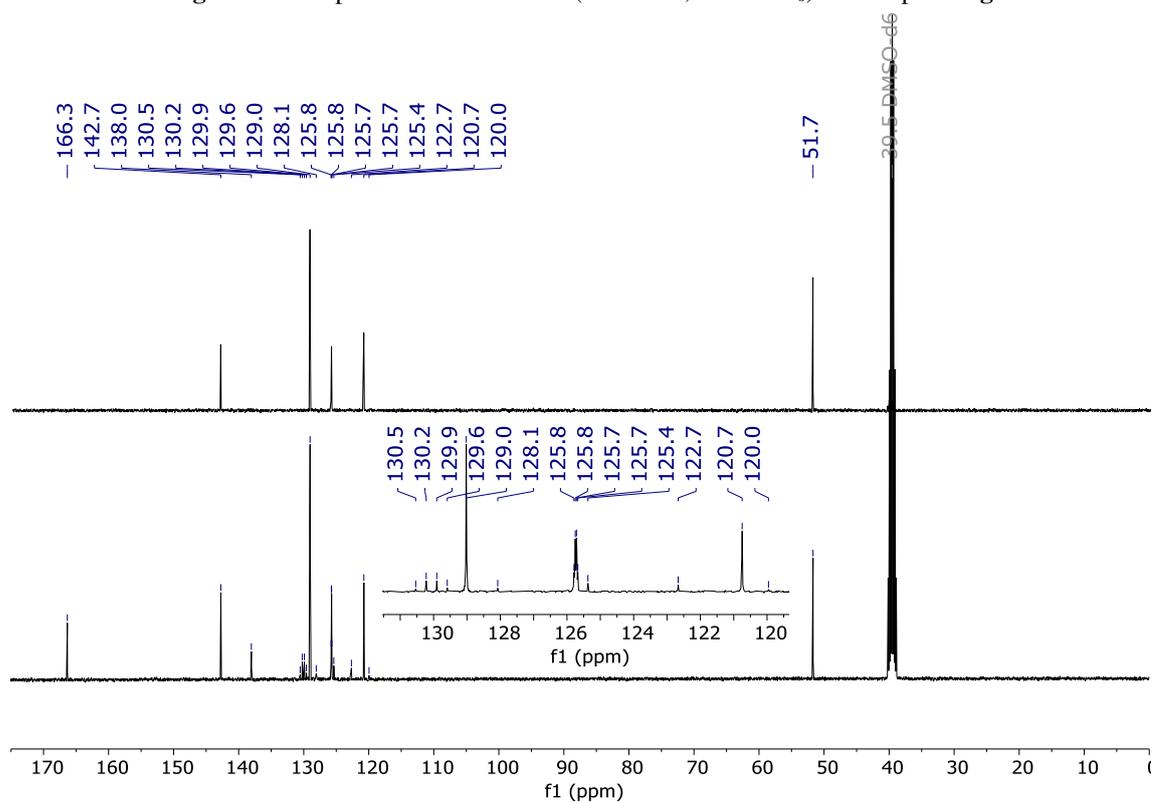


Figura S34. Espectros de RMN de ¹³C e DEPT-135 (100 MHz, DMSO-*d*₆) para o composto **3g**

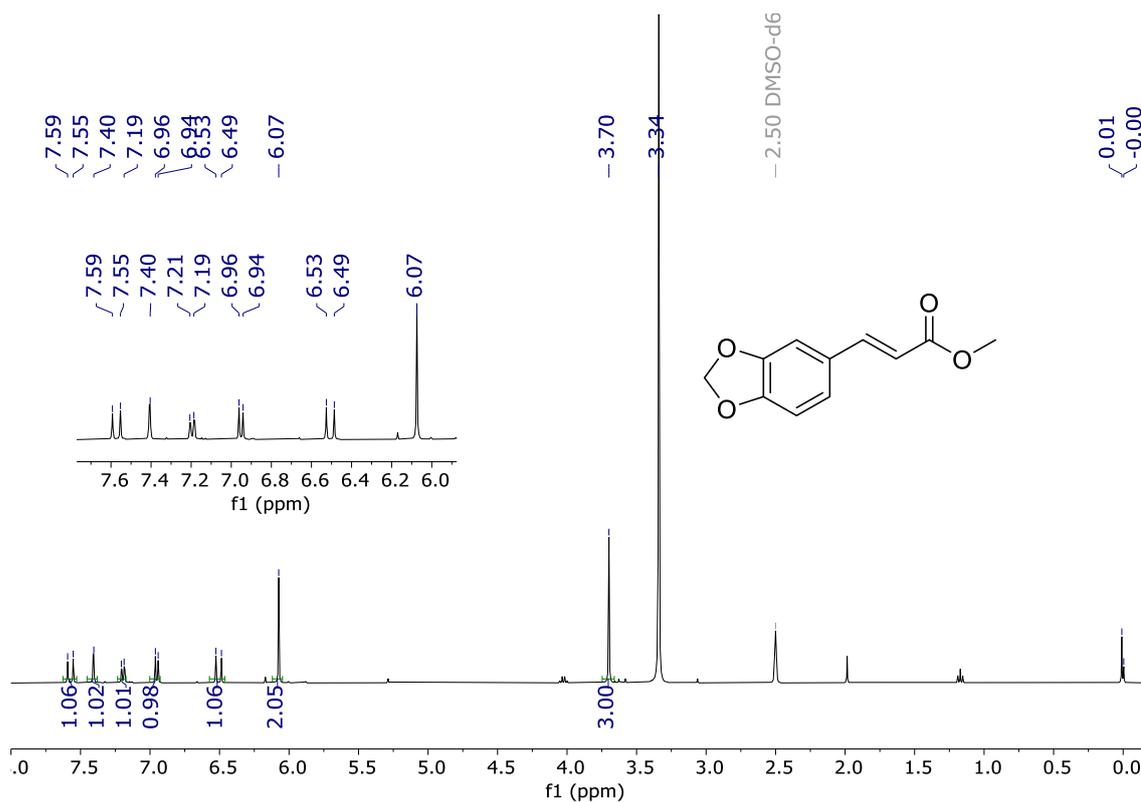


Figura S35. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **3h**

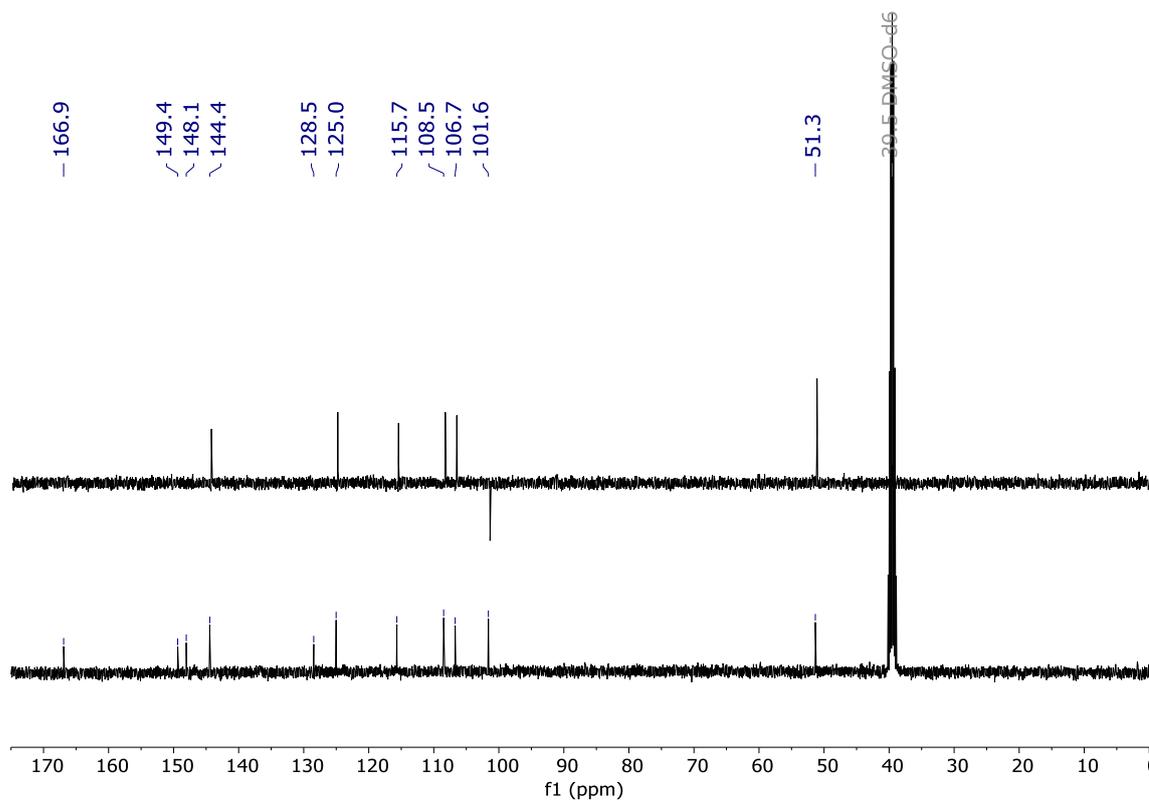


Figura S36. Espectros de RMN de ¹³C e DEPT-135 (100 MHz, DMSO-*d*₆) para o composto **3h**

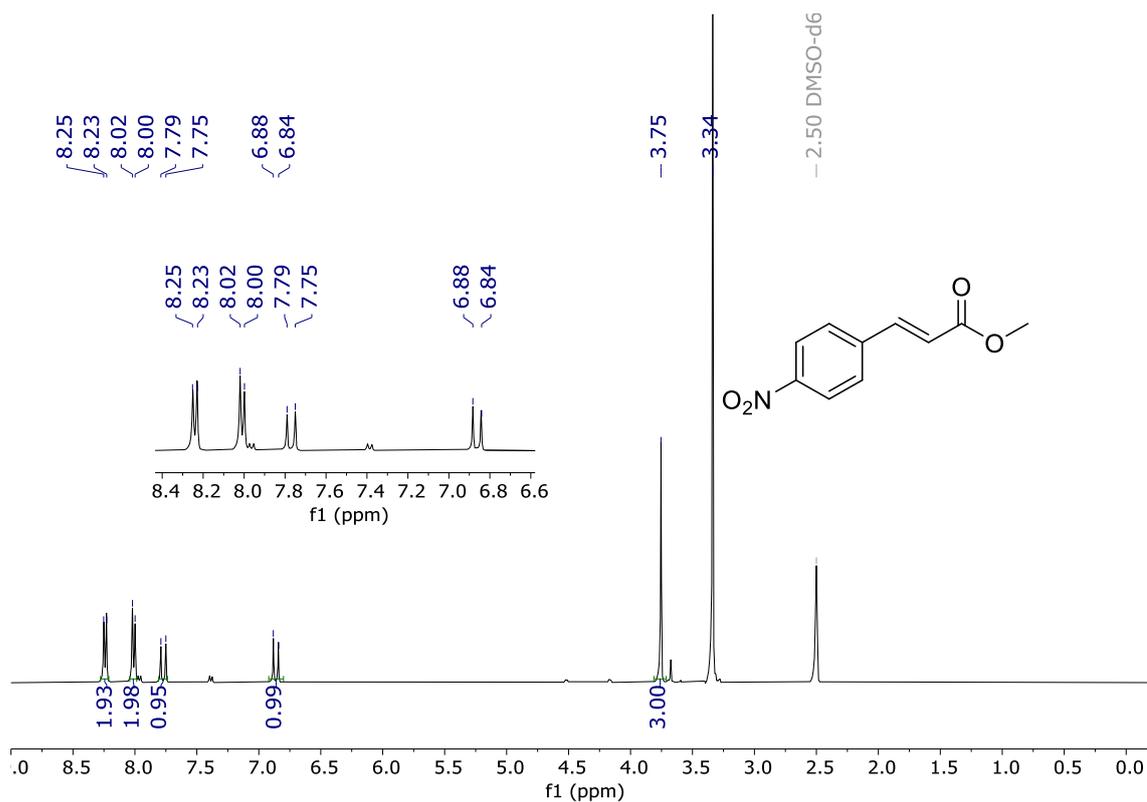


Figura S37. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **3i**

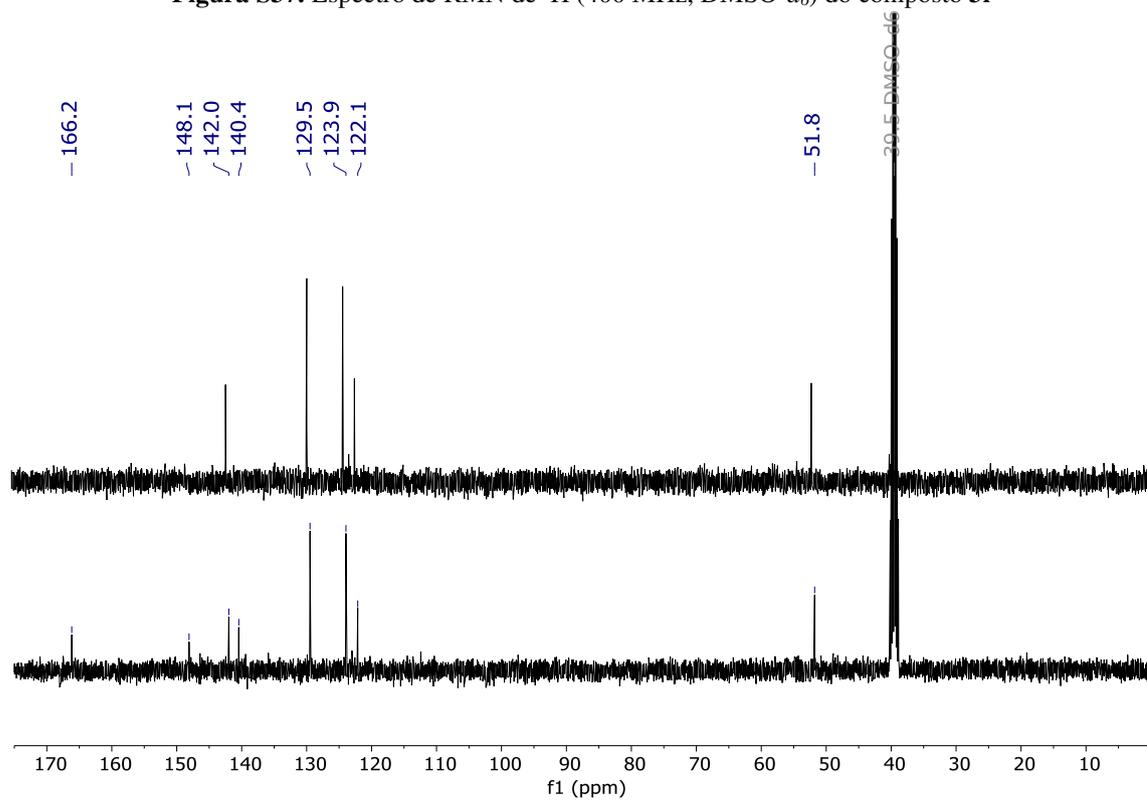


Figura S38. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o composto **3i**

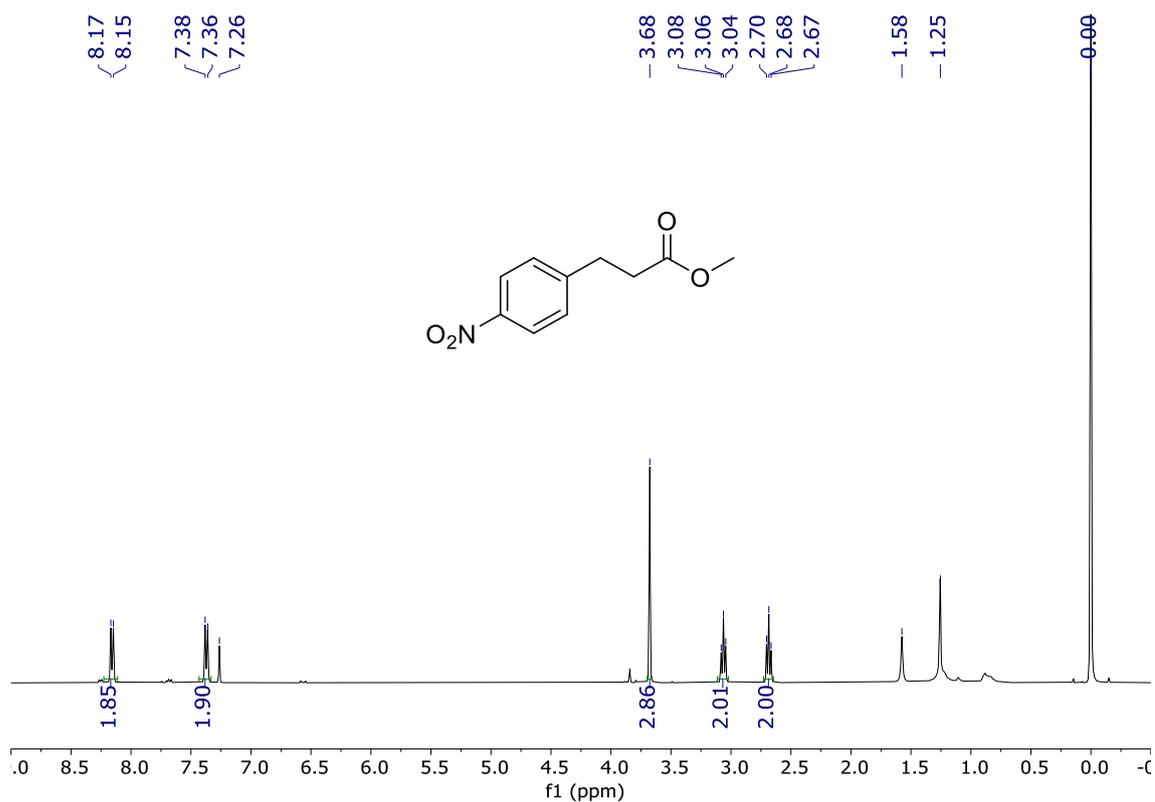


Figura S39. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **3k**

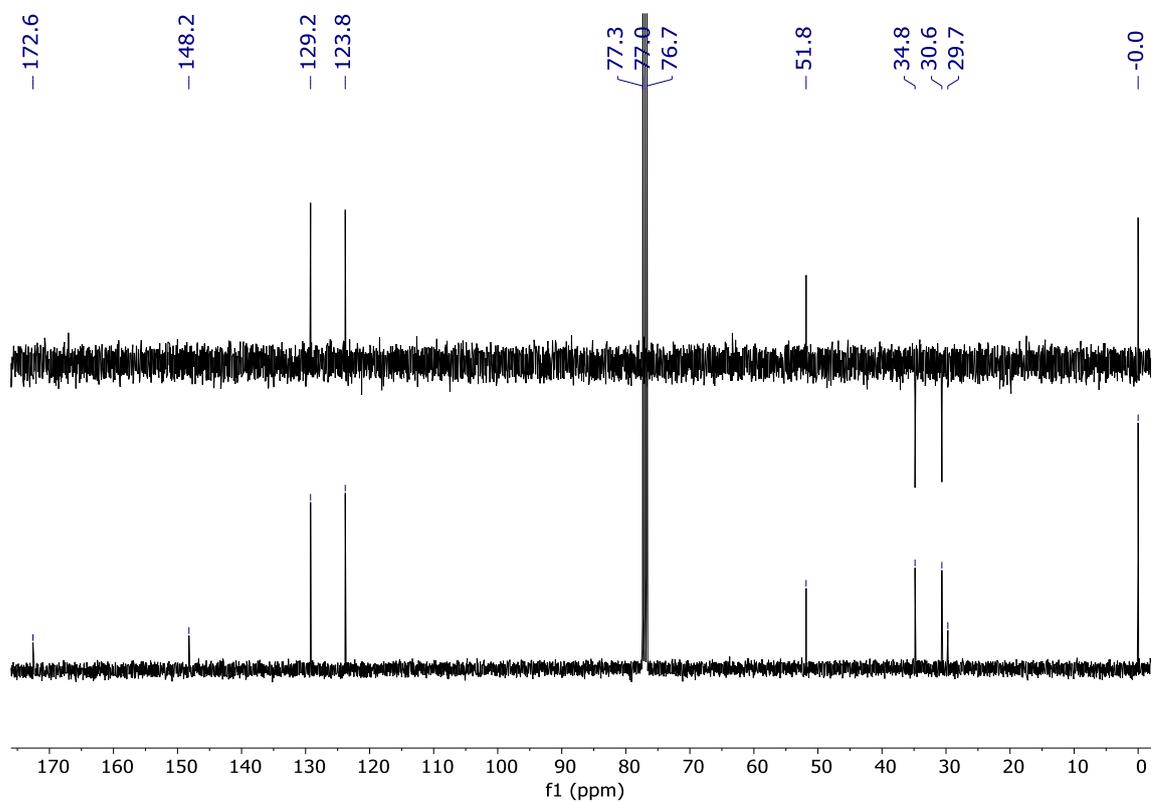


Figura S40. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) para o composto **3k**

APÊNDICE C - Espectros de RMN para os compostos 4a-4i

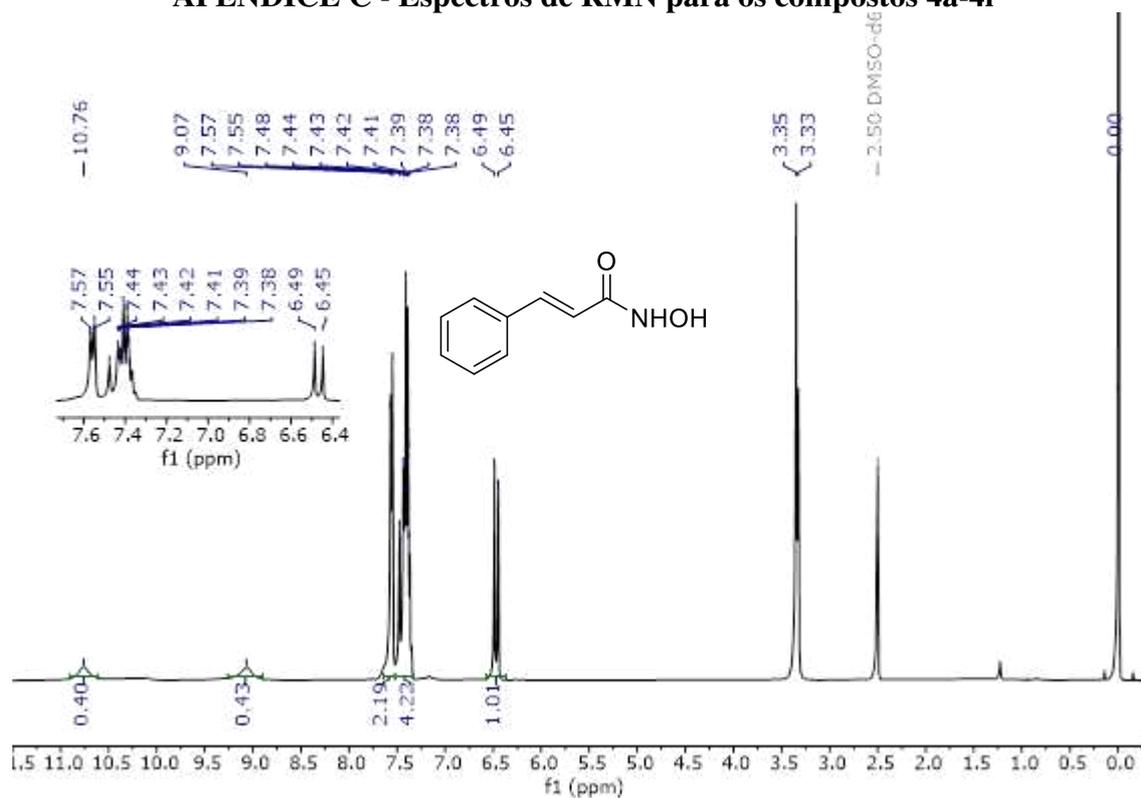


Figura S41. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto 4a

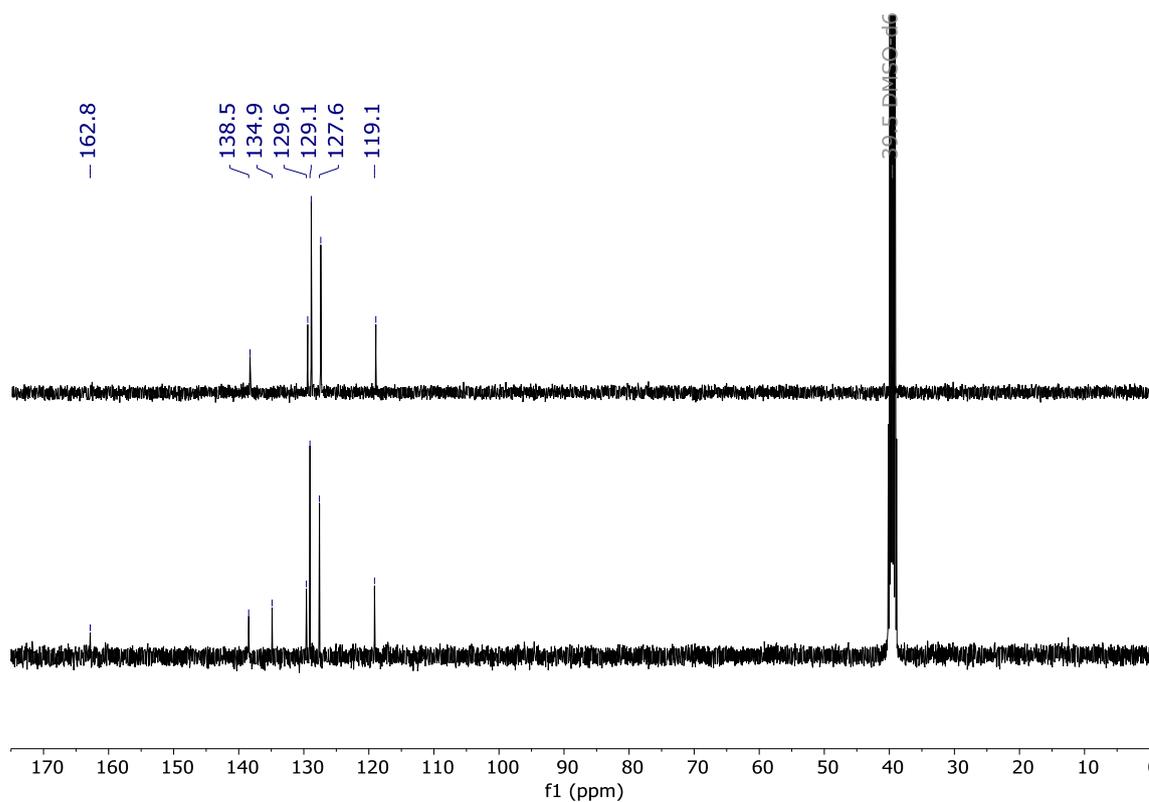


Figura S42. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o composto 4a

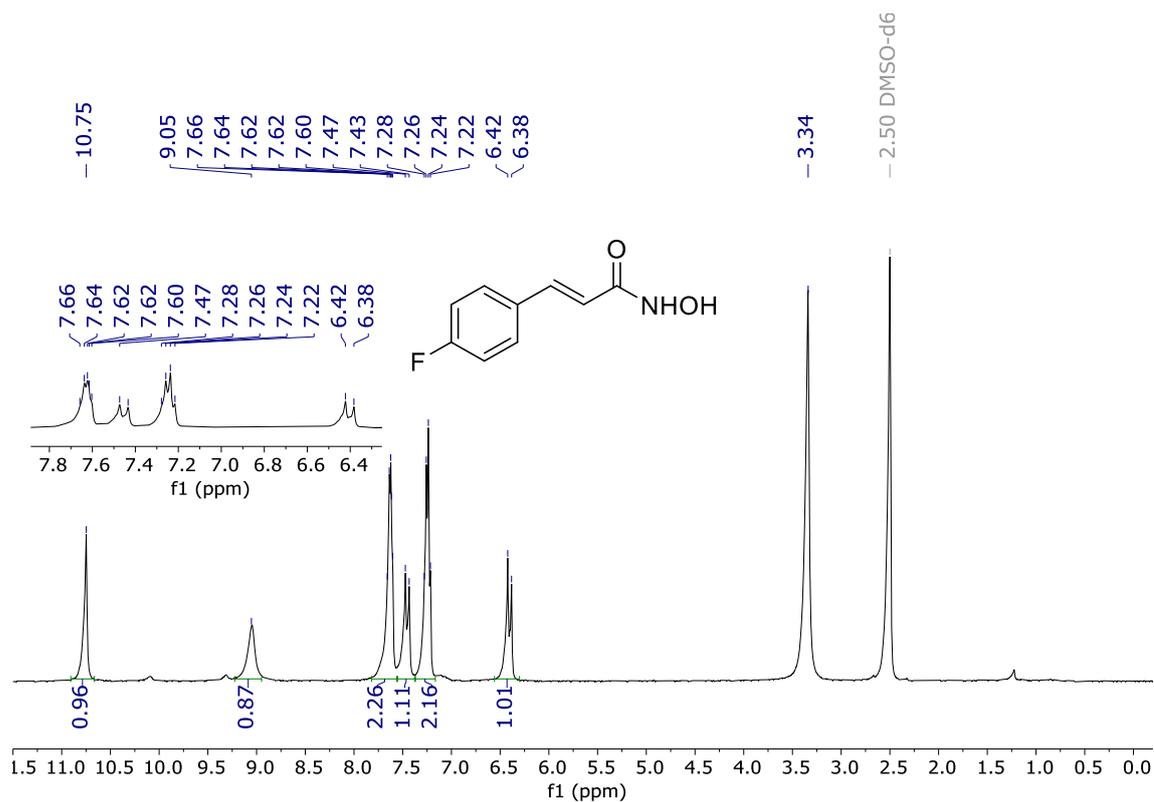


Figura S43. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **4b**

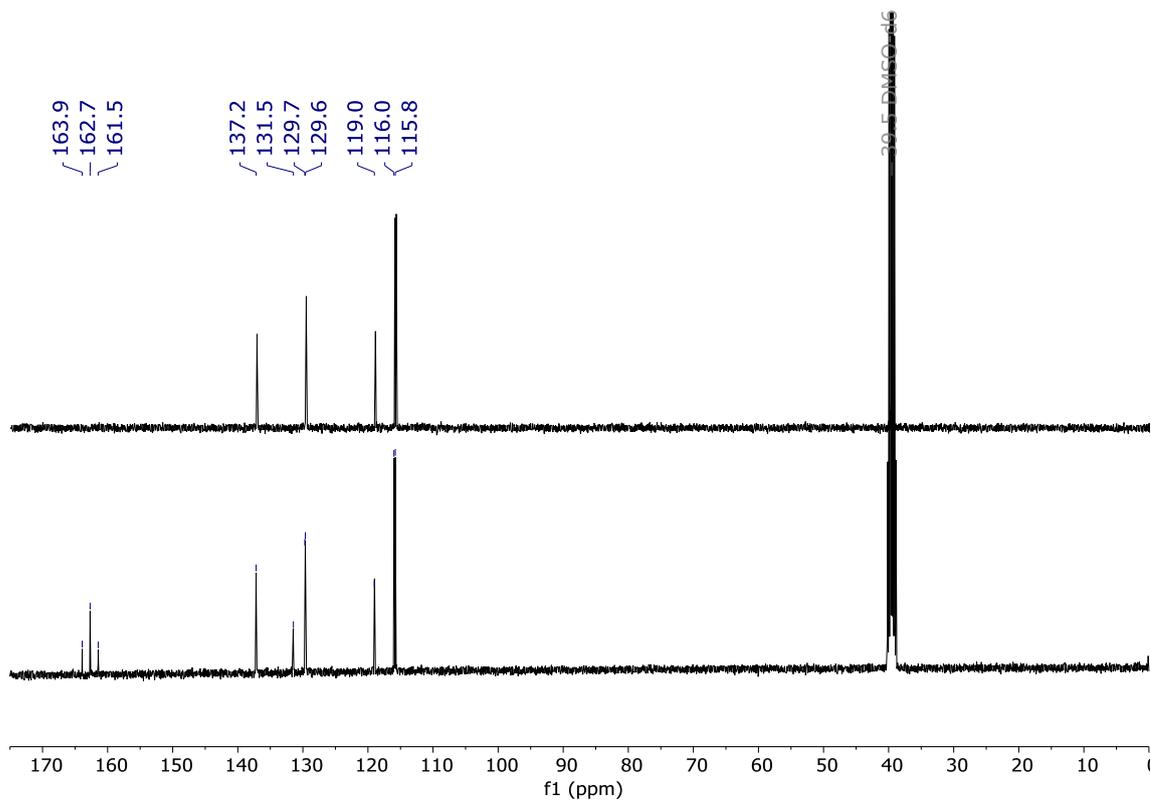


Figura S44. Espectros de RMN de ¹³C e DEPT-135 (100 MHz, DMSO-*d*₆) para o composto **4b**

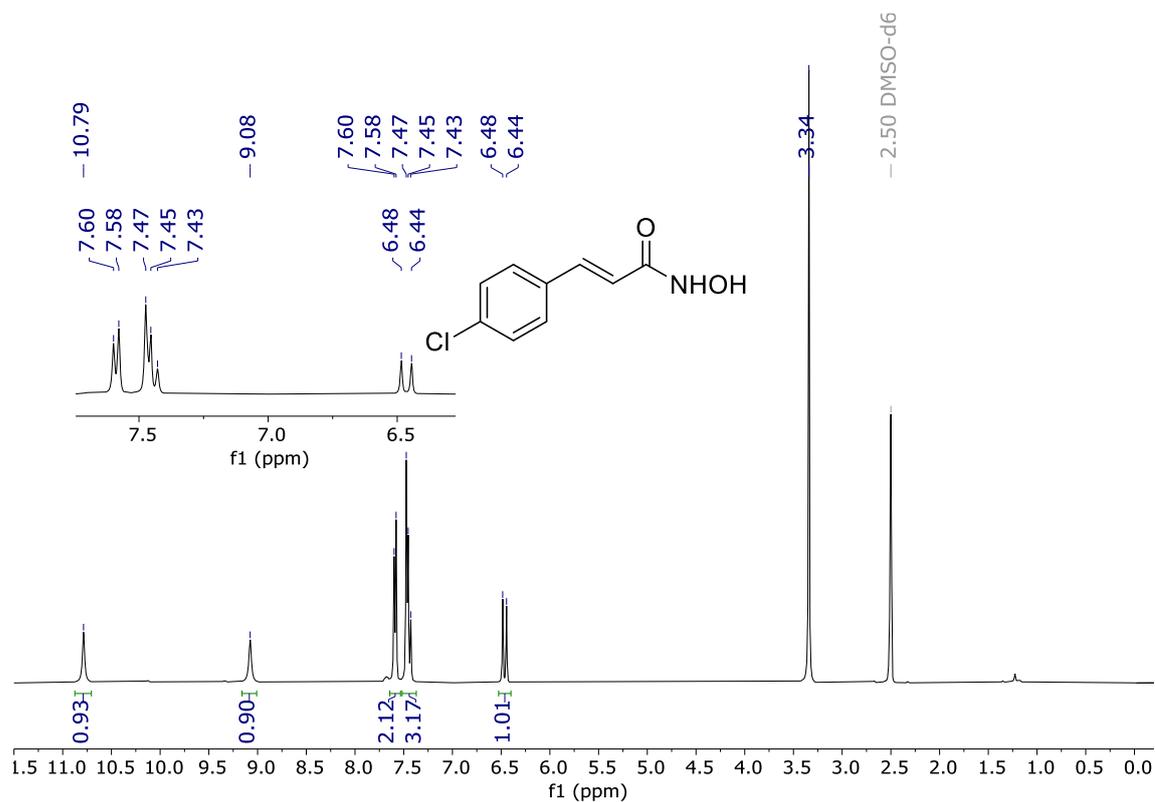


Figura S45. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **4c**

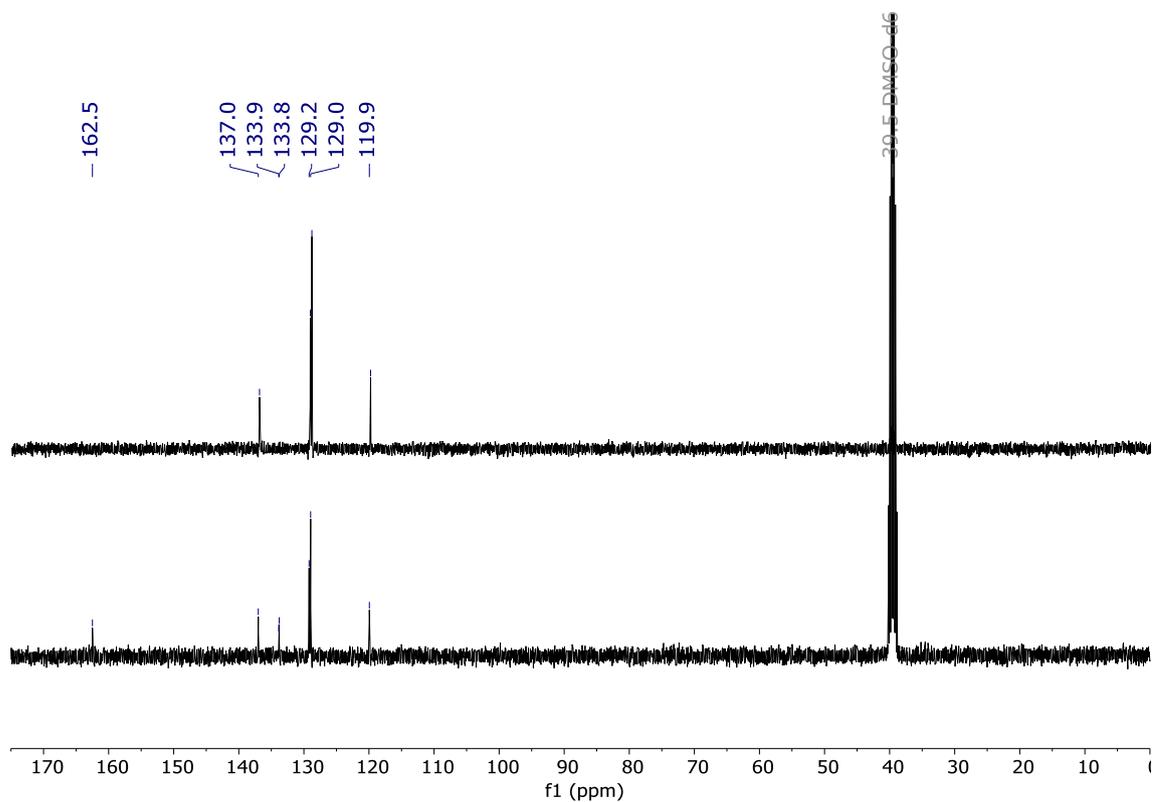


Figura S46. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o composto **4c**

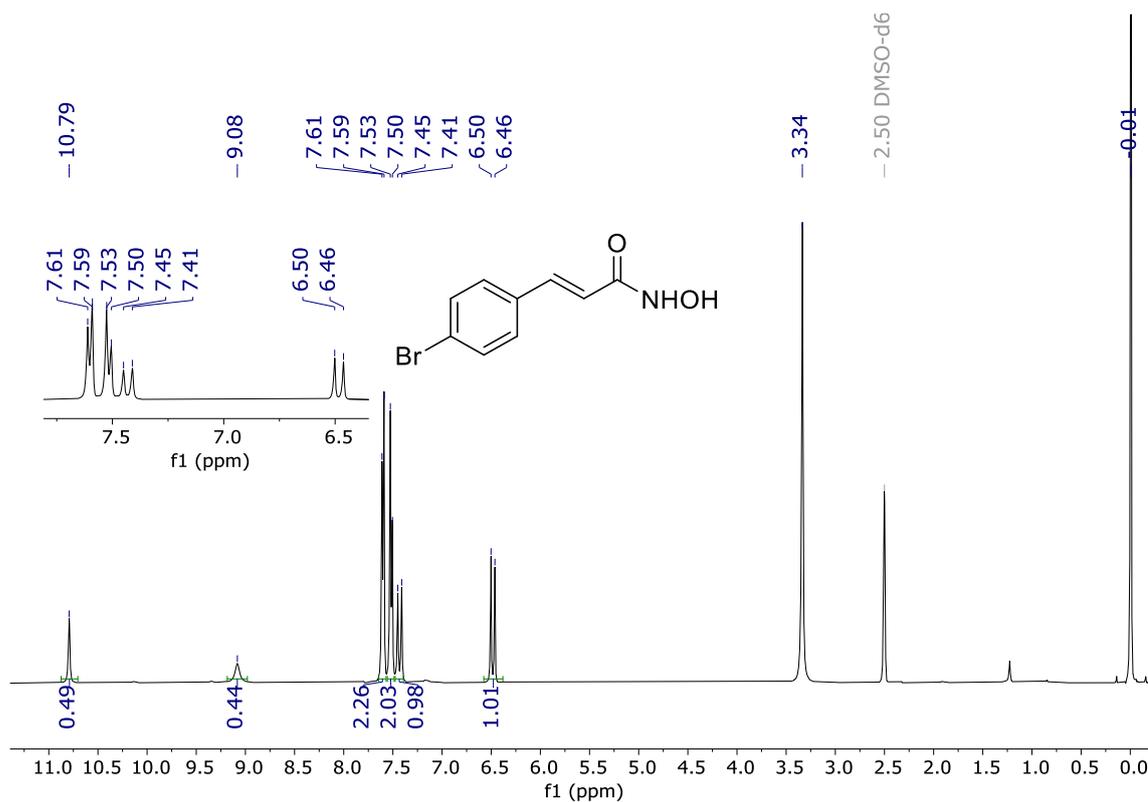


Figura S47. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **4d**

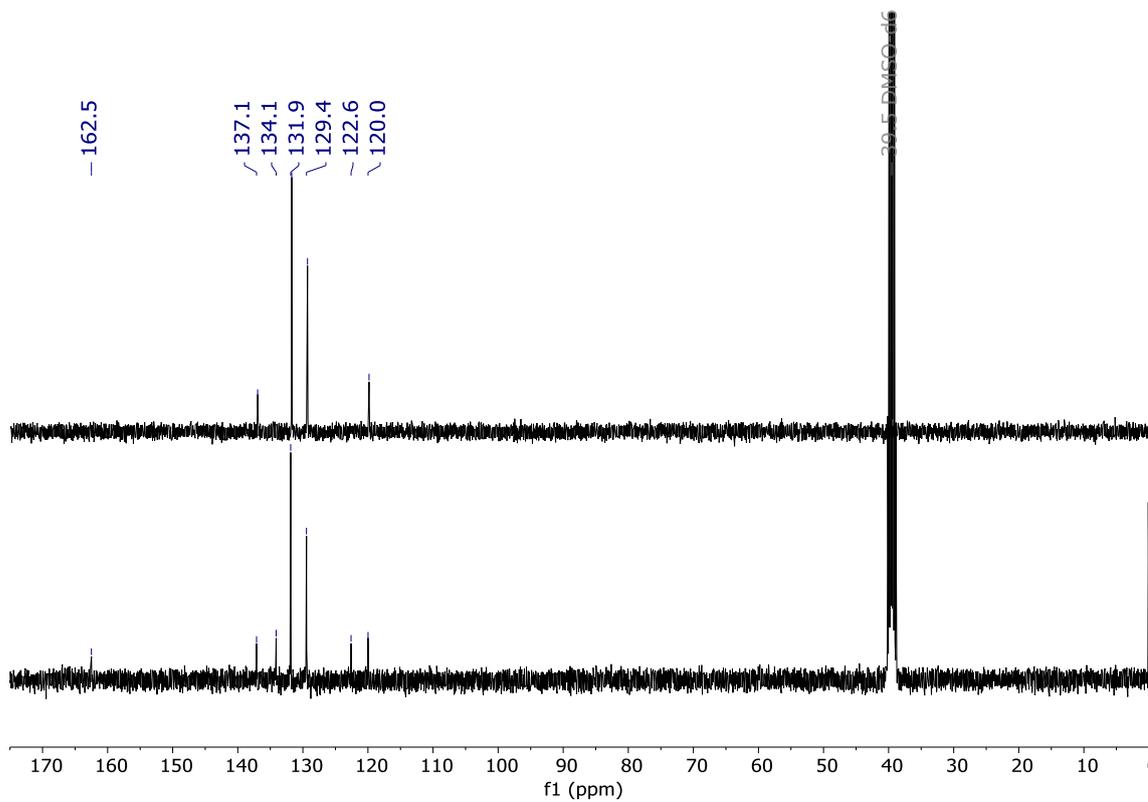
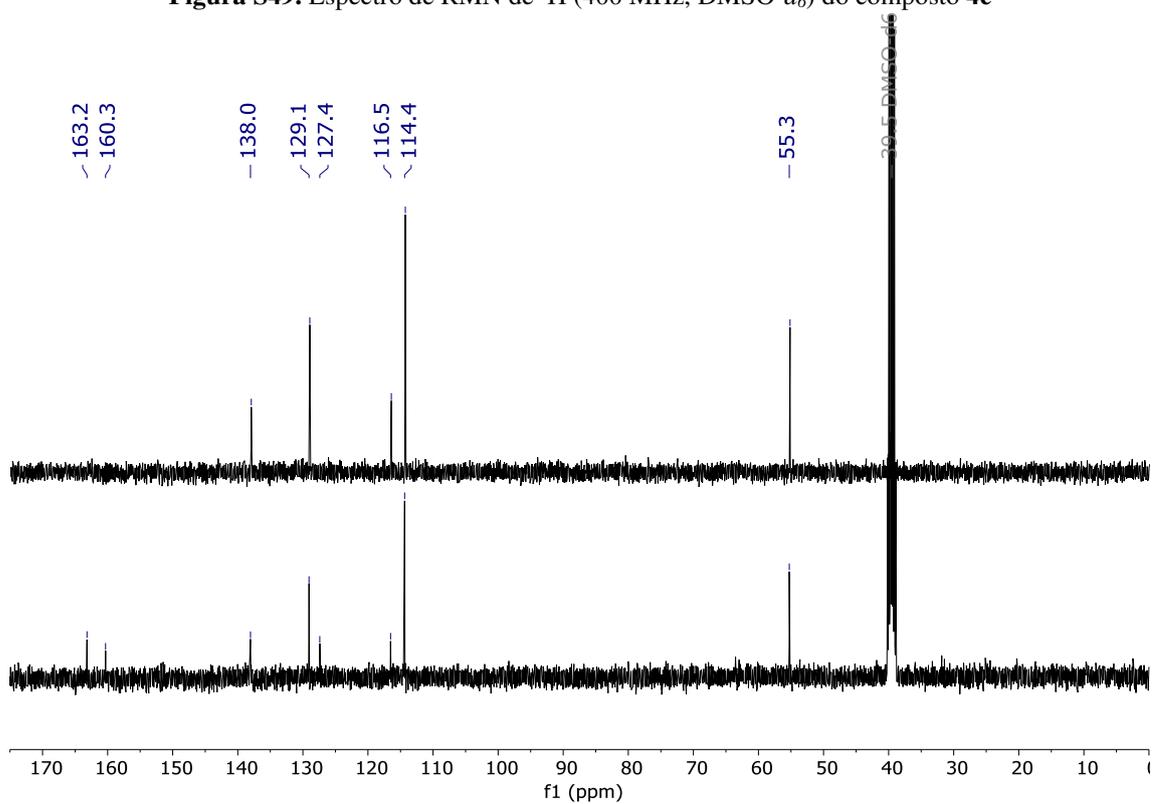
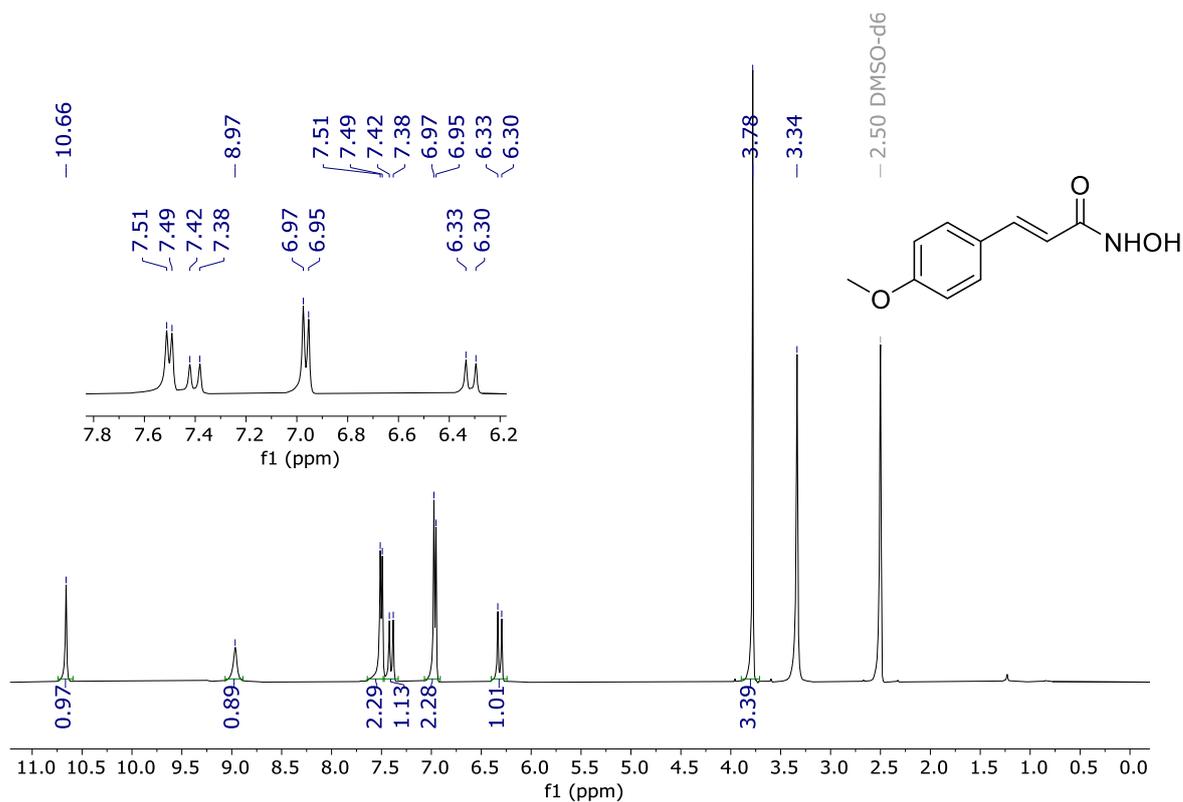


Figura S48. Espectros de RMN de ¹³C e DEPT-135 (100 MHz, DMSO-*d*₆) para o composto **4d**



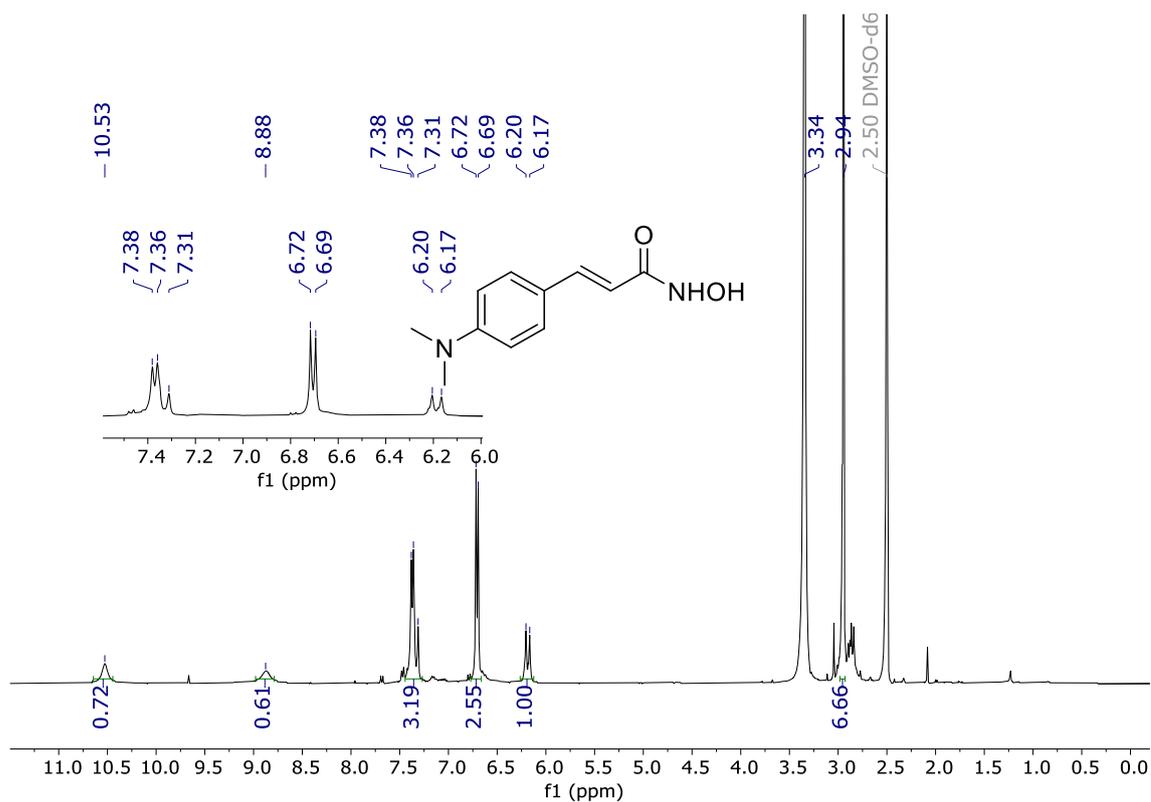


Figura S51. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **4f**

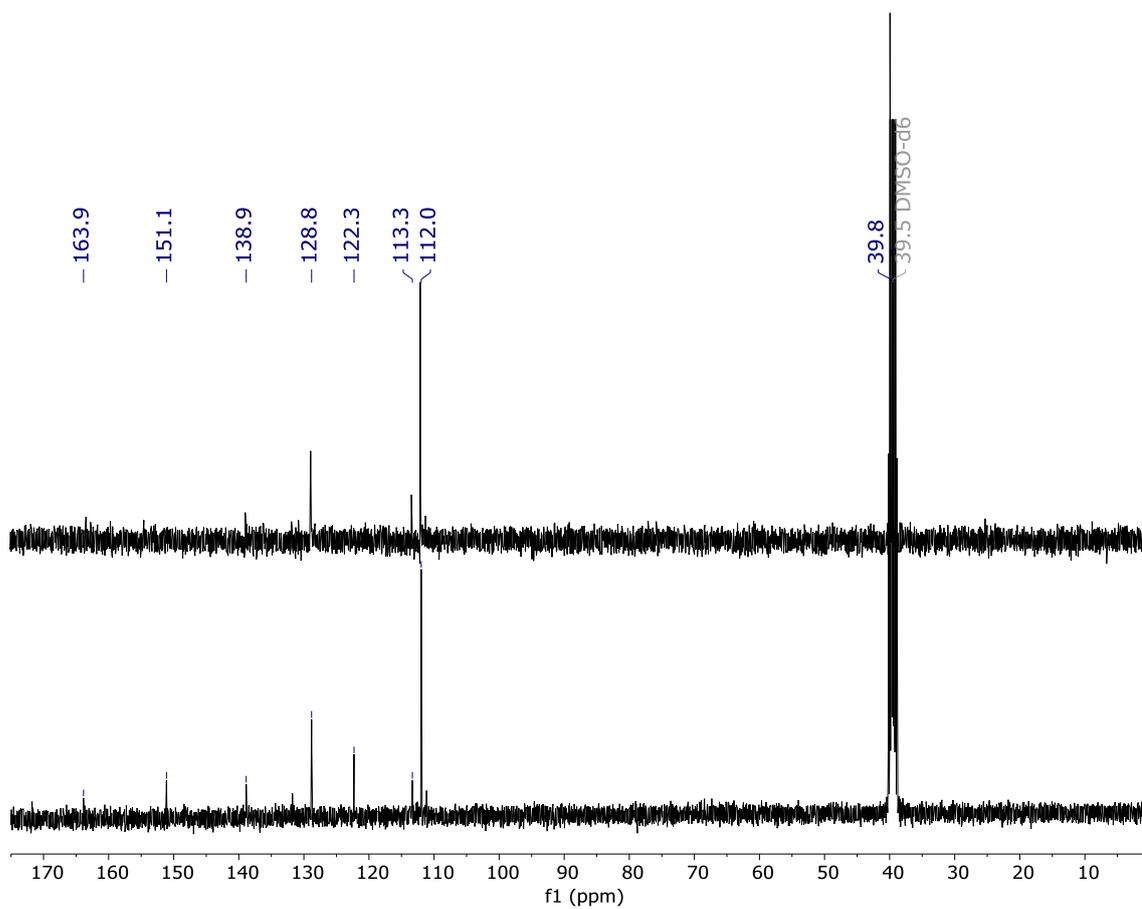


Figura S52. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o composto **4f**

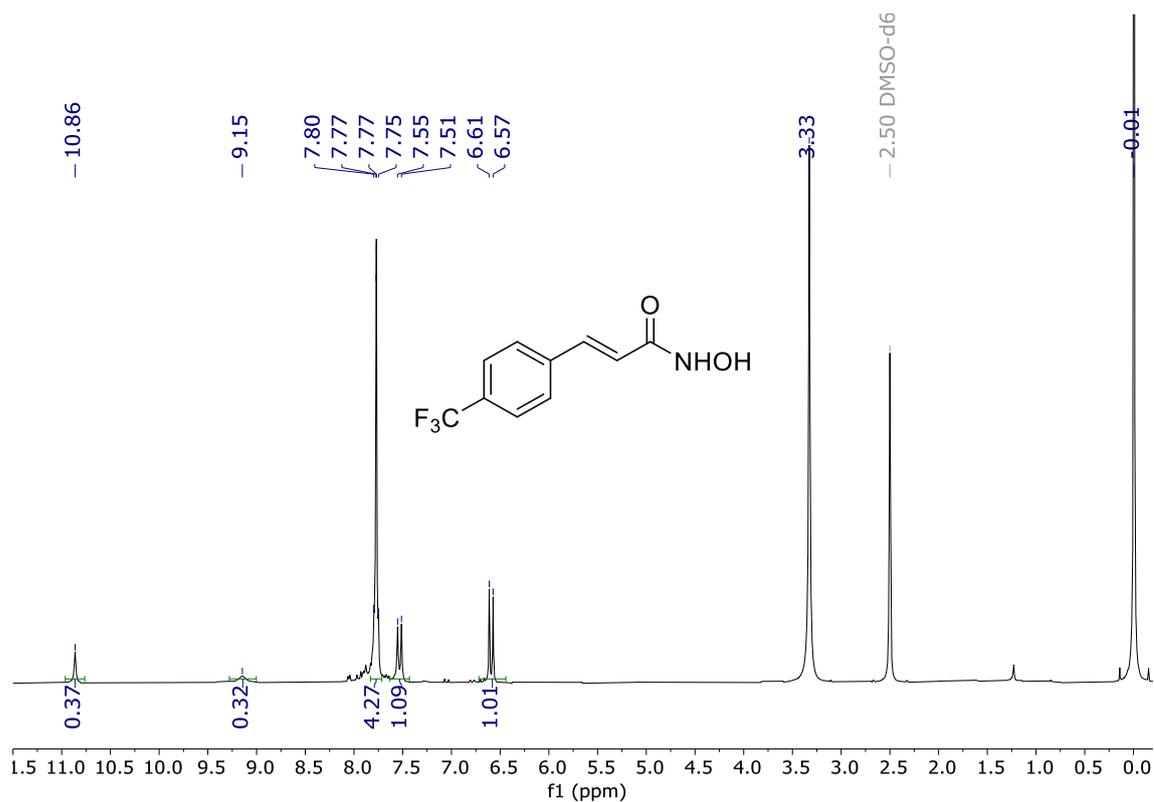


Figura S53. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **4g**

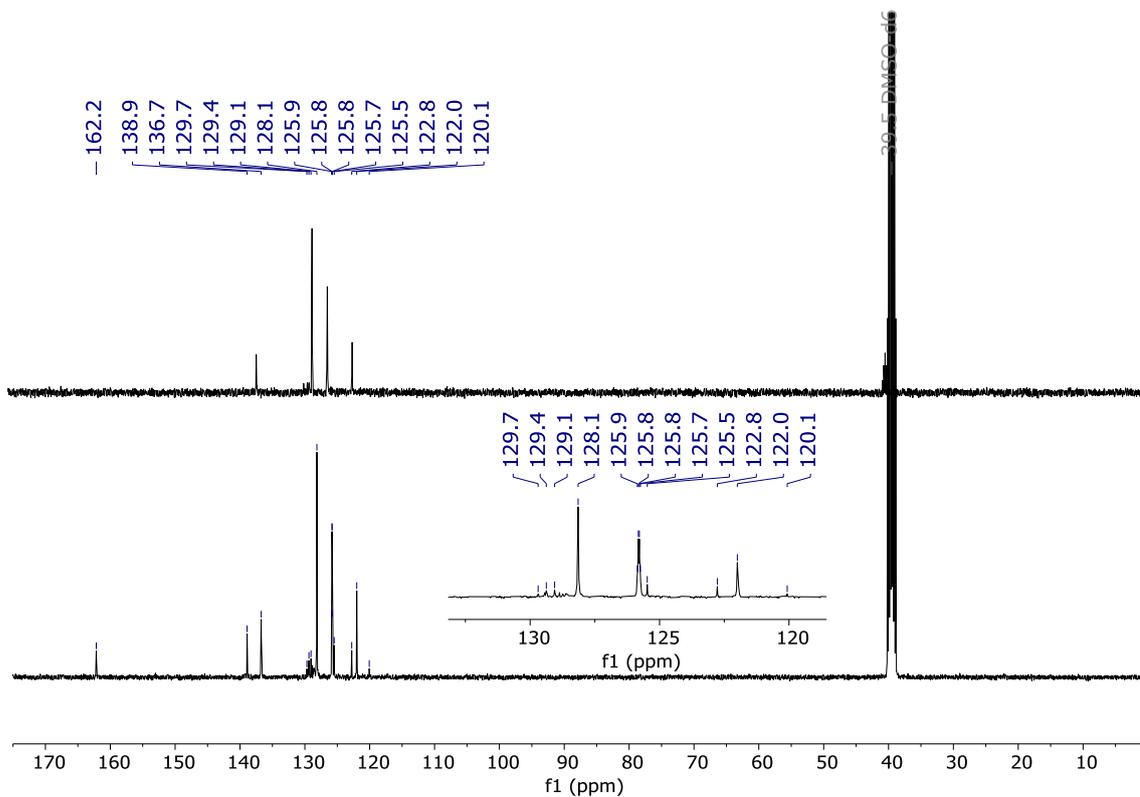
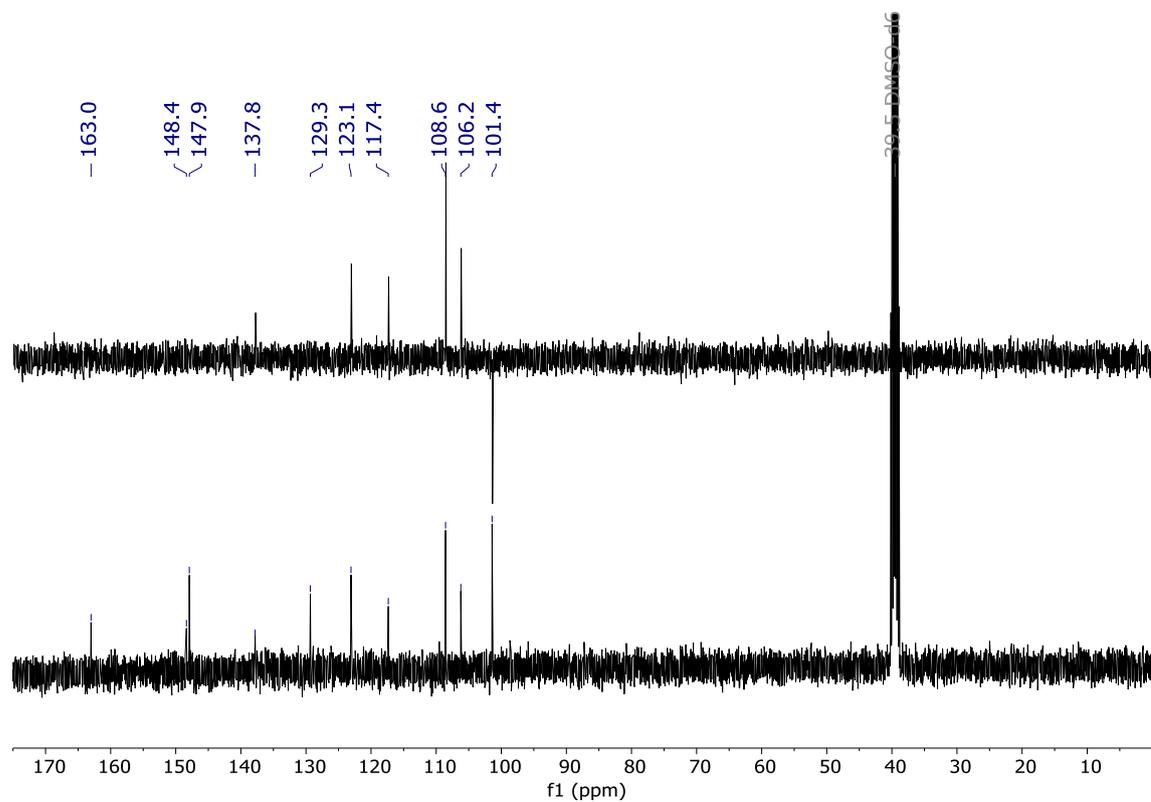
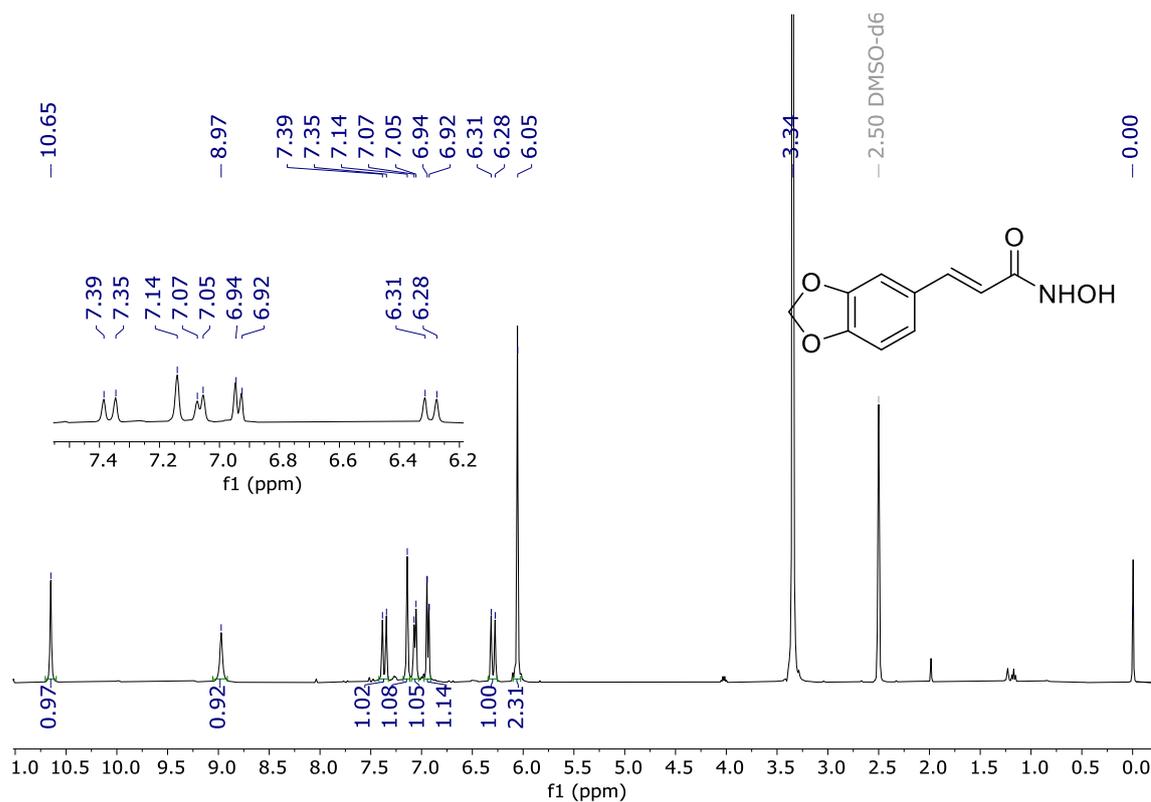


Figura S54. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o composto **4g**



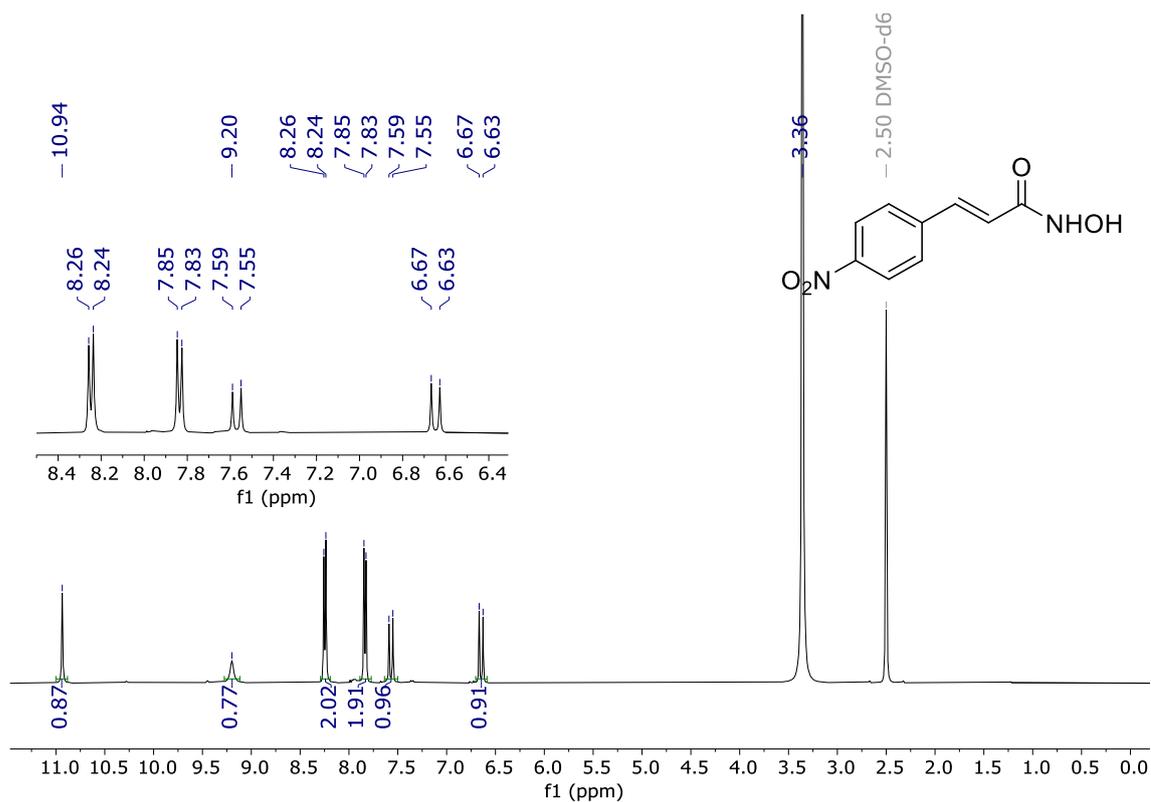


Figura S57. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **4i**

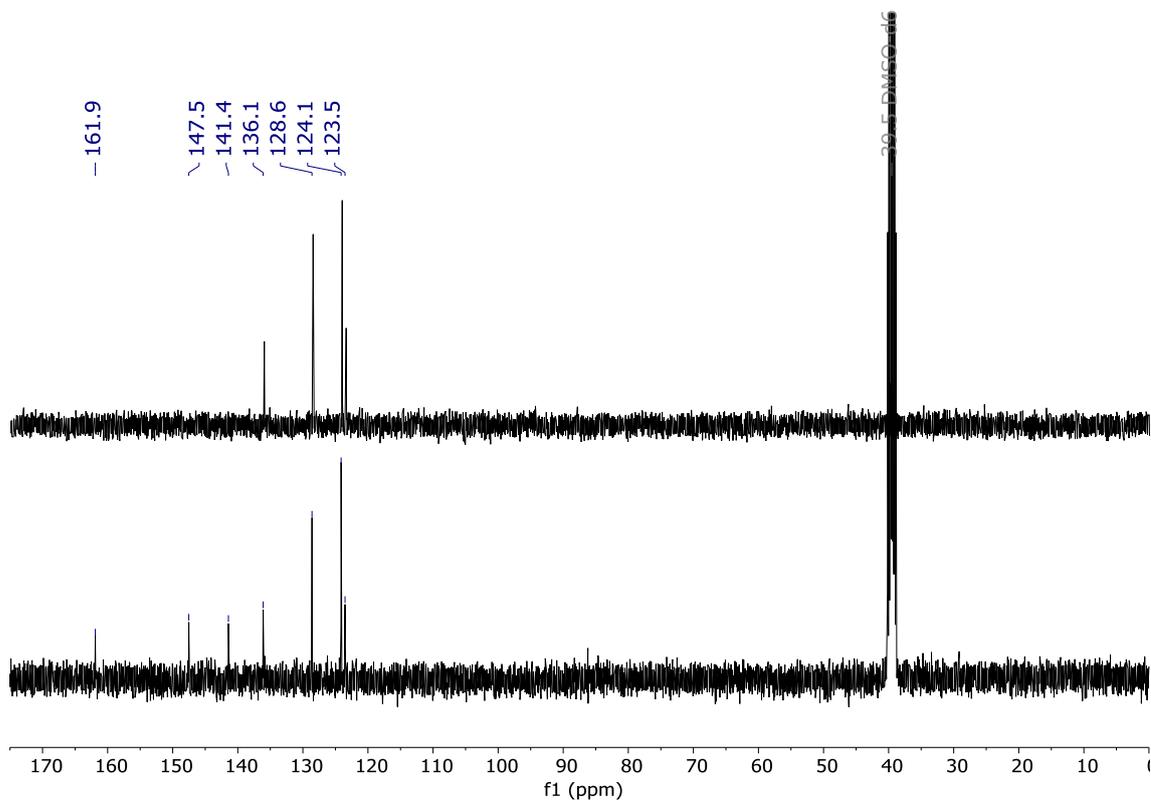
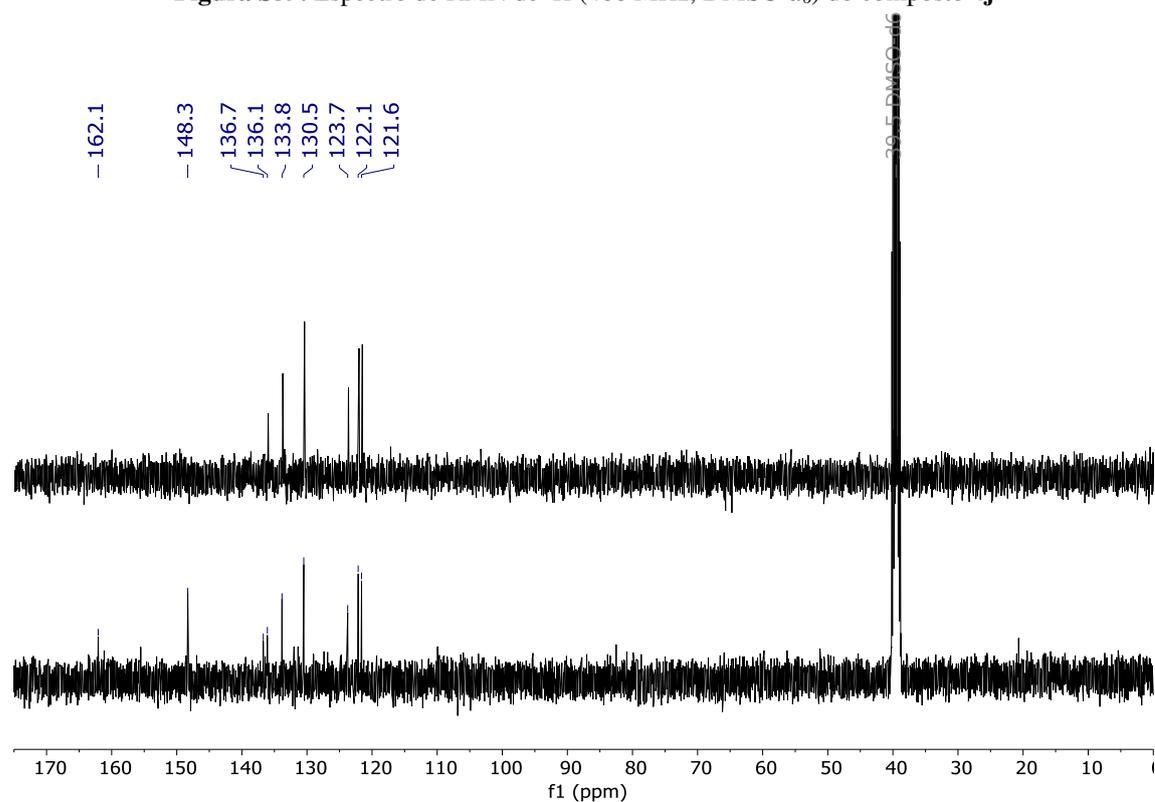
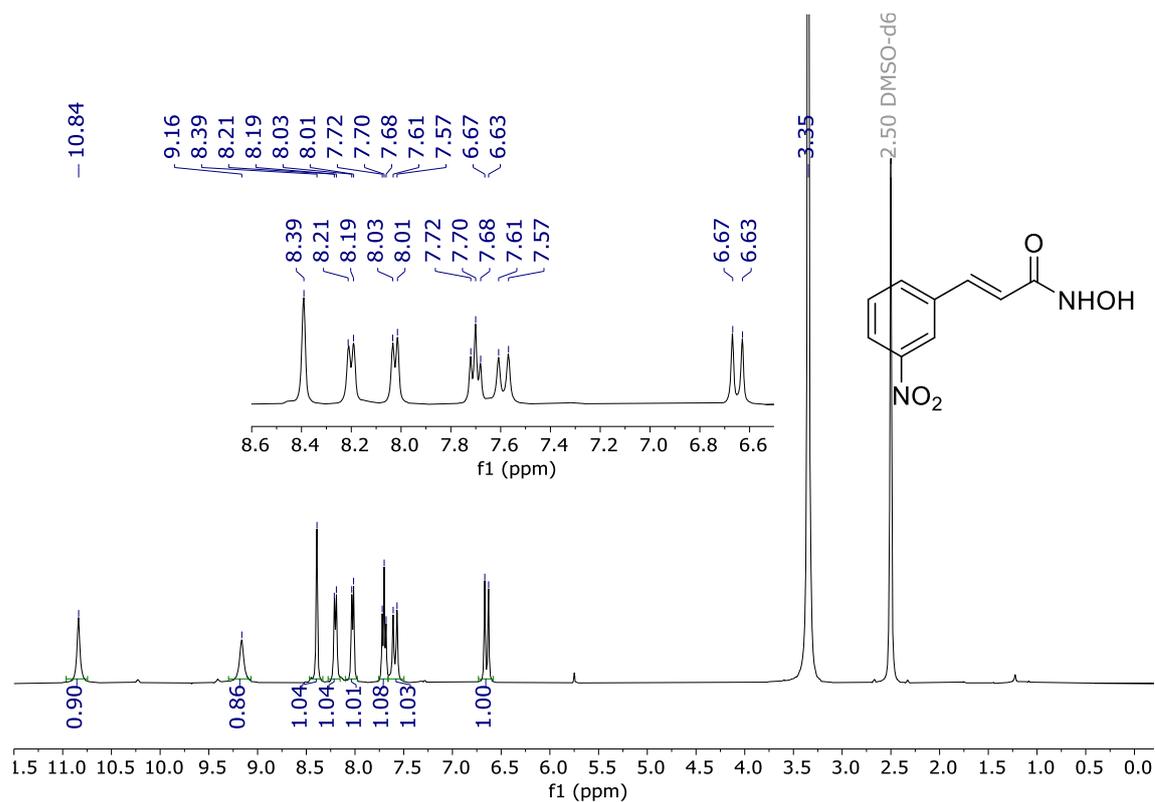


Figura S58. Espectros de RMN de ¹³C e DEPT-135 (100 MHz, DMSO-*d*₆) para o composto **4i**



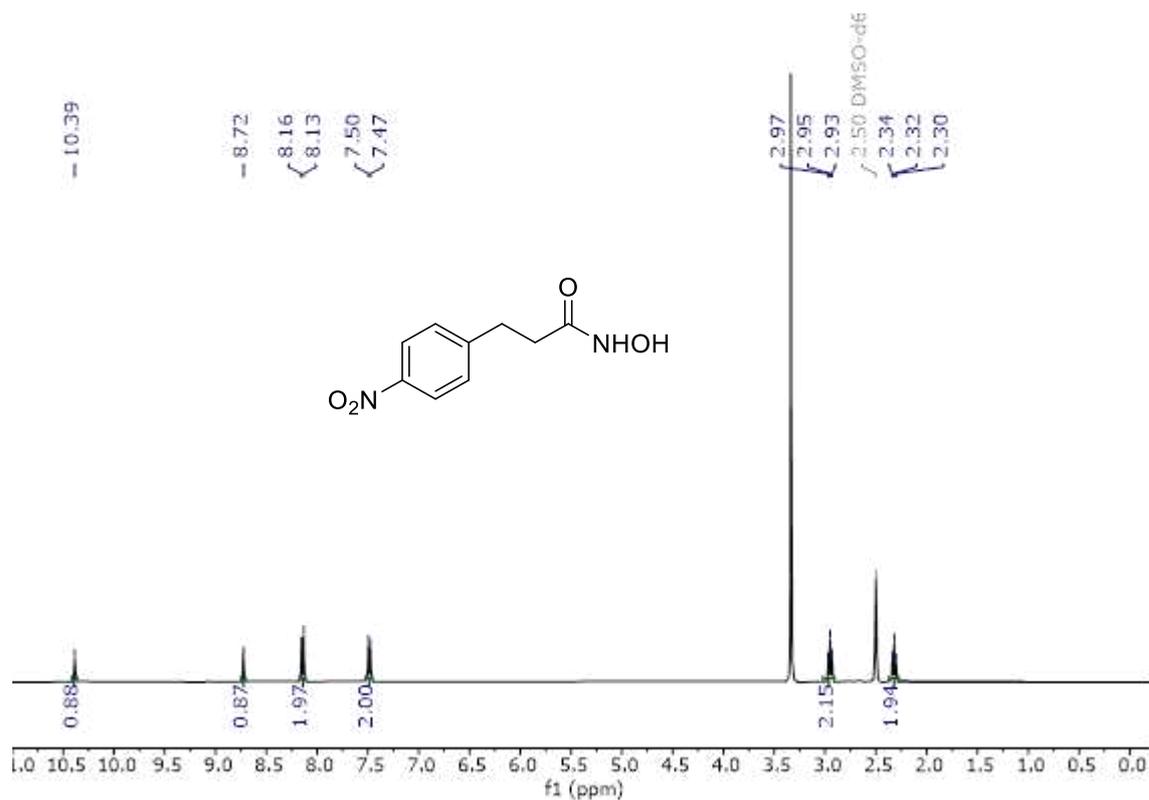


Figura S61. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto 4k

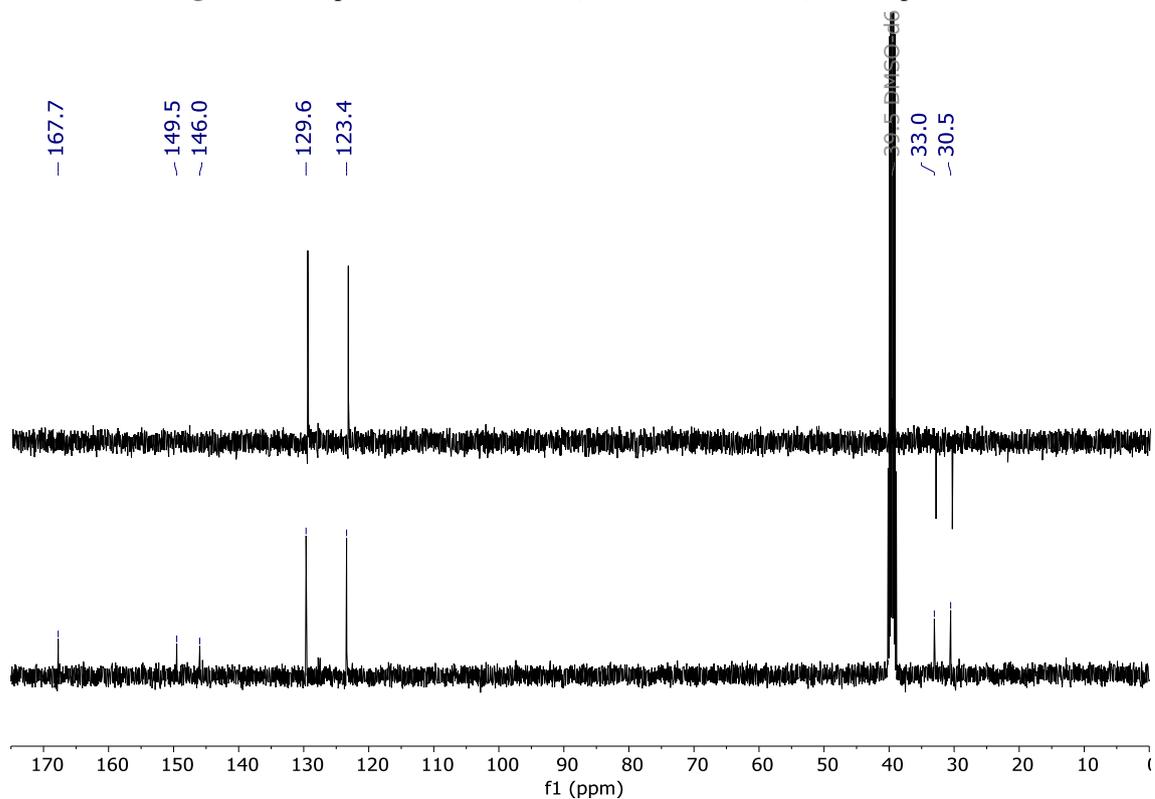


Figura S62. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o composto 4k

APÊNDICE D - Espectros na região do infravermelho para os compostos 2a-2k

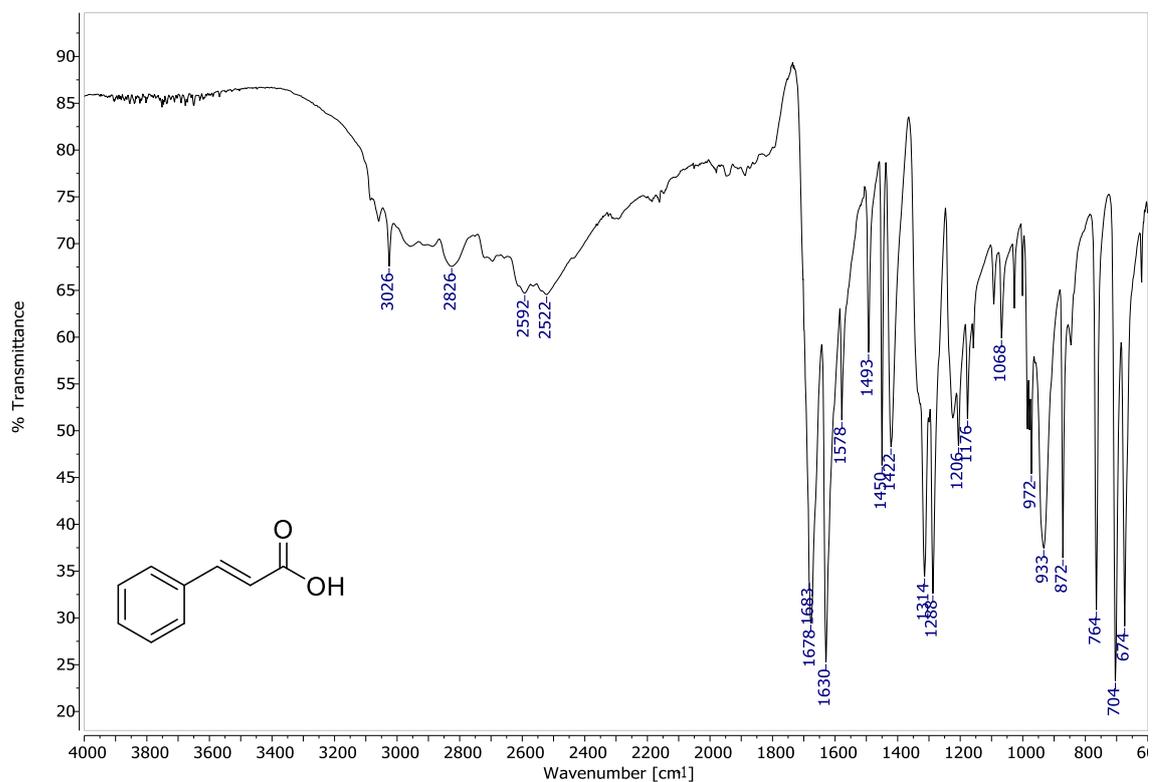


Figura S63. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto 2a

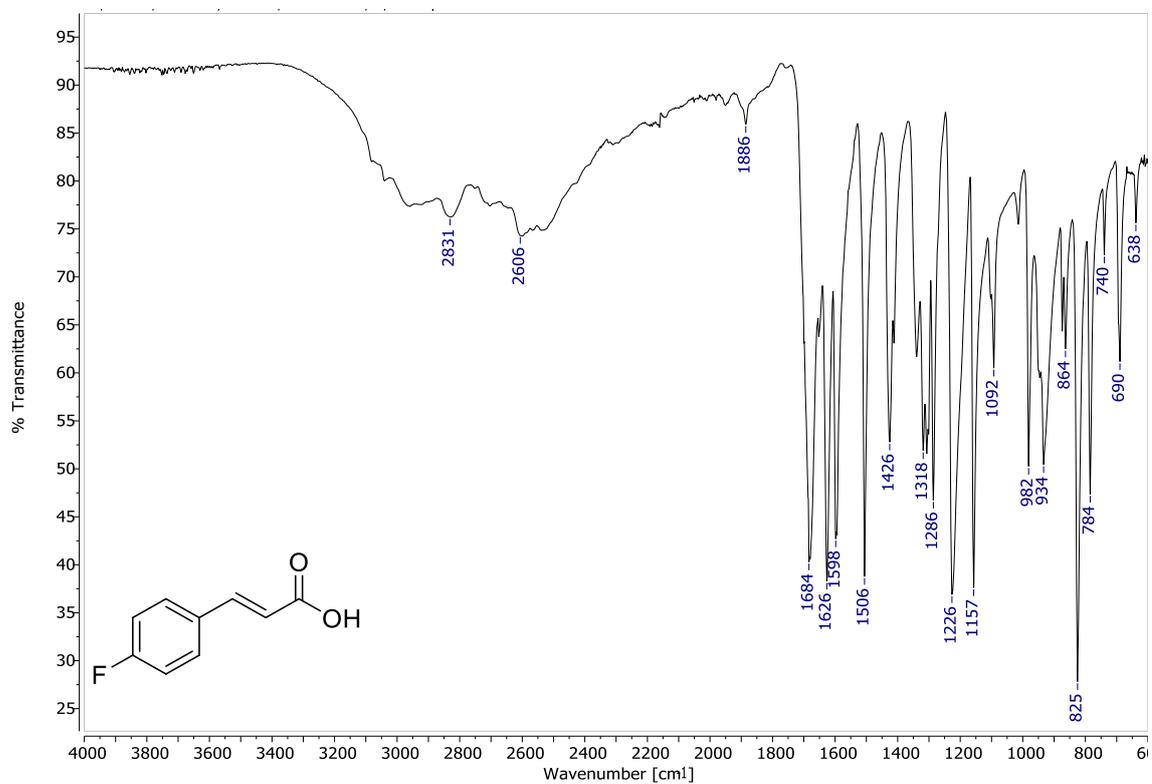


Figura S64. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto 2b

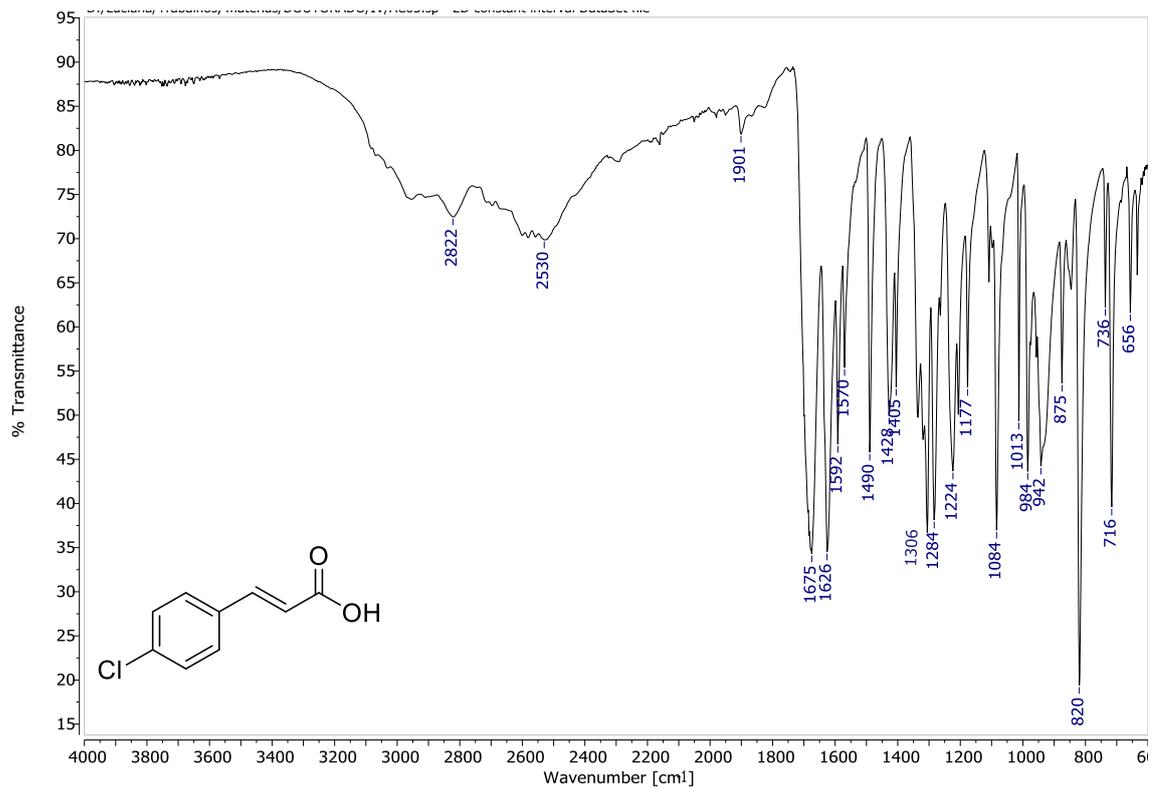


Figura S65. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto 2c

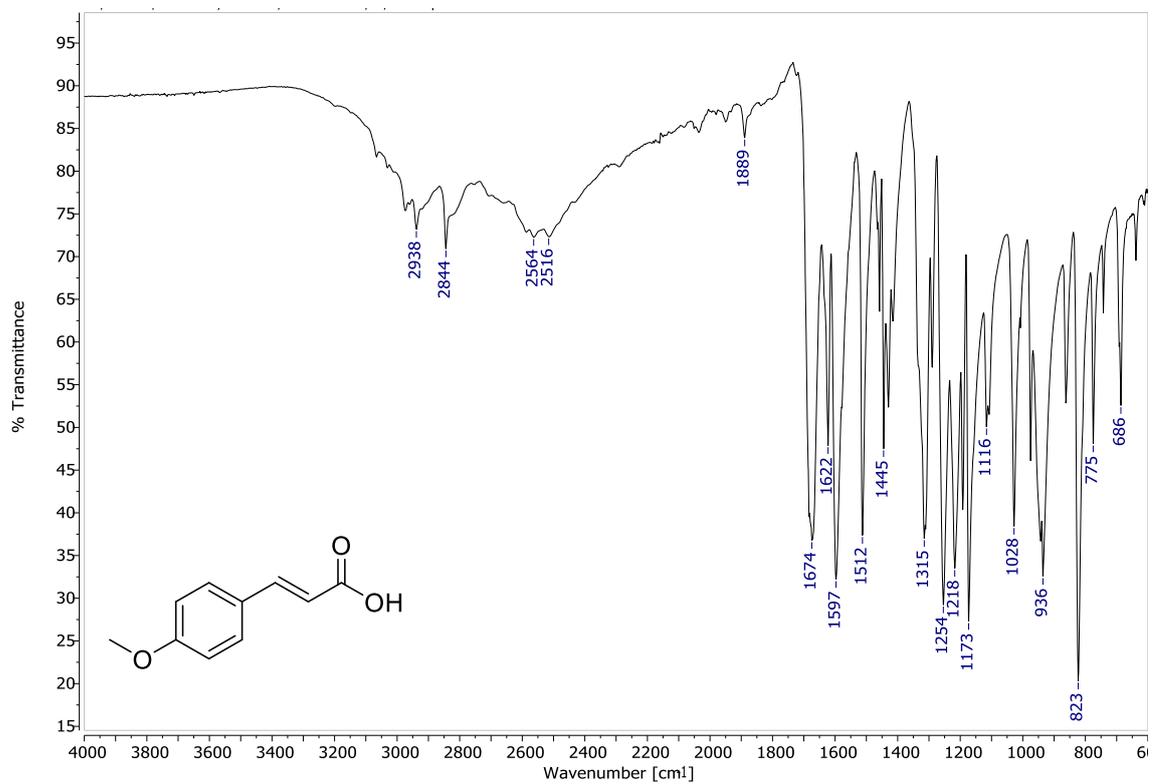


Figura S66. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto 2e

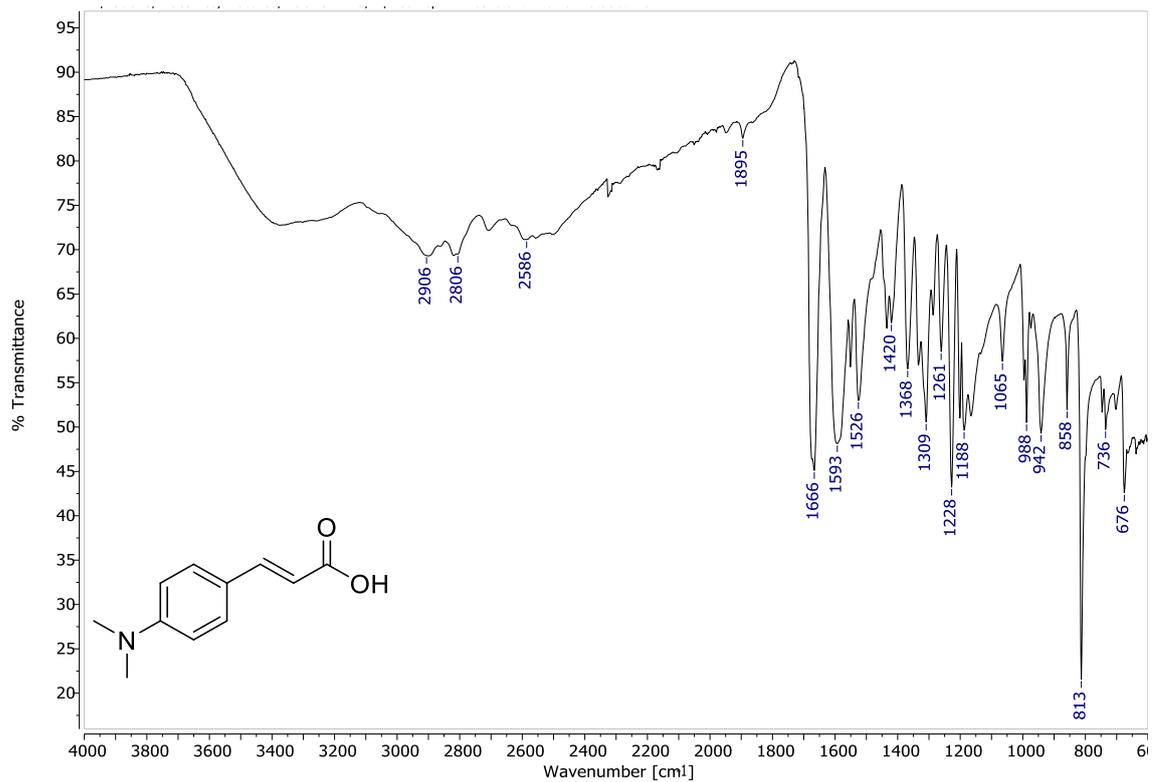


Figura S67. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto **2f**

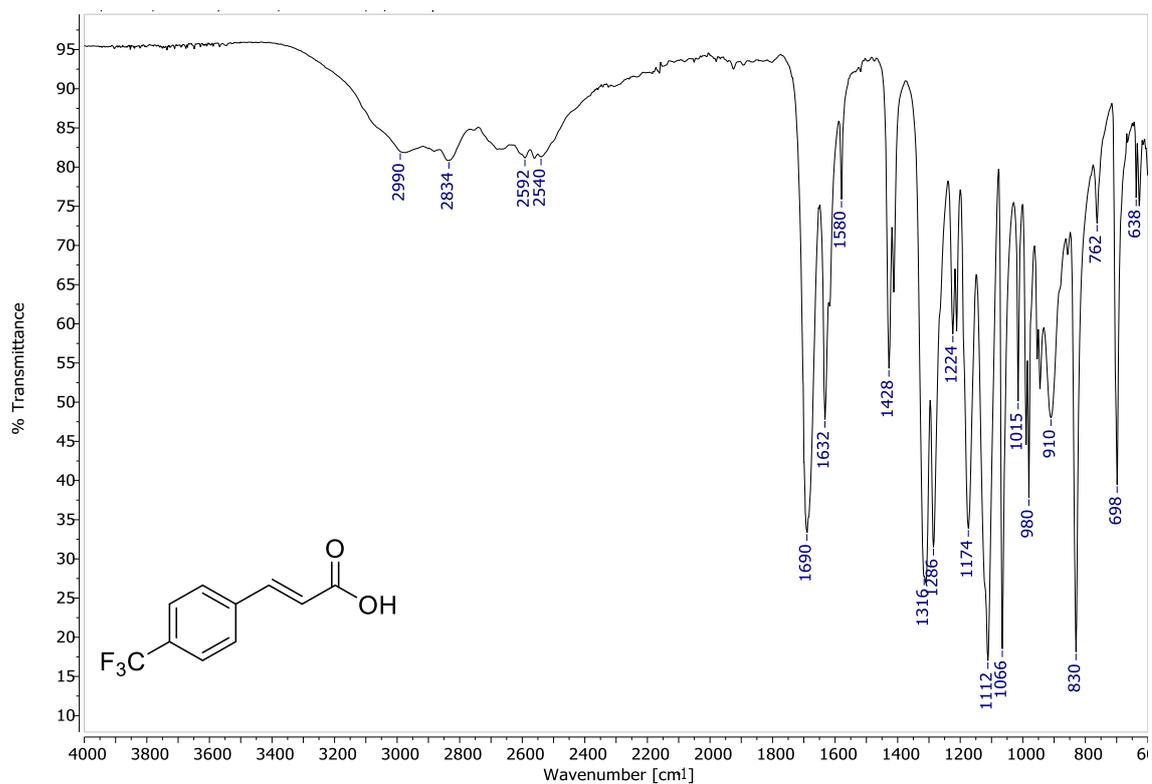


Figura S68. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto **2g**

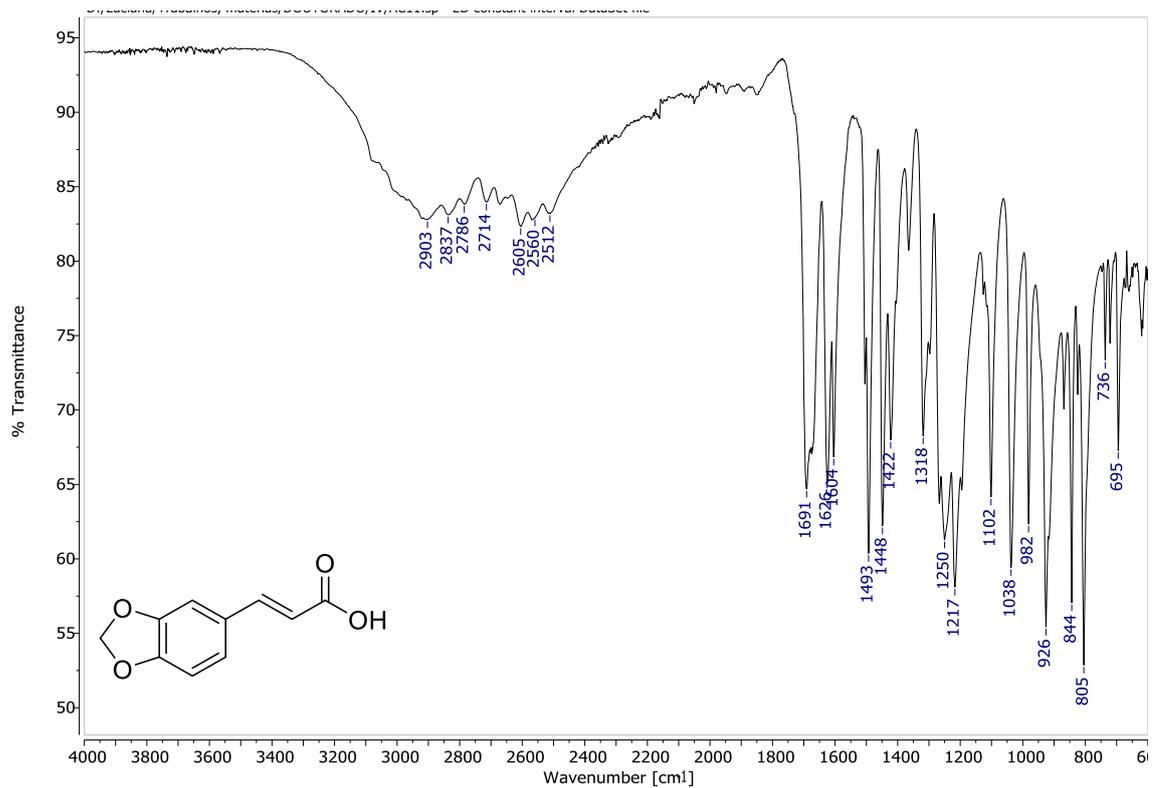


Figura S69. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto **2h**

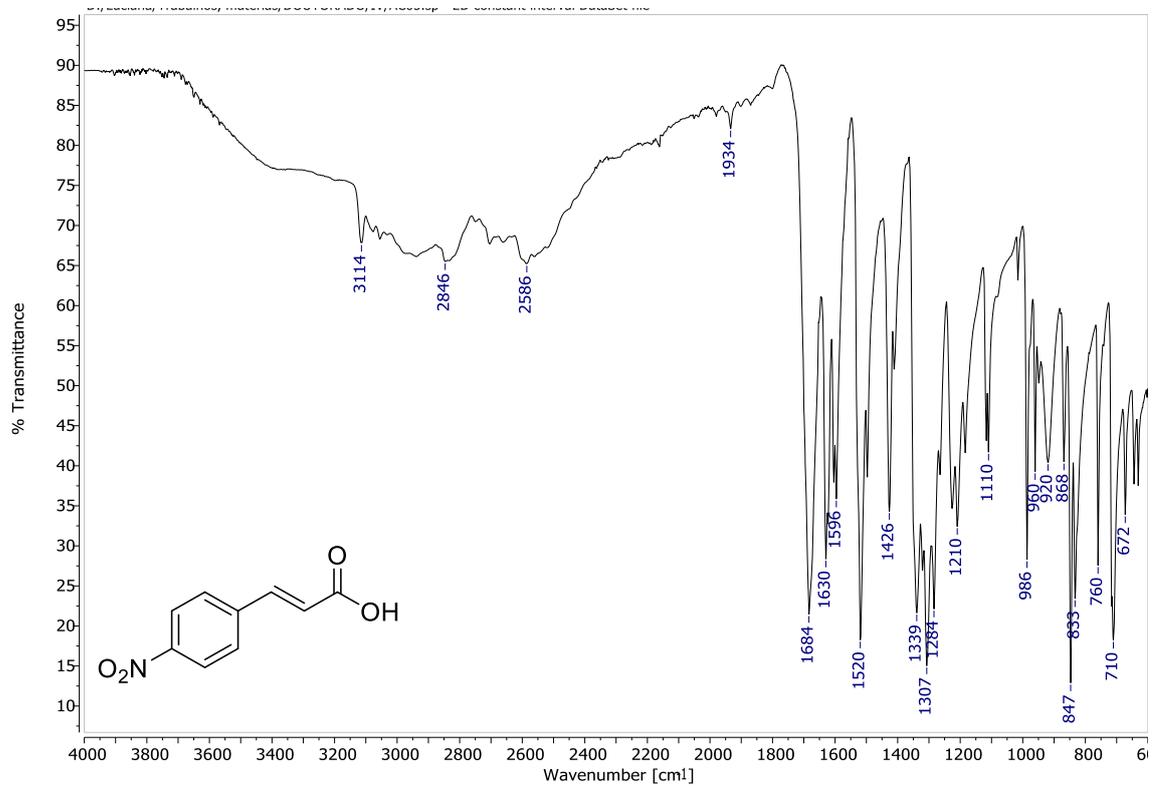


Figura S70. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto **2i**

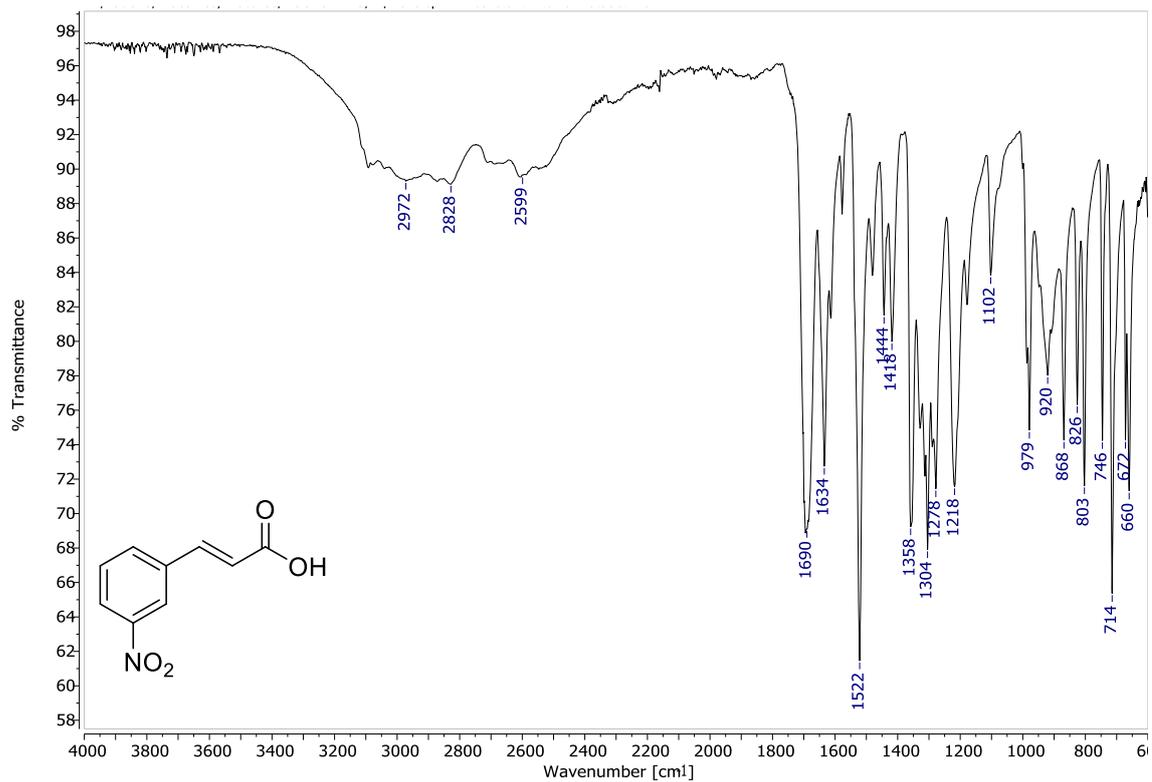


Figura S71. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto **2j**

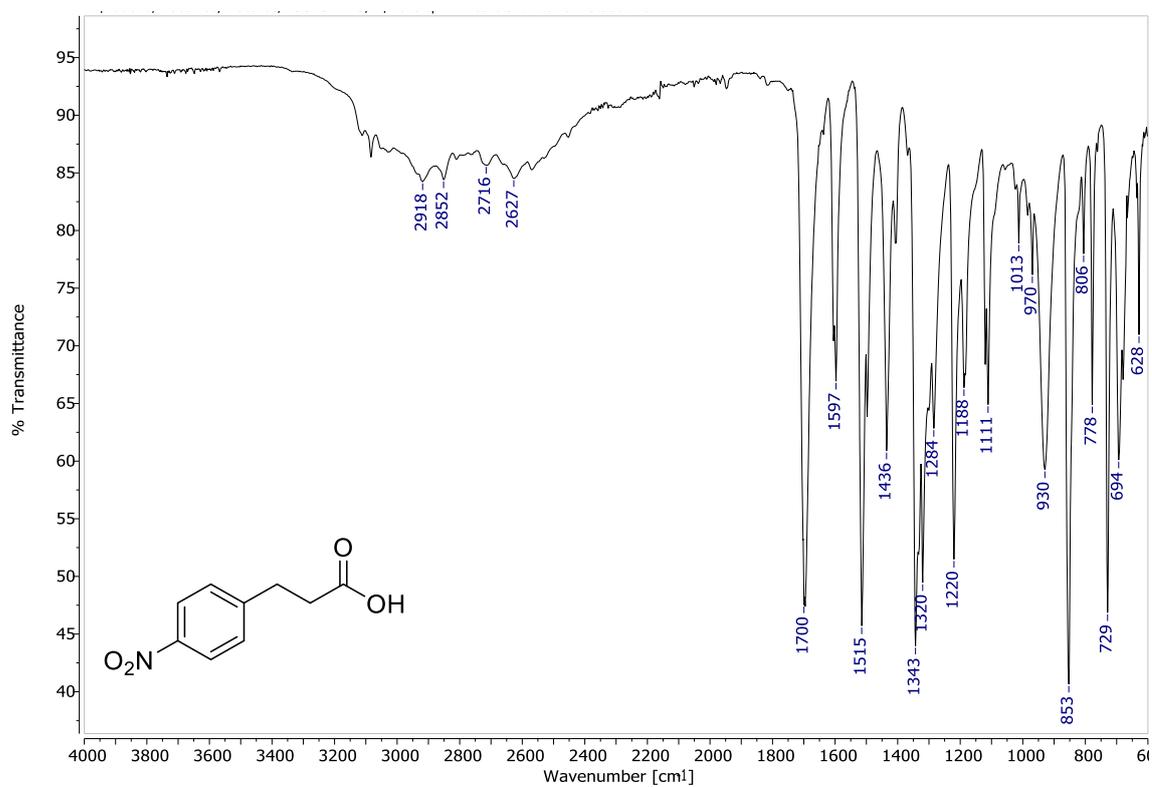


Figura S72. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto **2k**

APÊNDICE E - Espectros na região do infravermelho para os compostos 3a-3k

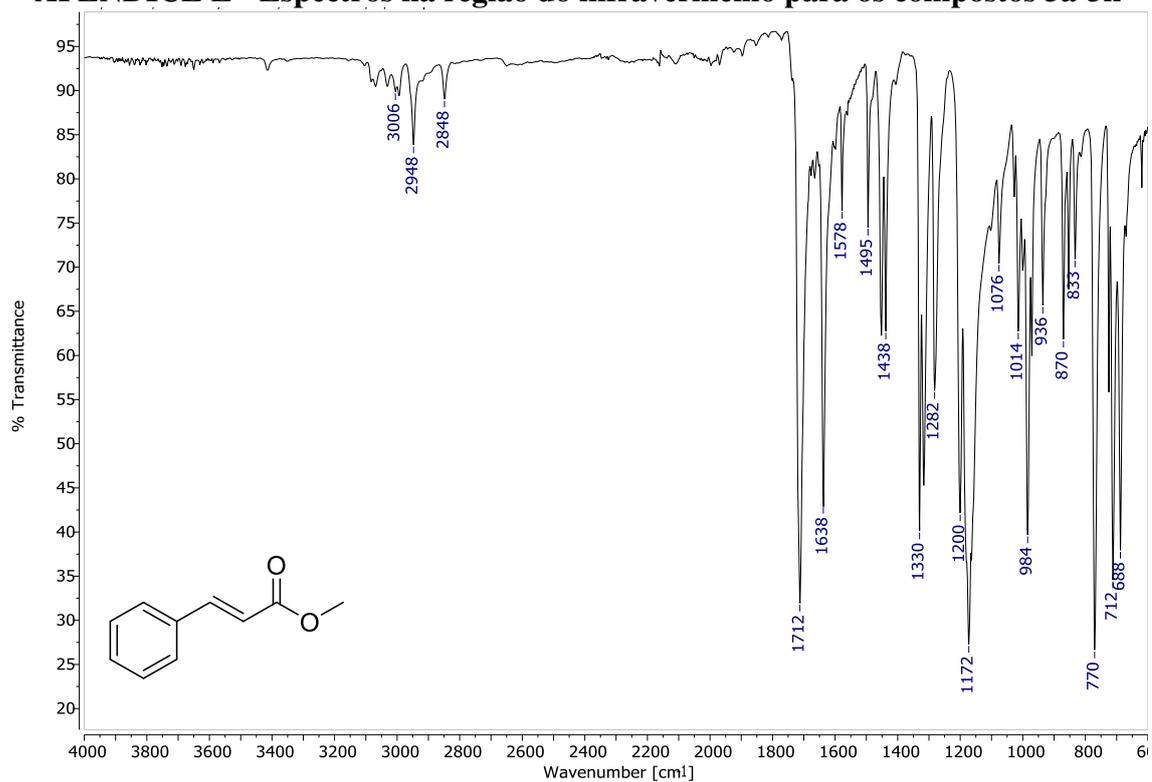


Figura S73. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto 3a

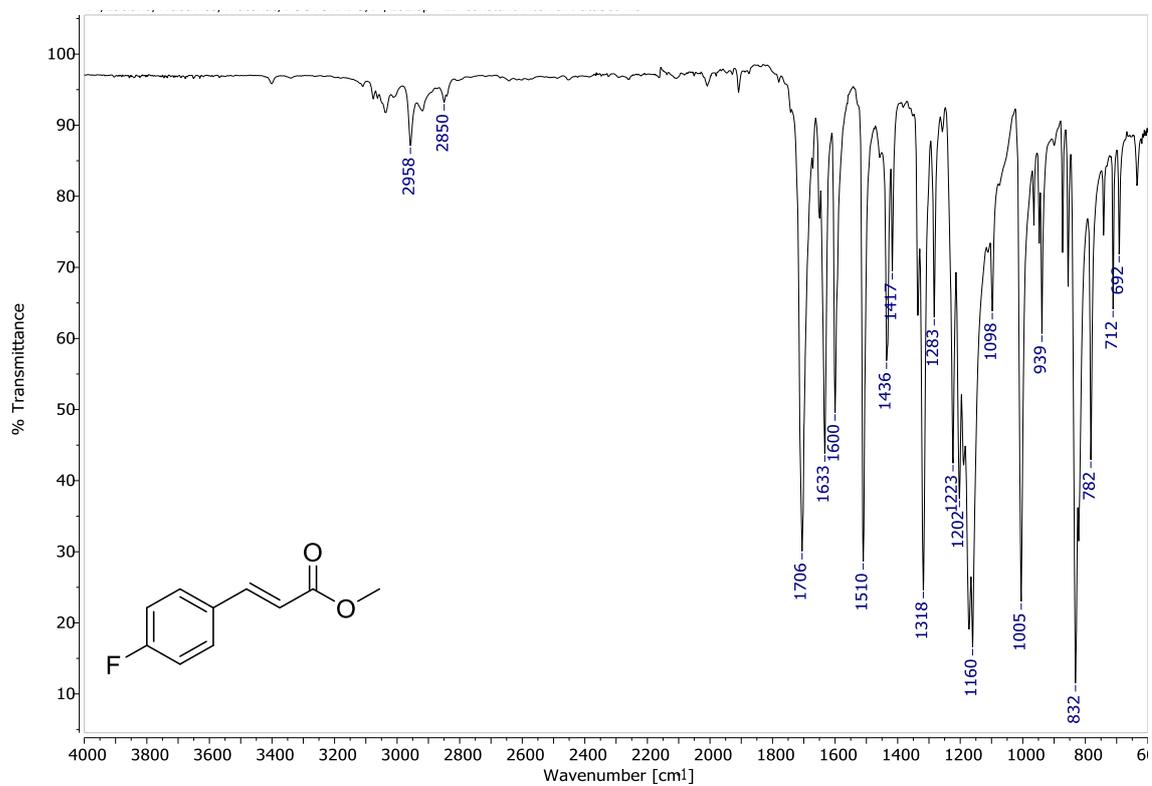


Figura S74. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto 3b

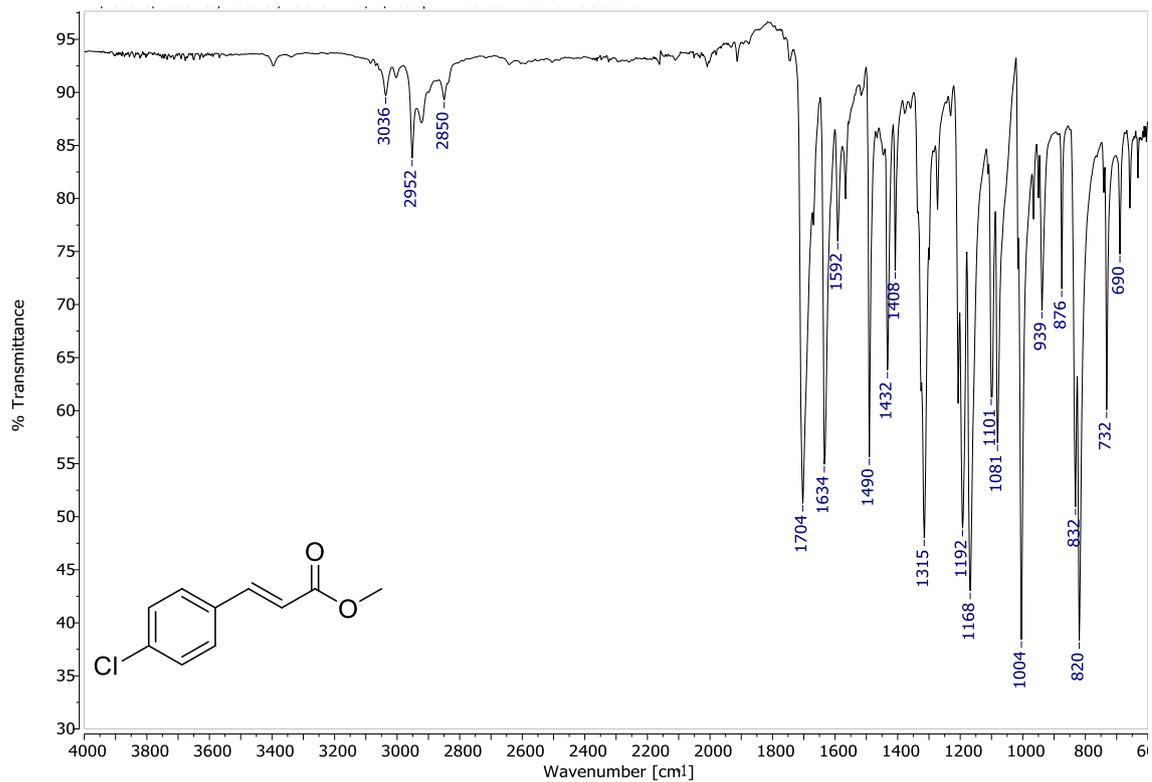


Figura S75. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto 3c

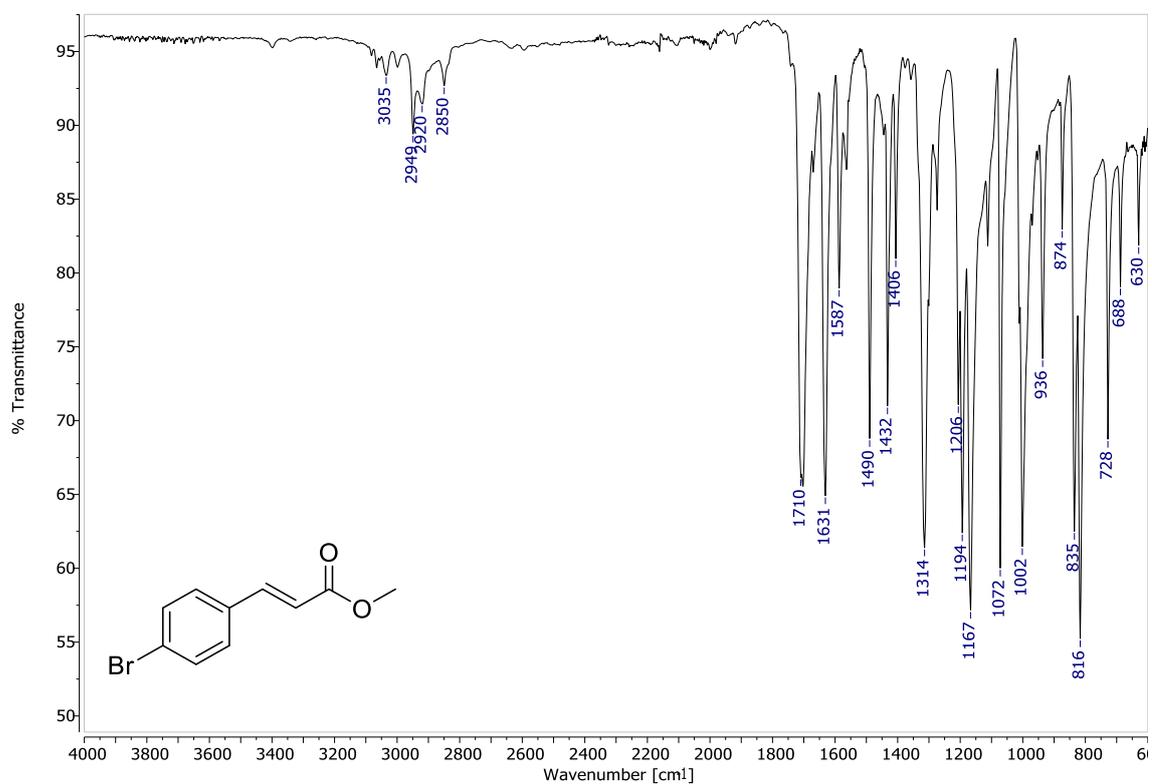


Figura S76. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto 3d

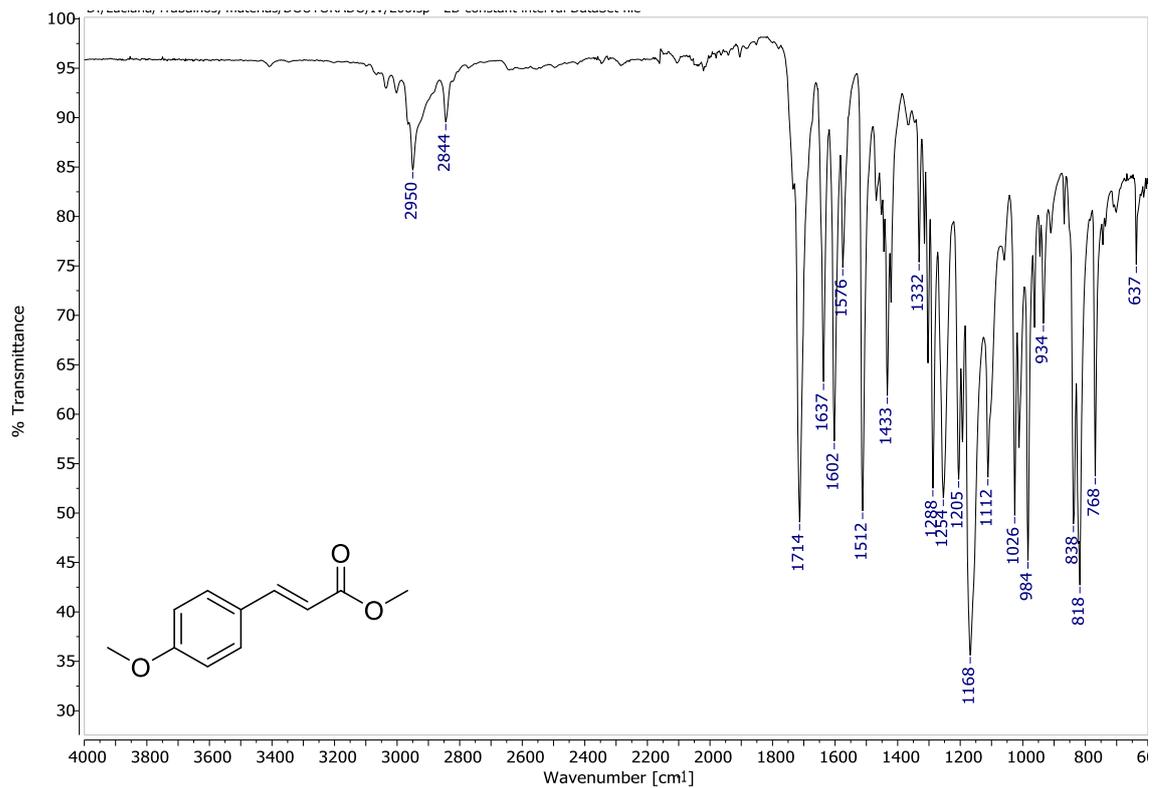


Figura S77. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto 3e

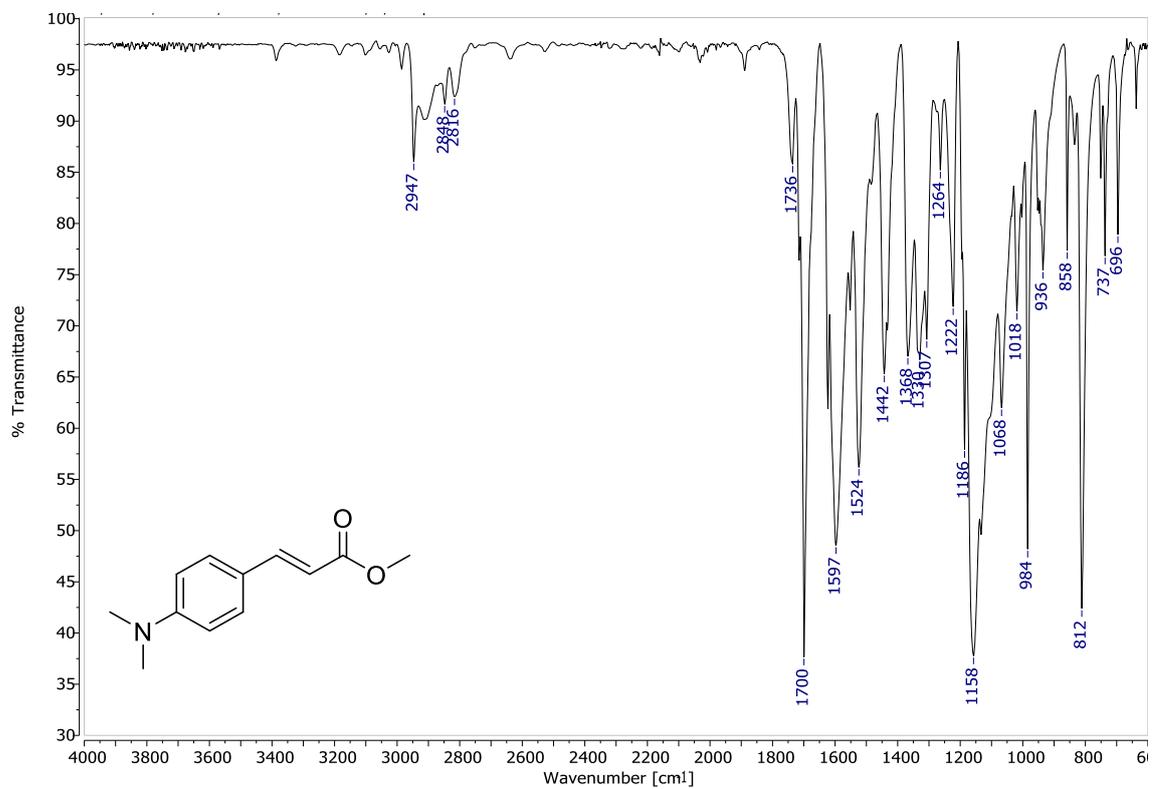


Figura S78. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto 3f

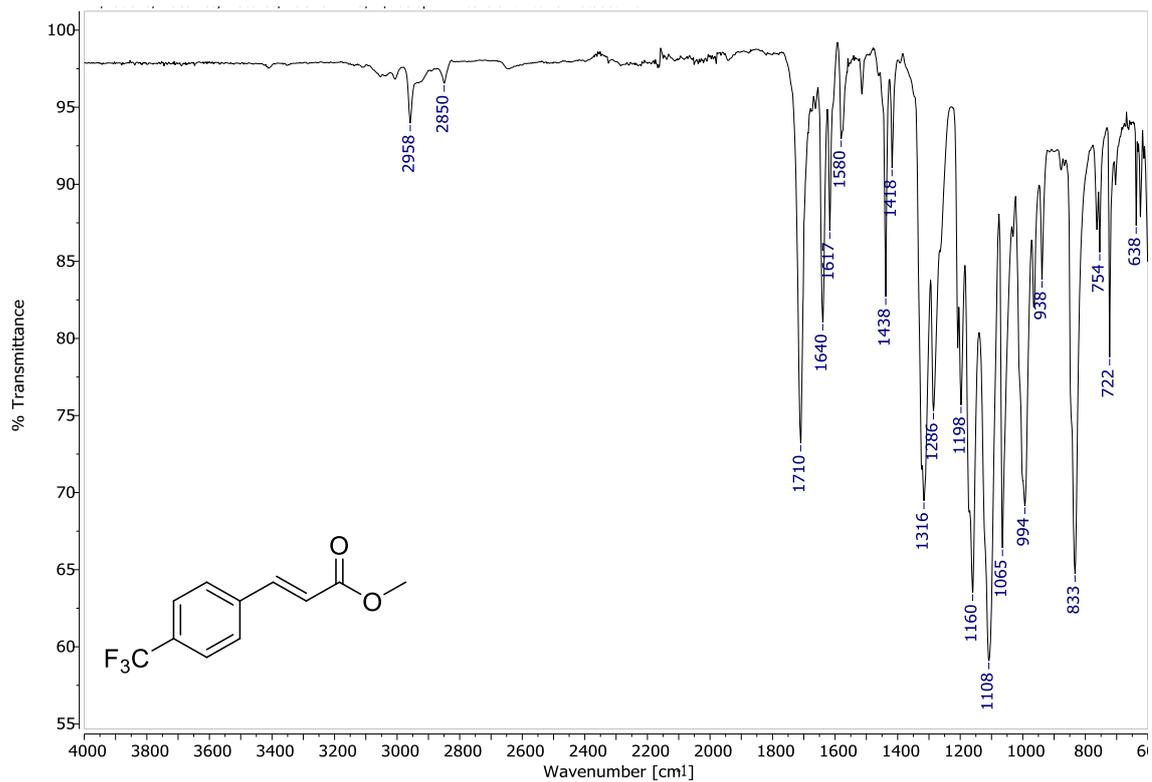


Figura S79. Espectro na região do infravermelho (ATR, $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$) para o composto **3g**

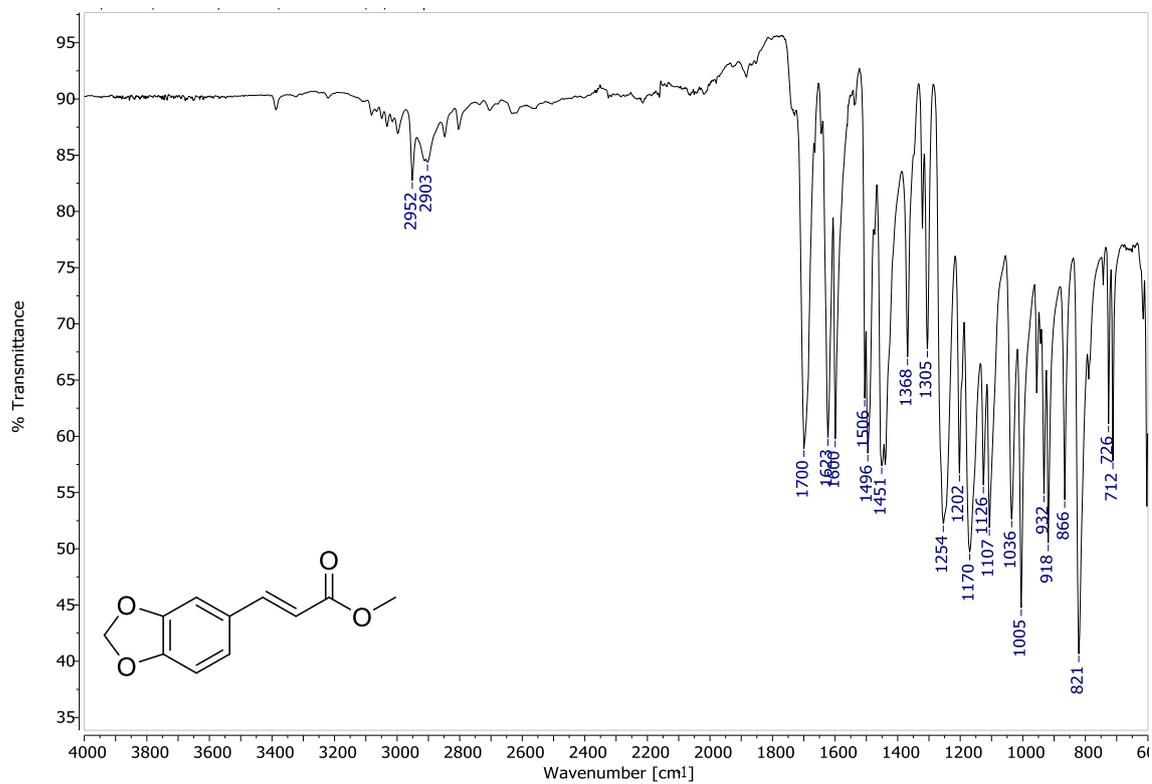


Figura S80. Espectro na região do infravermelho (ATR, $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$) para o composto **3h**

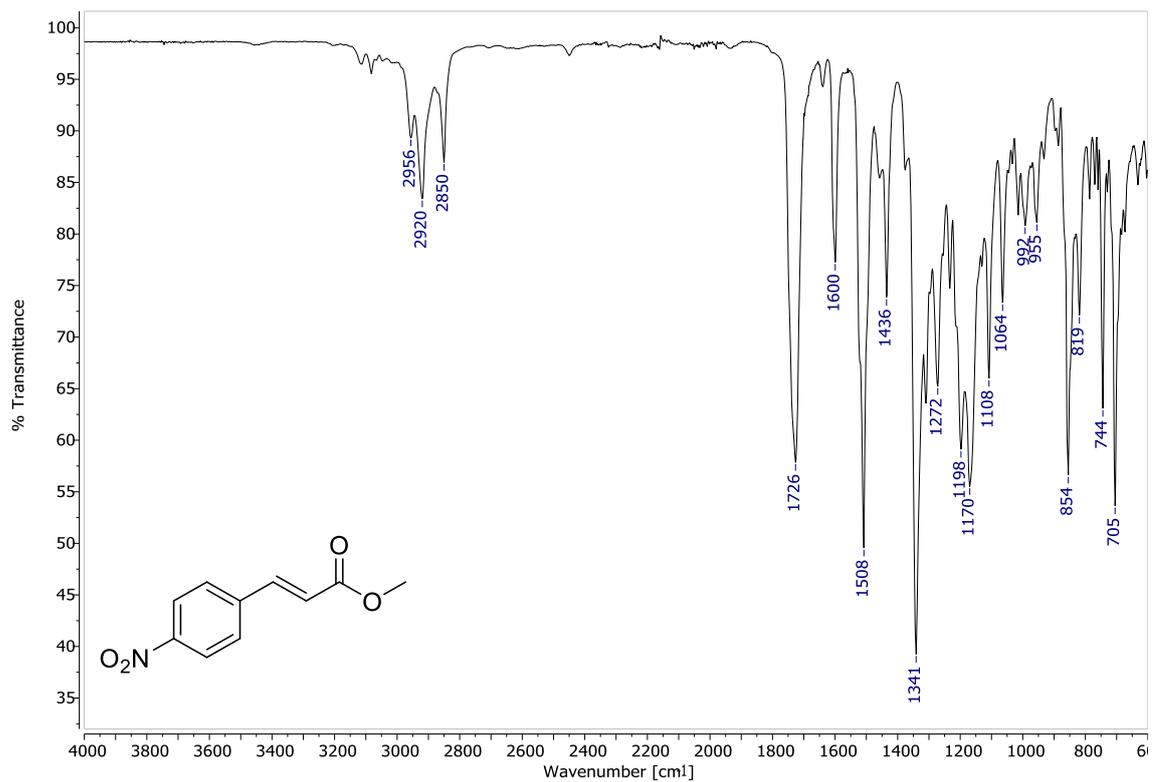


Figura S81 Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto **3i**

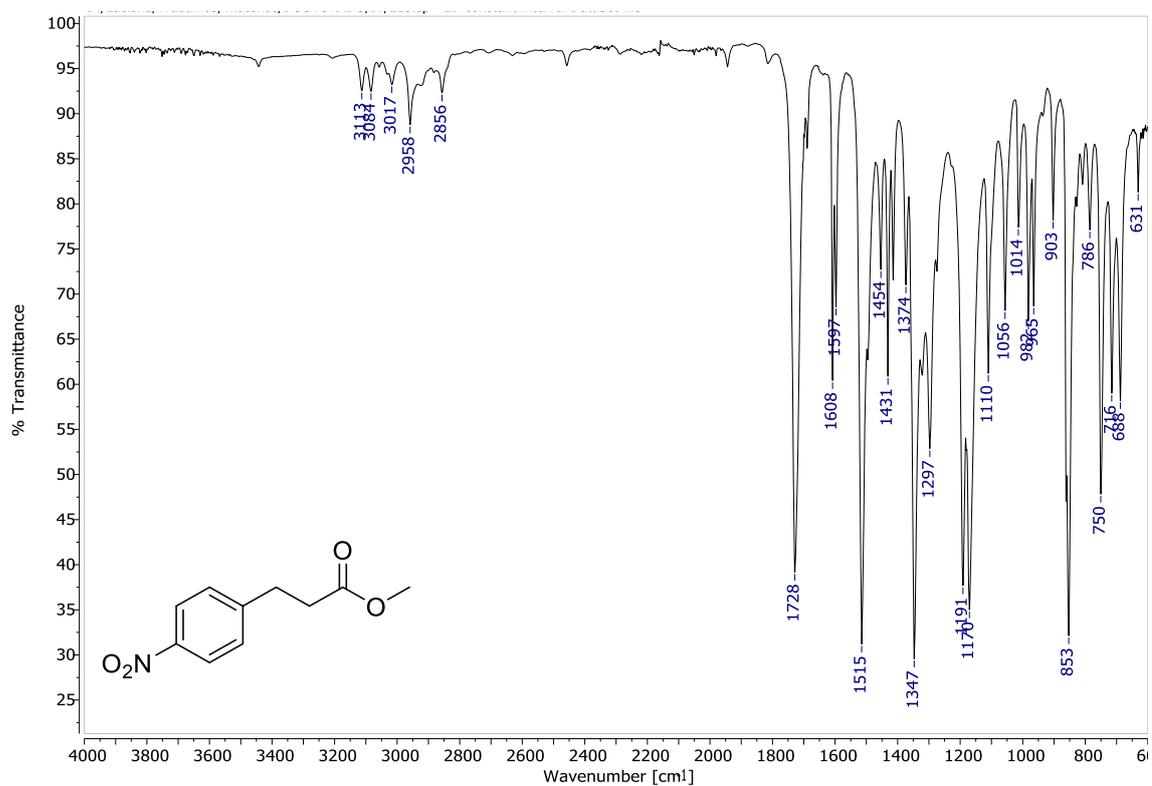
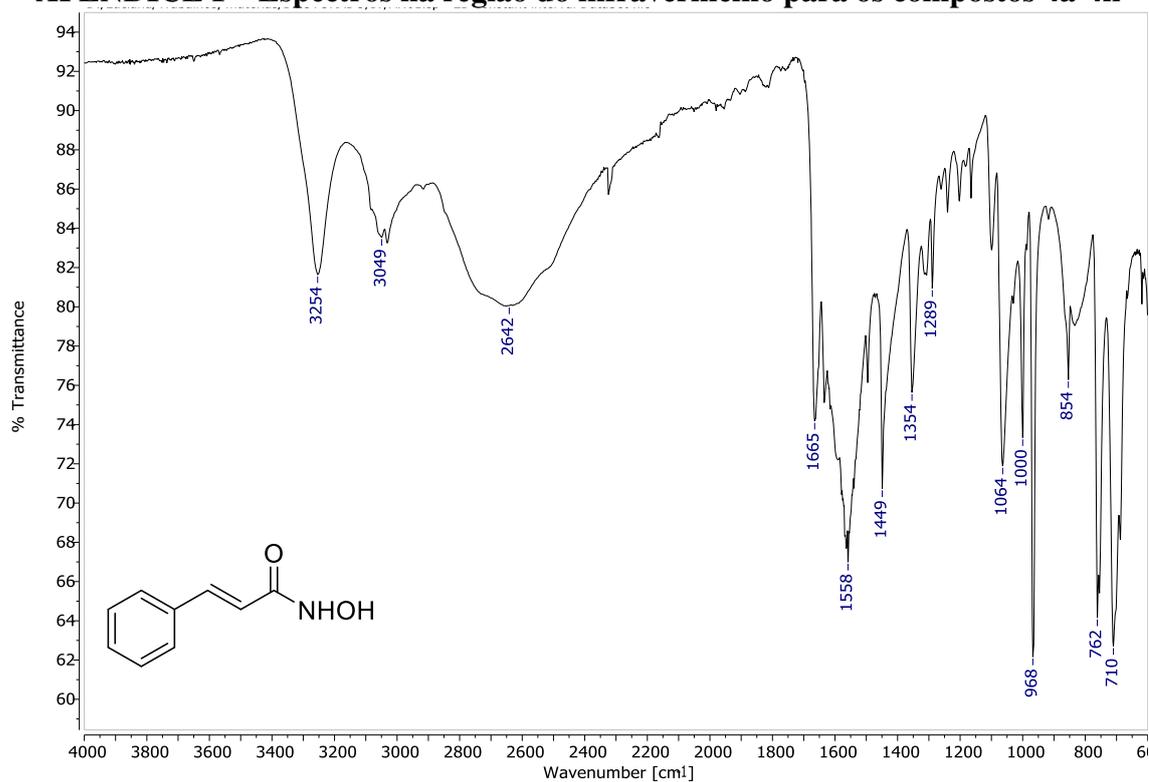
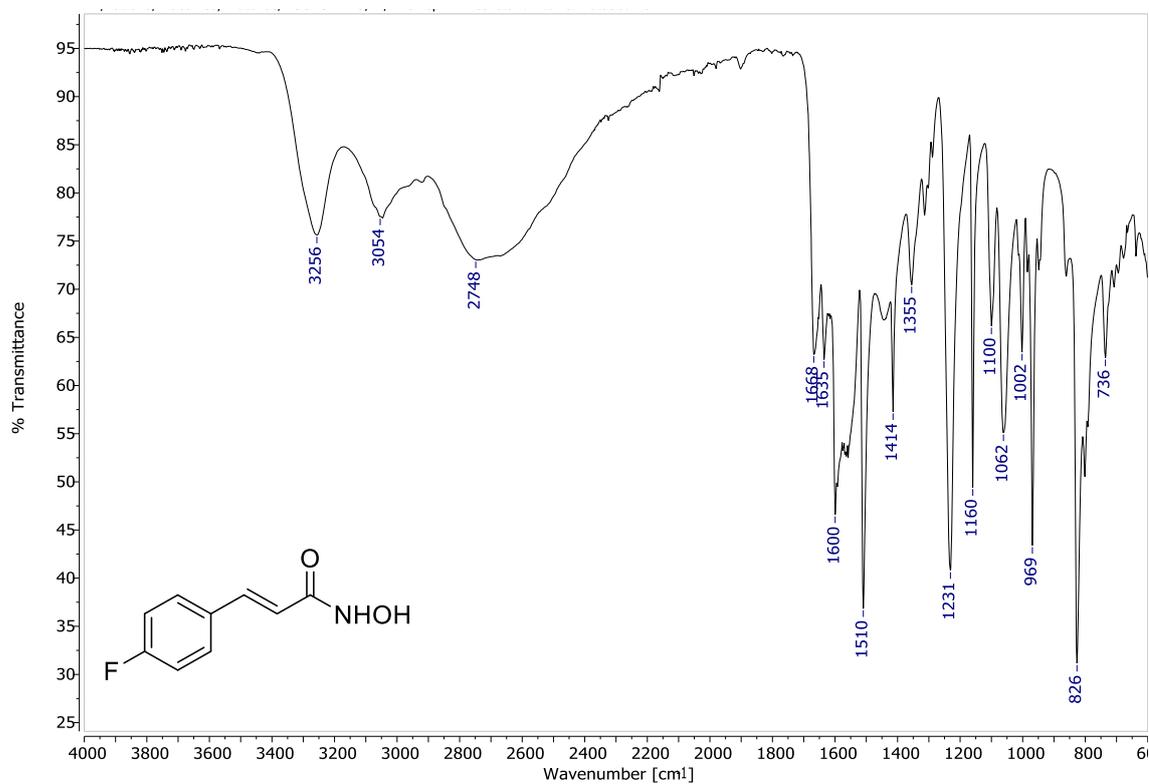


Figura S82. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto **3k**

APÊNDICE F - Espectros na região do infravermelho para os compostos 4a-4k

Figura S83. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto 4aFigura S84. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto 4b

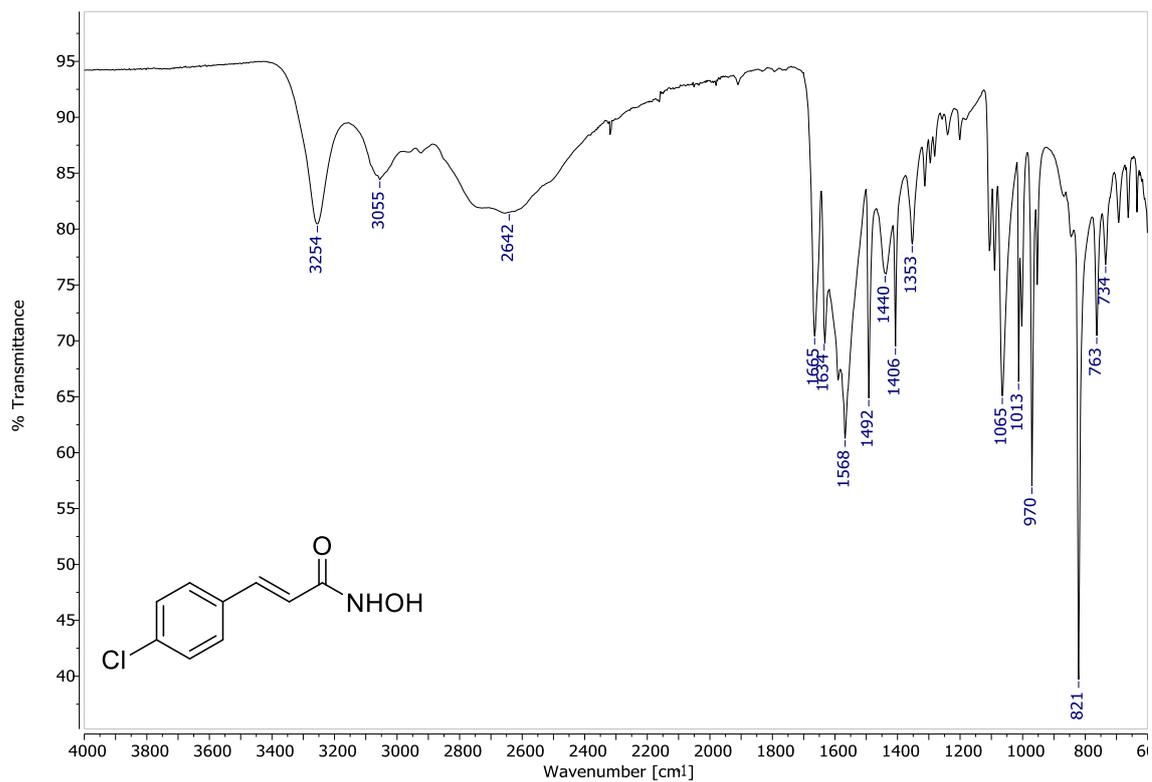


Figura S85. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto **4c**

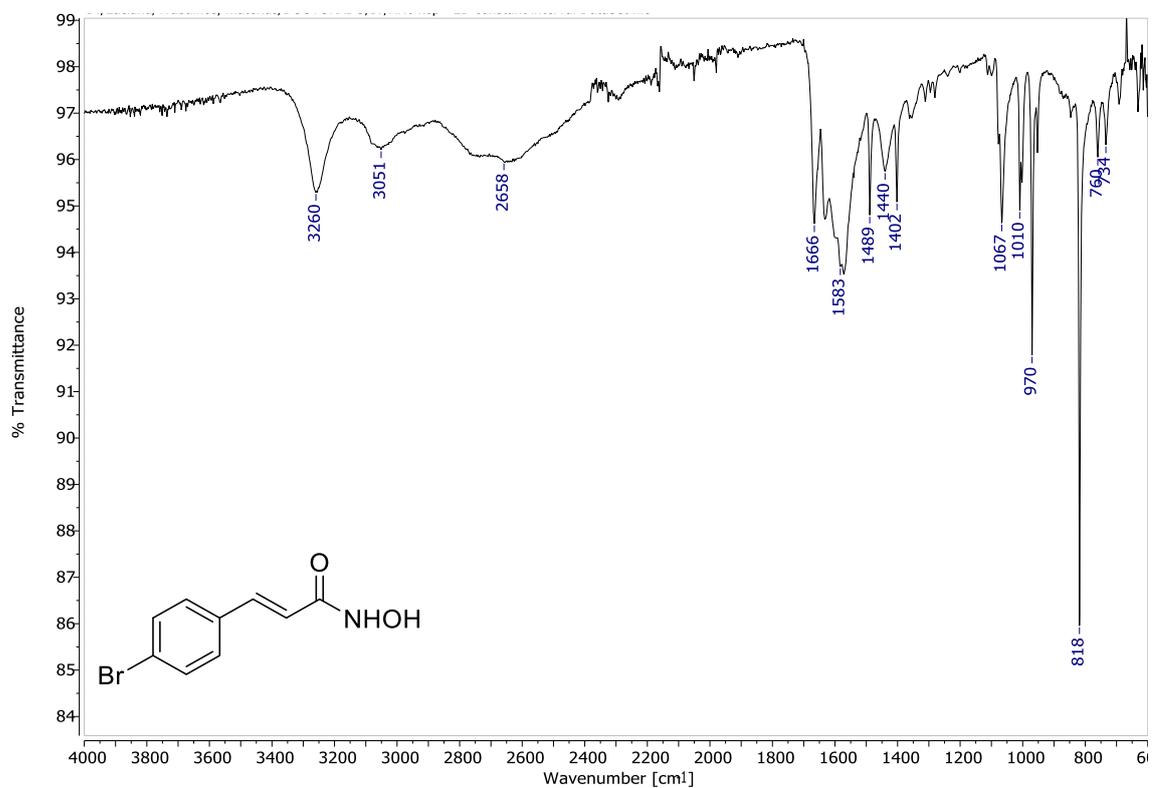


Figura S86. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto **4d**

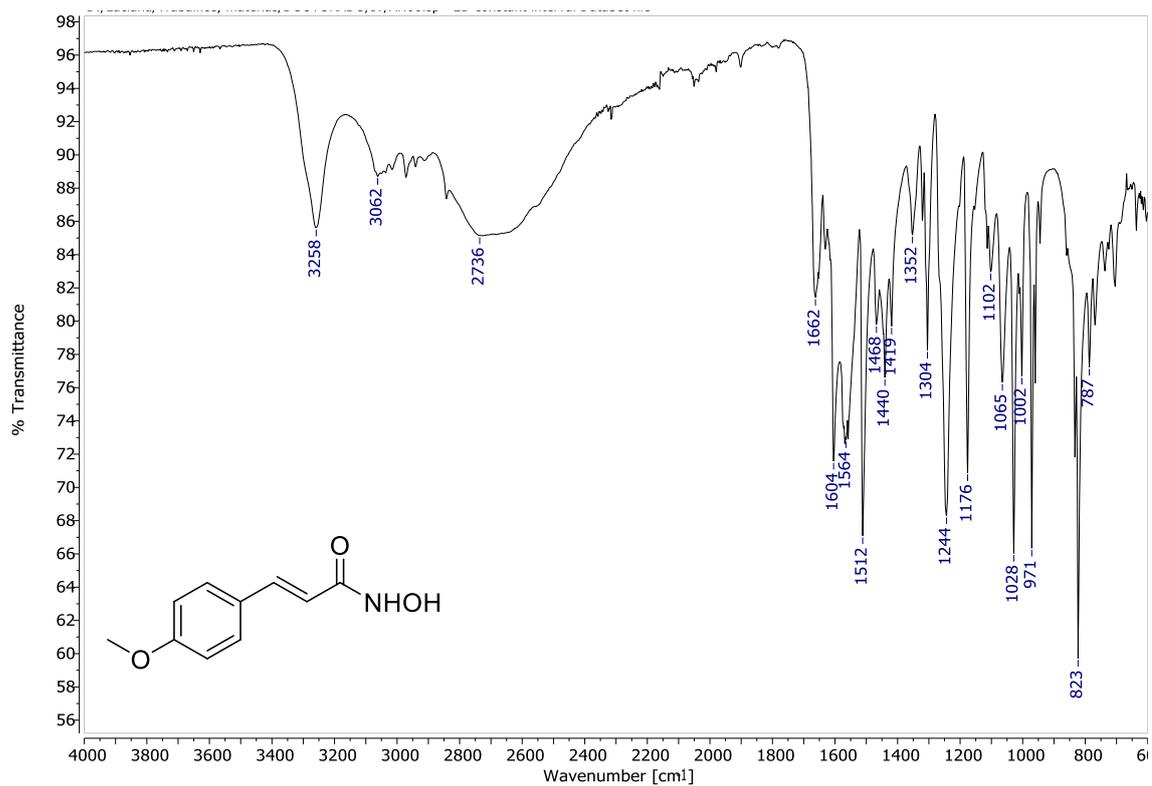


Figura S87. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto 4e

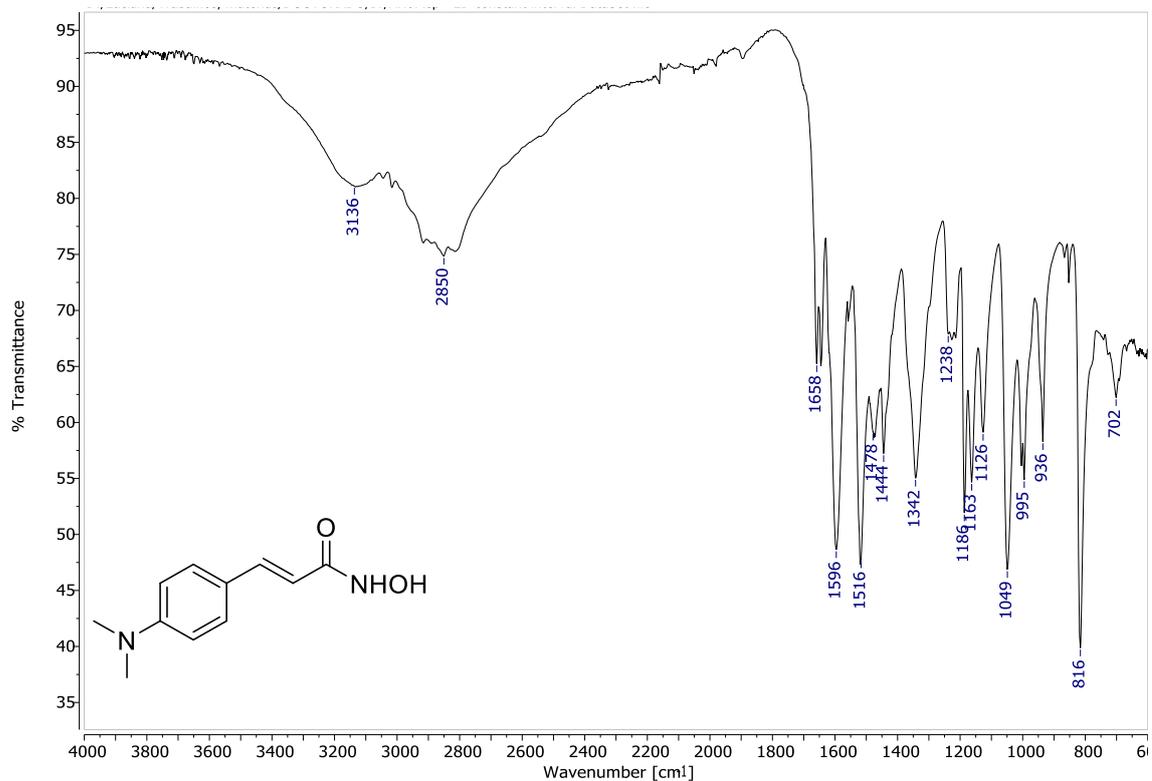


Figura S88. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto 4f

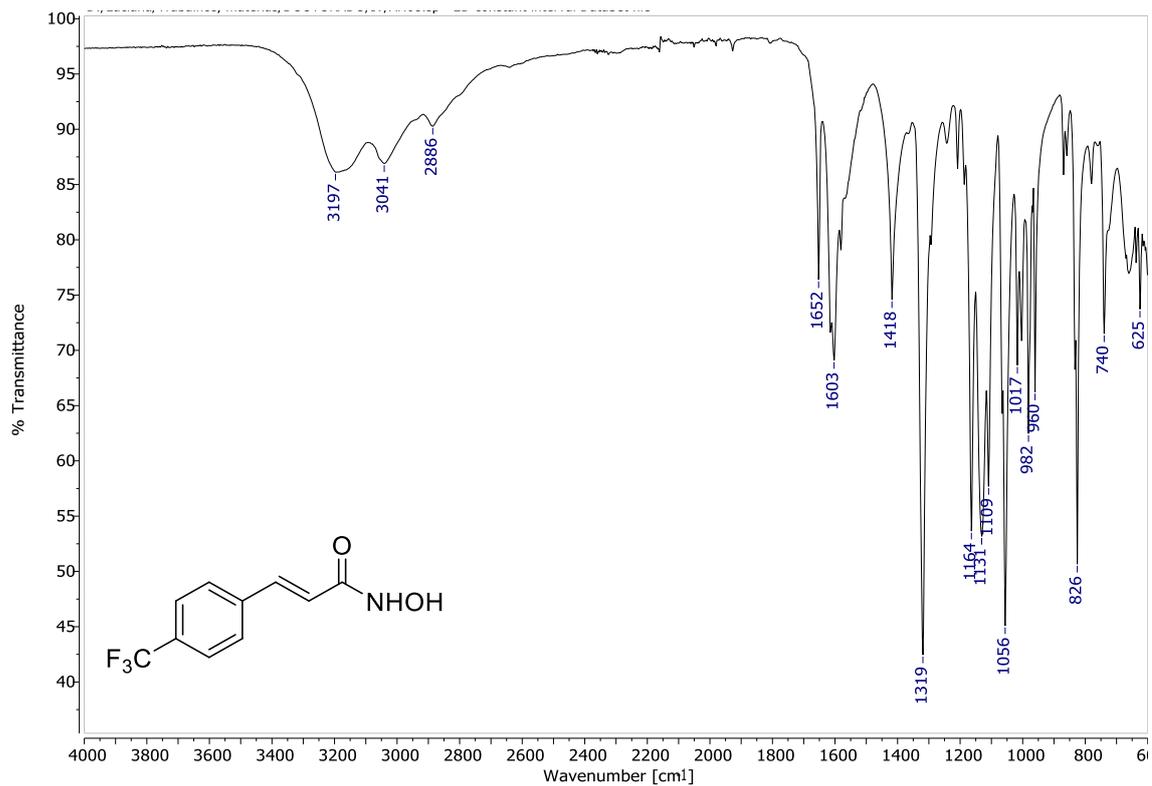


Figura S89. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto **4g**

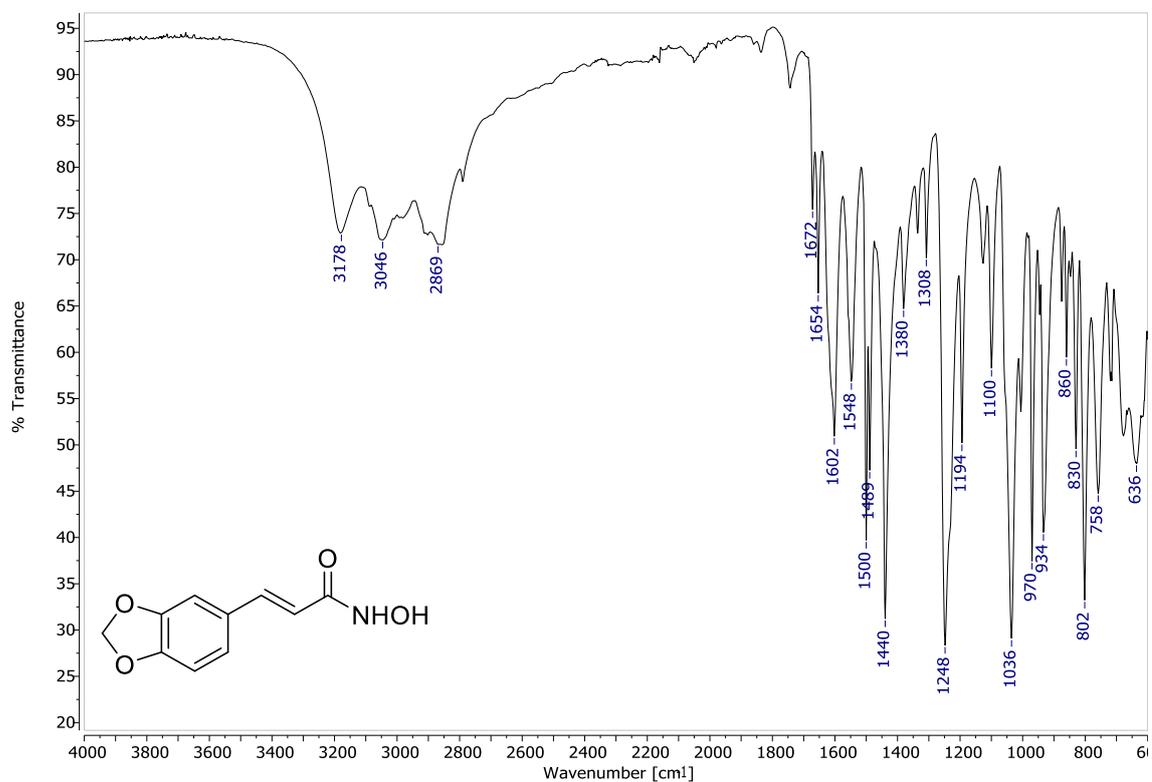


Figura S90. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto **4h**

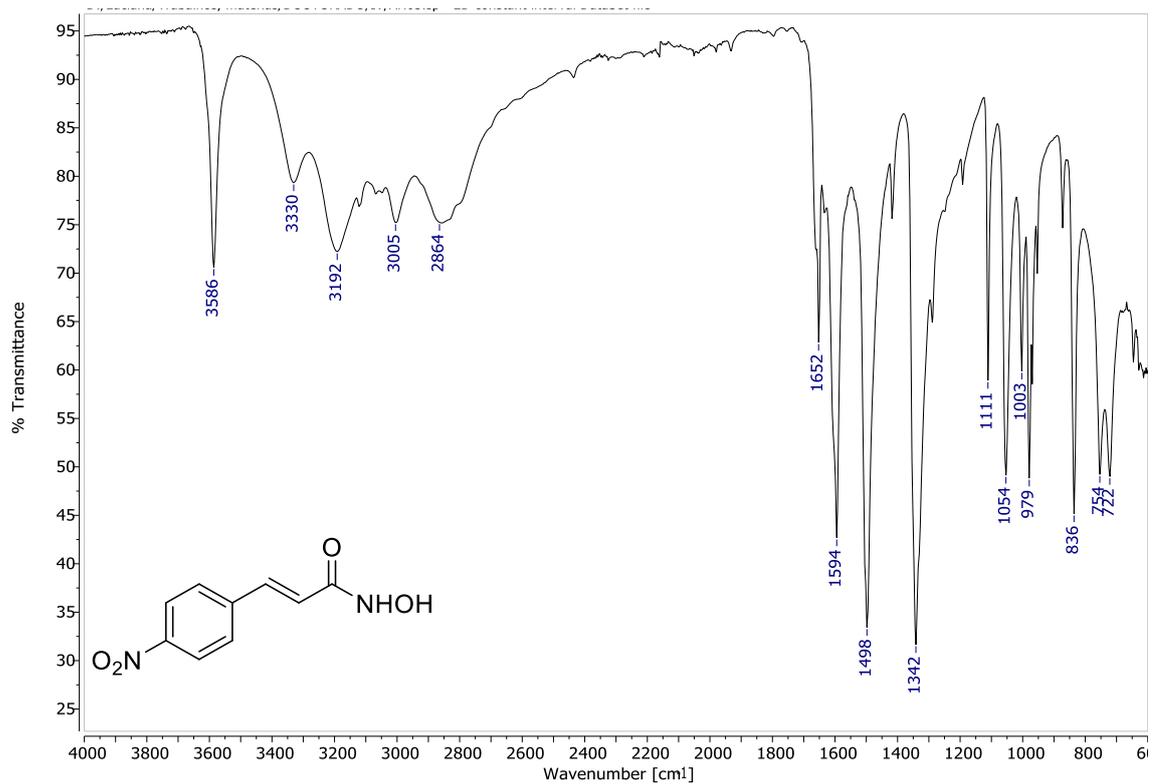


Figura S91. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto 4i

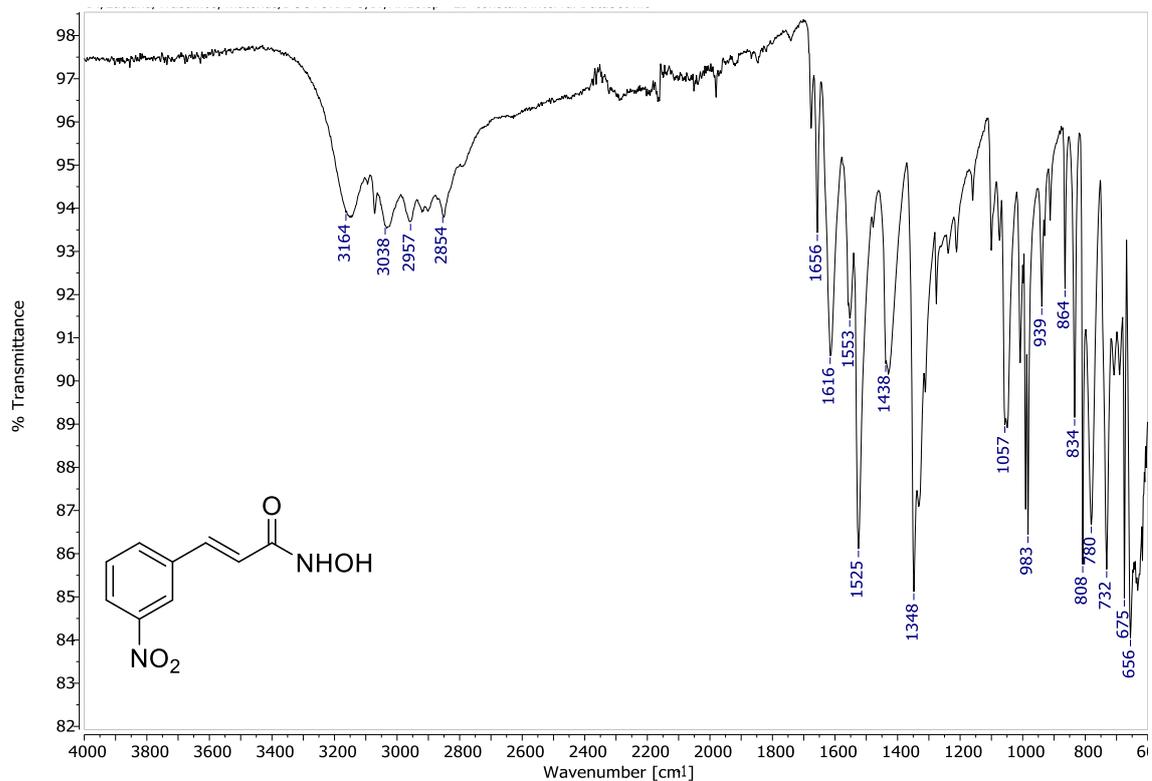


Figura S92. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto 4j

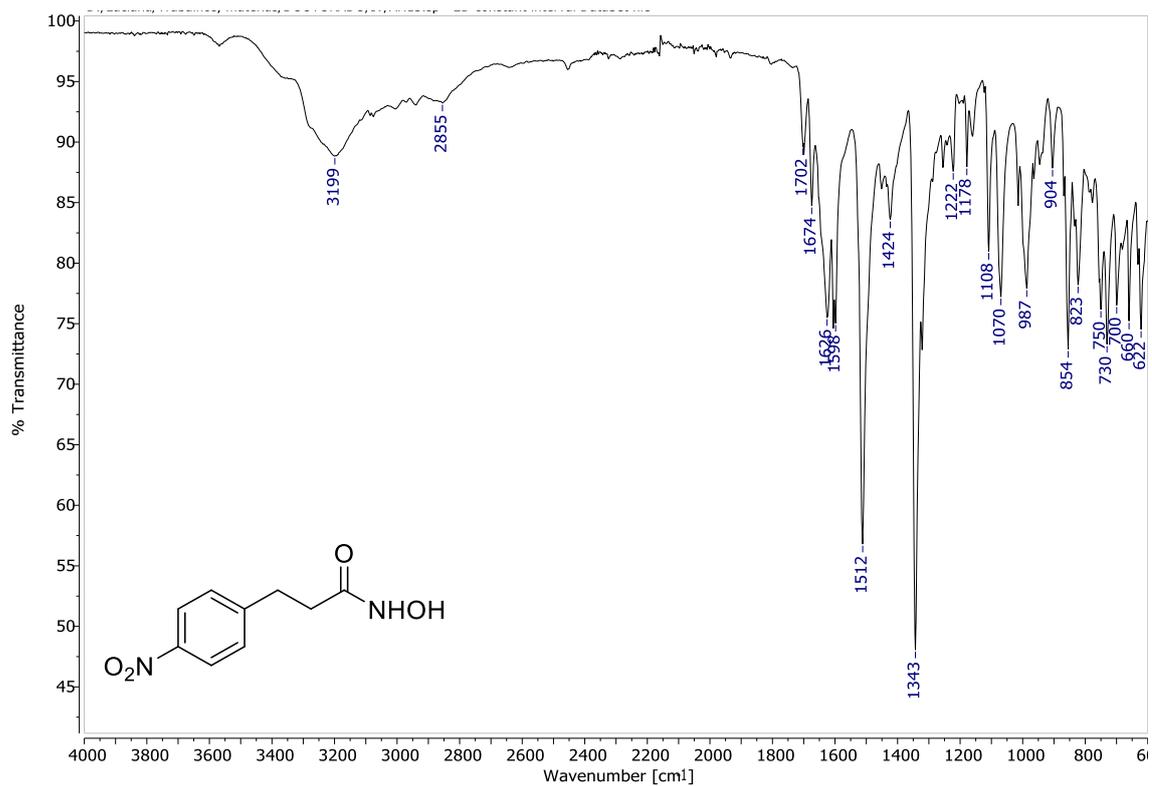


Figura S93. Espectro na região do infravermelho (ATR, 4000-600 cm⁻¹) para o composto 4k

APÊNDICE G - Espectros de Massas de Alta Resolução para os compostos 4a-4k

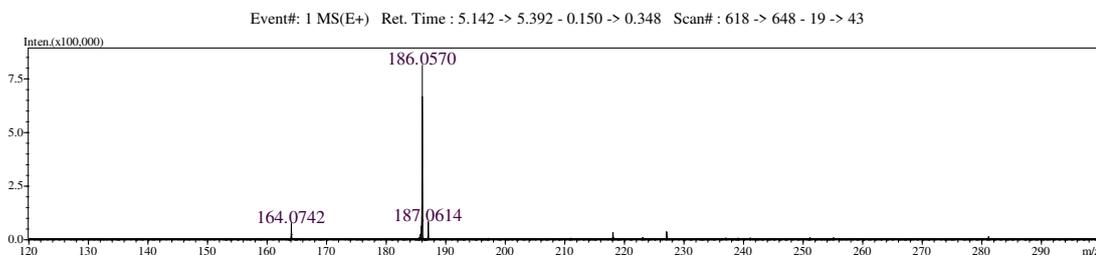


Figura S94. Espectro de massas de alta resolução (m/z 120-300) no modo de ionização positivo para o composto 4a

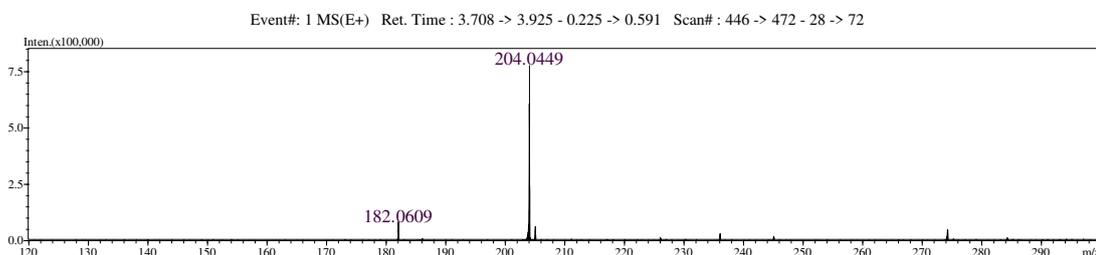


Figura S95. Espectro de massas de alta resolução (m/z 120-300) no modo de ionização positivo para o composto 4b

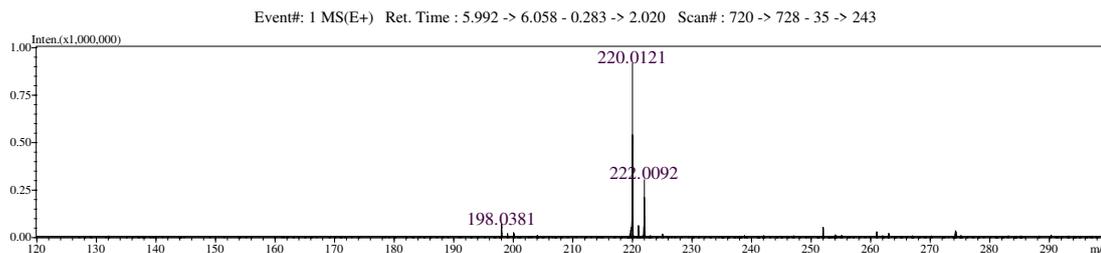


Figura S96. Espectro de massas de alta resolução (m/z 120-300) no modo de ionização positivo para o composto **4c**

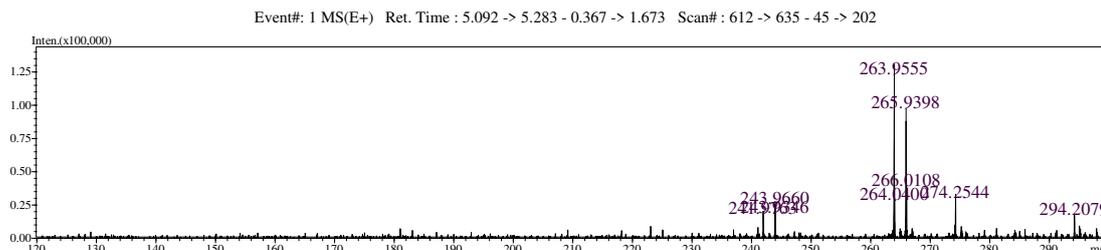


Figura S97. Espectro de massas de alta resolução (m/z 120-300) no modo de ionização positivo para o composto **4d**

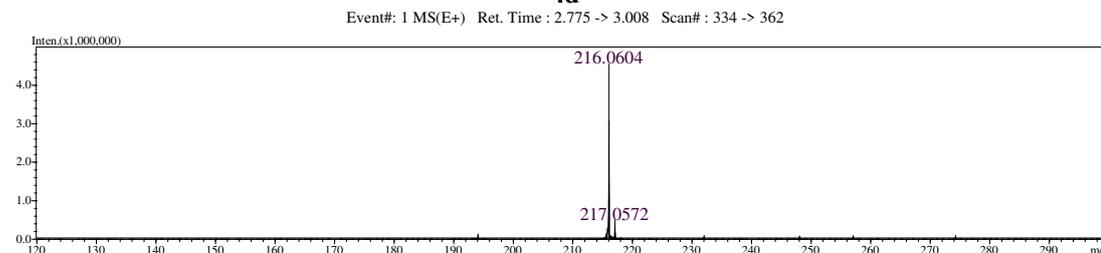


Figura S98. Espectro de massas de alta resolução (m/z 120-300) no modo de ionização positivo para o composto **4e**

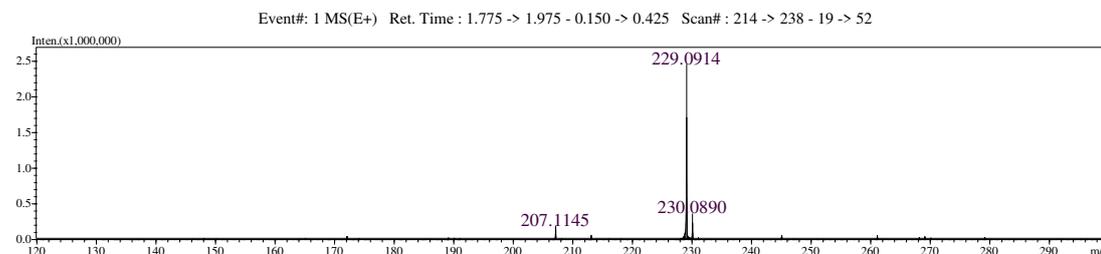


Figura S99. Espectro de massas de alta resolução (m/z 120-300) no modo de ionização positivo para o composto **4f**

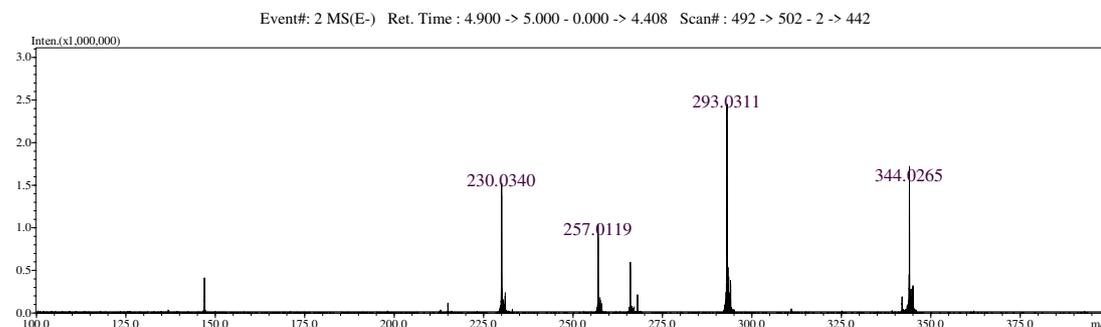


Figura S100. Espectro de massas de alta resolução (m/z 120-300) no modo de ionização negativo para o composto **4g**

Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 3.117 -> 3.317 - 0.117 -> 0.517 Scan#: 375 -> 399 - 15 -> 63

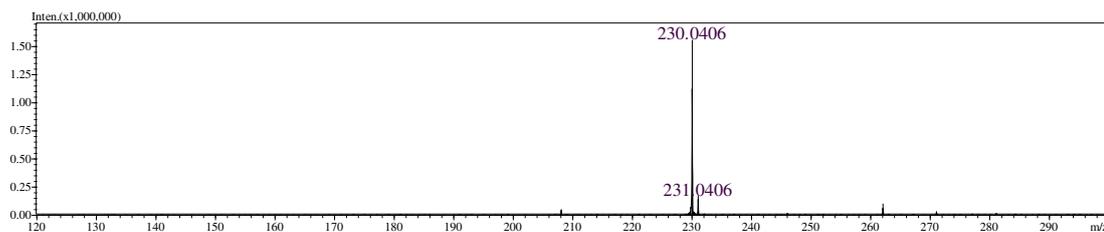


Figura S101. Espectro de massas de alta resolução (m/z 120-300) no modo de ionização positivo para o composto **4h**

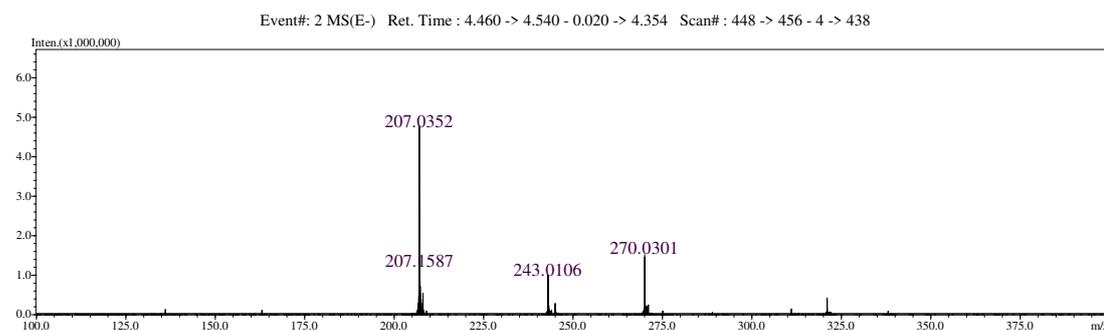


Figura S102. Espectro de massas de alta resolução (m/z 120-300) no modo de ionização negativo para o composto **4i**

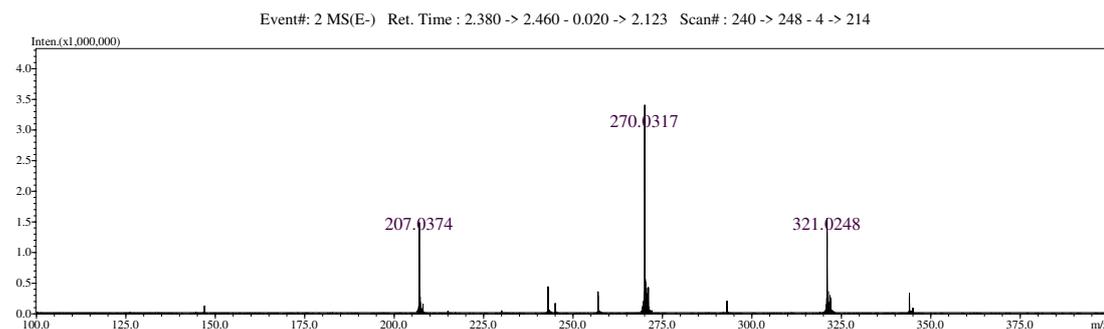


Figura S103. Espectro de massas de alta resolução (m/z 120-300) no modo de ionização negativo para o composto **4j**

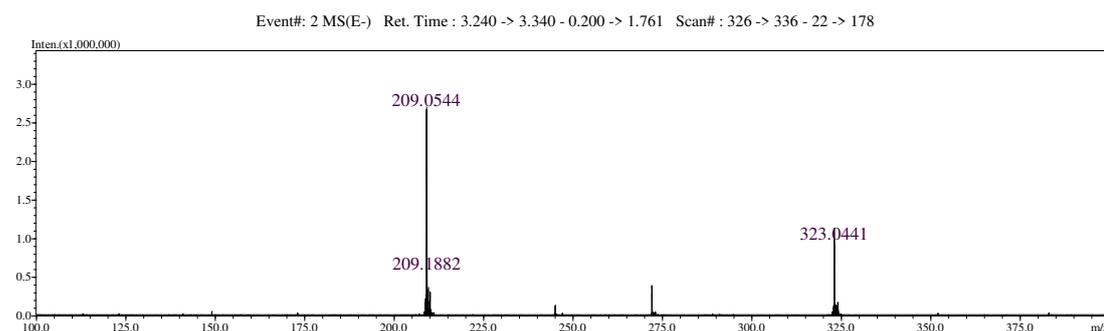


Figura S104. Espectro de massas de alta resolução (m/z 120-300) no modo de ionização negativo para o composto **4k**

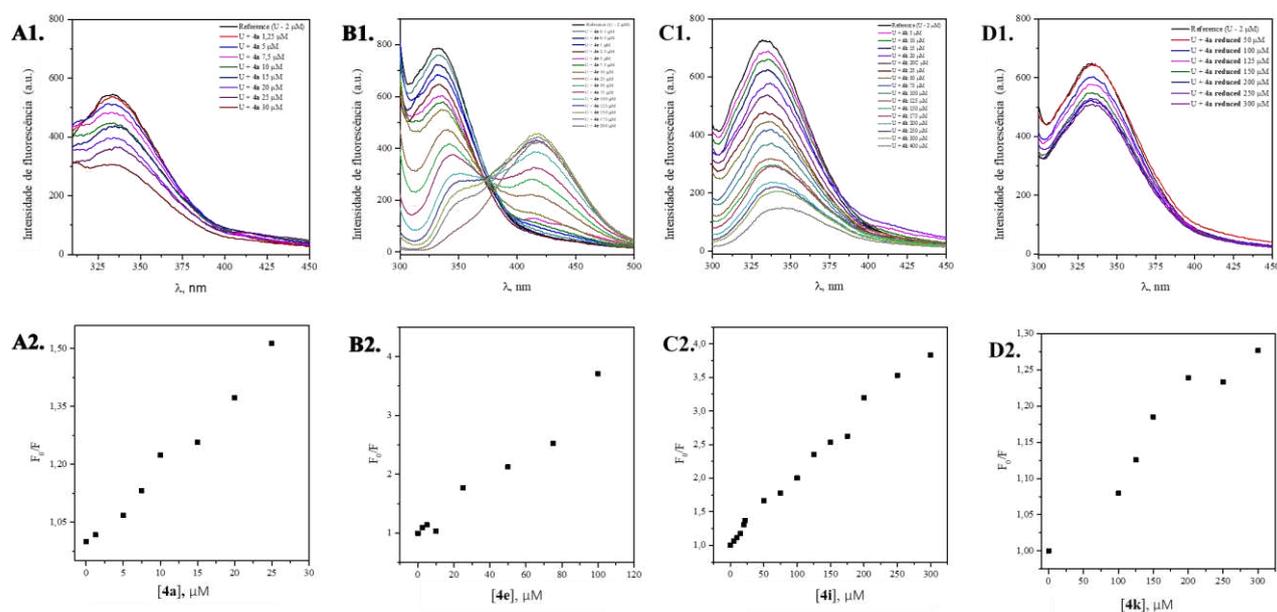


Figura S105. Interação da urease com os derivados do ácido hidroxâmico **4a**, **4e**, **4i** e **4k**. A1) Titulação fluorimétrica da urease com o derivado **4a**; A2) Gráfico de Stern-Volmer para o derivado **4a**; B1) Titulação fluorimétrica da urease com o derivado **4e**; B2) Gráfico de Stern-Volmer para o derivado **4e**; C1) Titulação fluorimétrica da urease com o derivado **4i**; C2) Gráfico de Stern-Volmer para o derivado **4k**; D1) Titulação fluorimétrica da urease com o derivado **4k**; D2) Gráfico de Stern-Volmer para o derivado **4k**.

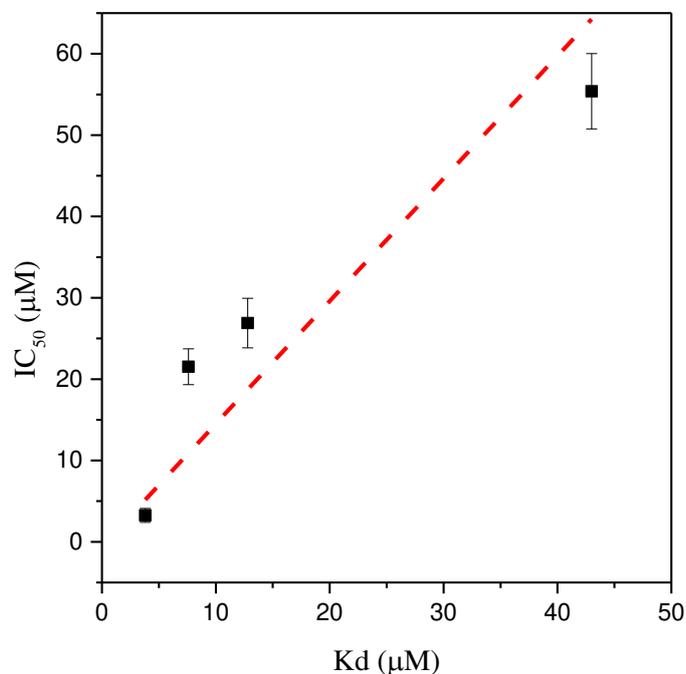


Figura S106. Gráficos de correlação entre o IC_{50} de inibição da urease e K_d dos derivados **4a**, **4e**, **4i** e **4k**.

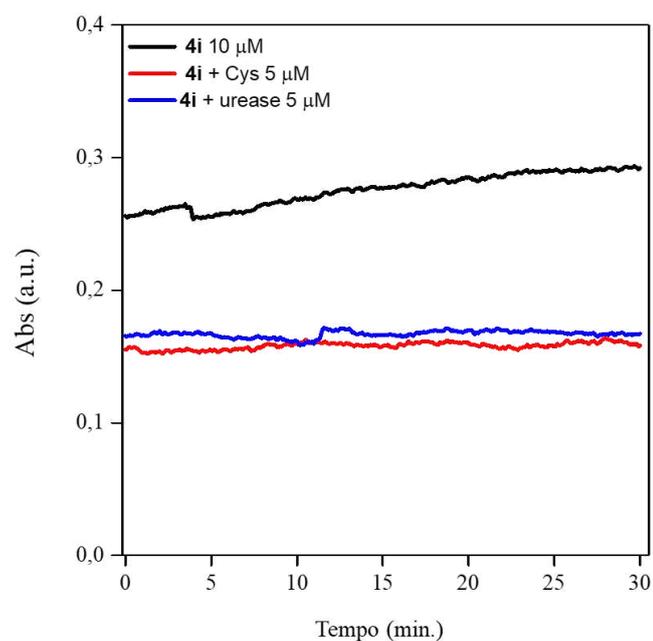


Figura S107. Avaliação cinética do comportamento reacional/interacional de **4i** com cisteína e Urease (cinética por UV-Vis)

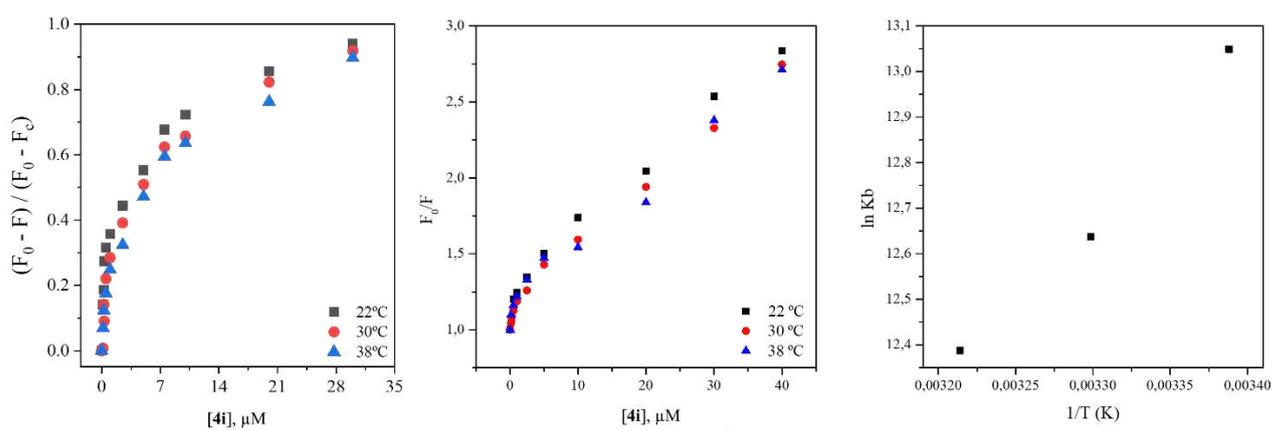


Figura S108. Parâmetros termodinâmicos do composto **4i**

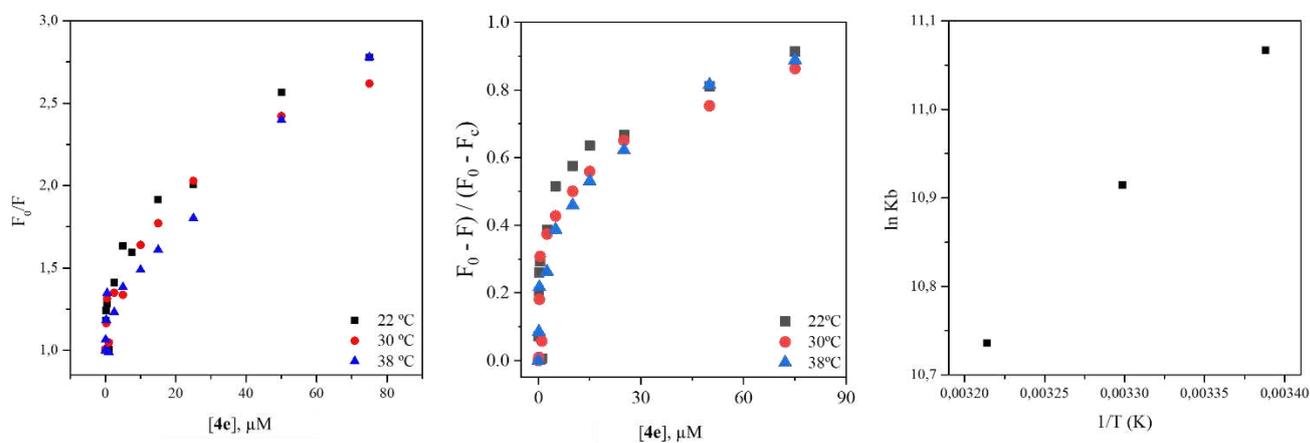


Figura S109. Parâmetros termodinâmicos do composto **4e**