

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Exatas - Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Nathália Evelyn Morais Costa

**INIBIÇÃO DA UREASE COMO FERRAMENTA MEDICINAL E AGRÍCOLA: a
influência de átomos de selênio e boro na atividade antiureolítica de inibidores de urease
conhecidos**

Belo Horizonte
2024

UFMG/ICEX/DQ. 1.626
T. 742

Nathália Evelyn Moraes Costa

**INIBIÇÃO DA UREASE COMO FERRAMENTA MEDICINAL E AGRÍCOLA: a
influência de átomos de selênio e boro na atividade antiureolítica de inibidores de urease
conhecidos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química da Universidade Federal de Minas
Gerais como requisito parcial do grau de Doutor
em Ciências - Química.

Orientador: Prof. Dr. Ângelo de Fátima

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Eliezer Alberto

**Belo Horizonte
2024**

Ficha Catalográfica

C837i
2024
T

Costa, Nathália Evelyn Morais.
Inibição da urease como ferramenta medicinal e agrícola [manuscrito] : a influência de átomos de selênio e boro na atividade antiureolítica de inibidores de urease conhecidos / Nathália Evelyn Morais Costa. 2024.
202 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Ângelo de Fátima.
Coorientador: Eduardo Eliezer Alberto.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química.
Bibliografia: f. 137-146.
Apêndices: f. 147-202.

1. Química orgânica – Teses. 2. Urease – Inibidores – Teses. 3. Selênio – Teses. 4. Boro – Teses. 5. Química farmacêutica – Teses. 6. Atividade antifúngica – Teses. 7. Ácidos – Teses. 8. Compostos orgânicos – Teses. 9. Espectroscopia de infravermelho – Teses. 10. Espectrometria de Massa – Teses. 11. Ressonância Magnética Nuclear – Teses. I. Fátima, Ângelo de, Orientador. II. Alberto, Eduardo Eliezer, Coorientador. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

UFMG

Programa de Pós-Graduação em Química
Departamento de Química - ICEx



"Inibição da Urease como Ferramenta Medicinal e Agrícola: A Influência de Átomos de Selênio e Boro na Atividade Antiureolítica de Inibidores de Urease Conhecidos"

Nathália Evelyn Moraes Costa

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Ângelo de Fátima - Orientador
UFMG

Prof. Eduardo Eliezer Alberto - Coorientador
UFMG

Prof. Antonio Carlos Bender Burtoloso
USP

Prof. Sergio Antonio Fernandes
UFV

Profa. Rosemeire Brondi Alves
UFMG

Prof. Diogo Montes Vidal
UFMG



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Carlos Bender Burtoloso, Usuário Externo**, em 26/10/2024, às 08:32, 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 28/10/2024, às 11:02, 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 **Sérgio Antônio Fernandes, Usuário Externo**, em 28/10/2024, às 11:27, 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 28/10/2024, às 15:38, 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 **Diogo Montes Vidal, Professor do Magistério Superior**, em 28/10/2024, às 16:11, 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 **Eduardo Eliezer Alberto, Professor do Magistério Superior**, em 30/10/2024, às 12:22, 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 **3674255** e o código CRC **299D80D0**.

AGRADECIMENTOS

A trilha acadêmica não é fácil. É cheia de curvas e subidas, com buracos e pedras no caminho. Chegar ao final de um ciclo é uma recompensa que não posso segurar sozinha, mas que compartilho com quem me apoiou e esteve comigo durante a caminhada. A essas pessoas, vão aqui os meus agradecimentos.

À minha mãe, pelo amor, dedicação, apoio incondicional e por se fazer presente mesmo quando a distância geográfica entre nós é maior que um oceano.

Ao meu pai, pelo amor demonstrado à sua própria maneira e pelo olhar de orgulho direcionado a mim.

Ao meu irmão Vinícius, pelo amor e carinho, e por ter sido, mesmo sem saber, muitas vezes o meu melhor amigo.

Ao meu noivo, Victor, pelo amor, cuidado e paciência. Por ser exato e encantado. Por ser amor, invade e fim.

A Lucas e Suzana, por terem me acolhido e me feito sentir em família, mesmo quando os meus entes mais próximos estavam a quilômetros de mim.

Aos meus amigos que há tanto tempo de acompanham: Iva, Sâmia, Luyse e Rafael.

Aos meus familiares, em especial à minha avó Glória e a minha tia Márcia, pelo amor e atenção.

Aos meus cachorros: Frida, por ter vindo comigo de Salvador para essa aventura em terras mineiras e por ter sido mais do que meu animal de estimação. Ela foi minha única companhia durante a pandemia e me ajudou a segurar a saúde mental. Por ser tão bagunceira, me manteve muito ocupada. E ao Nacho, o caçula, que desde que chegou não me deixou vulnerável a nenhum mal. Muito pelo contrário, passa o dia me vigiando e se certificando que ninguém, além dele, vai chegar perto de mim. Um pouco tóxico, mas prefiro acreditar que é amor.

Ao Prof. Ângelo, um exemplo de profissional e ser humano, pela atenciosa orientação, pela confiança e por me mostrar que “vai dar tudo certo” com a voz mais calma do mundo; muitas vezes, é a única coisa que a gente precisa ouvir.

Aos amigos do GEQOB, que a UFMG me deu a honra e o prazer de conhecer e conviver. Nada é fácil, mas é muito mais agradável quando você tem pessoas tão maravilhosas pra compartilhar ciência e vida, toda manhã com um cafezinho fresco e, de vez em quando, um bolinho da Vovó Flora.

Ao Prof. Eduardo Alberto pela atenciosa coorientação, pela confiança e pela ajuda em todo o processo de “domesticação” dos nossos compostos de selênio.

Aos meus amigos do GCO Lab, pelo companheirismo e amizade. Estar entre eles, para discutir artigos ou só pra conversar sobre como anda a vida, é um privilégio. Agradeço também por compartilharem comigo as reclamações sobre o cheiro do selênio nos corredores do DQ.

Ao Prof. Silvio Cunha, por ter sido o primeiro exemplo do que eu queria ser quando crescesse e por ter me ajudado, desde a graduação, a construir esse caminho.

Aos professores que aceitaram fazer parte da banca avaliadora deste trabalho, pelo seu tempo e prontidão.

Aos funcionários do Departamento de Química-UFMG, à CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG.

Não se incomode, o que a gente pode, pode
O que a gente não pode, explodirá
A força é bruta e a fonte da força é neutra
E de repente a gente poderá.

Gilberto Gil (Realce)

RESUMO

A enzima urease, uma metaloproteína que catalisa a hidrólise da ureia em amônia e dióxido de carbono, desempenha um papel crucial em vários processos biológicos e patológicos. Sua atividade é fundamental em organismos que utilizam ureia como fonte de nitrogênio, mas também está associada a diversos problemas de saúde humana, incluindo infecções causadas por fungos e bactérias, bem como questões agrícolas, como o impacto ambiental da liberação de amônia no solo. Portanto, o desenvolvimento de inibidores eficazes de urease é de grande interesse tanto na medicina quanto na agricultura. Este trabalho é dividido em três capítulos e apresenta a síntese e avaliação do potencial antiureolítico de três classes de moléculas: adutos de Biginelli derivados de selênio, adutos de Biginelli derivados de ácidos formilfenil borônicos e benzoilselenoureias. Os adutos de Biginelli derivados de selênio foram identificados como potentes inibidores de urease vegetal (*C.ensifmormis*), com os compostos mais ativos apresentaram IC₅₀ entre 30 e 50 μM, mostrando maior atividade que os análogos derivados de ureia e tioureia. Os estudos cinéticos dos derivados mais ativos foram realizados, definindo o mecanismo de inibição e os parâmetros cinéticos dos inibidores mais potentes. A síntese dos adutos de Biginelli derivados de ácidos formilfenil borônicos foi otimizada para núcleos contendo a porção ureia e tioureia. Ensaios enzimáticos com a urease (*C.ensifmormis*) permitiram definir o IC₅₀ (132 μM) e observar que esse composto age por meio de um mecanismo de inibição misto. Além disso, estudos biofísicos revelaram como o derivado mais ativo interage com o sítio ativo da urease por meio das hidroxilas do ácido borônico. Por fim, a síntese de benzoilselenoureias foi otimizada e esses compostos e seus análogos de enxofre, benzoiltioureias, foram avaliados quanto seu potencial antiureolítico contra a urease fúngica *C. neoformans*. A atividade *in vitro* desses compostos mostrou que os compostos de selênio possuem maior atividade antifúngica (valores de concentração inibitória mínima - CIM e fungicida mínima - CFM variando de 1 a 16 mg/L) quando comparadas aos correspondentes compostos de enxofre (CIM e CFM variando de 8 a 128 mg/L). Além disso, as benzoilselenoureias foram testadas na urease do extrato de proteína bruta de *C. neoformans*, onde foram observados valores de ureIC₅₀ variando entre 0,95 e 13,95 nM. Os resultados desta pesquisa contribuem significativamente para o campo da química medicinal, fornecendo novas ferramentas para o possível tratamento de infecções fúngicas e mitigação de problemas ambientais relacionados à atividade da urease.

Palavras-chaves: urease; selênio; ácido borônico; adutos de Biginelli; reação multicomponente.

ABSTRACT

The enzyme urease, a metalloprotein that catalyzes the hydrolysis of urea into ammonia and carbon dioxide, plays a crucial role in various biological and pathological processes. Its activity is essential in organisms that use urea as a nitrogen source. It is also associated with numerous human health issues, including infections caused by fungi and bacteria, and agricultural concerns, such as the environmental impact of ammonia release in soil. Therefore, developing effective urease inhibitors is of great interest in medicine and agriculture. This work is divided into three chapters and presents the synthesis and evaluation of the anti-ureolytic potential of three classes of molecules: selenium-derived Biginelli adducts, Biginelli adducts derived from formylphenylboronic acids, and benzoylselenoureas. Selenium-derived Biginelli adducts were identified as potent inhibitors of plant urease (*C. ensiformis*). The most active compounds displayed CI_{50} values between 30 and 50 μ M, showing greater activity than their urea—and thiourea-derived analogs. Kinetic studies of the most active derivatives were conducted to define the most potent inhibitors' inhibition mechanisms and kinetic parameters. The synthesis of Biginelli adducts derived from formylphenylboronic acids was optimized for nuclei containing urea and thiourea moieties. Enzymatic assays with urease (*C. ensiformis*) allowed the determination of CI_{50} (132 μ M) and revealed that this compound acts through a mixed inhibition mechanism. Additionally, biophysical studies showed how the most active derivative interacts with the urease active site through the hydroxyl groups of the boronic acid. Finally, the synthesis of benzoylselenoureas was optimized, and these compounds and their sulfur analogs, benzoylthioureas, were evaluated for their anti-ureolytic potential against fungal urease *C. neoformans*. In vitro activity of these compounds showed that the selenium compounds possess greater antifungal activity (minimum inhibitory concentration - MIC and minimum fungicidal concentration - MFC values ranging from 1 to 16 mg/L) compared to their sulfur counterparts (MIC and MFC values ranging from 8 to 128 mg/L). Furthermore, benzoylselenoureas were tested on urease from the crude protein extract of *C. neoformans*, where $ureCI_{50}$ values ranging between 0.95 and 13.95 nM were observed. The results of this research significantly contribute to the field of medicinal chemistry, providing new tools for the potential treatment of fungal infections and mitigation of environmental issues related to urease activity.

Keywords: urease; selenium; boronic acid; Biginelli adducts; multicomponent reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Hidrólise enzimática da ureia.	17
Figura 2: Enzima urease jack bean (<i>Canavalia ensiformis</i>). Fonte: PDB 3LA4.	18
Figura 3: Mecanismo da reação de hidrólise da ureia catalisada pela urease. Adaptado de Benini <i>et al.</i>	20
Figura 4: Estruturas químicas dos inibidores de urease ácido aceto-hidroxiâmico e NBPT.	24
Figura 5: Estruturas químicas básicas de inibidores de urease	25
Figura 6: Exemplos de produtos naturais de selênio.	27
Figura 7: Exemplos de compostos sintéticos orgânicos contendo selênio.	28
Figura 8: Compostos orgânicos contendo calcogênios com atividade biológica.	30
Figura 9: Representação de reação multicomponente com formação de um único produto, em uma única etapa, a partir de três reagentes.	31
Figura 10: Exemplos de N-heterociclos naturais e sintético.	32
Figura 11: Reação de Biginelli para obtenção de 3,4-diidropirimidin-2(1H)-ona.	32
Figura 12: Exemplos de Adutos de Biginelli de interesse medicinal e agrícola.	34
Figura 13: Adutos de Biginelli sintetizados e avaliados quanto à ação antimicrobiana por Samdhian e colaboradores.	38
Figura 14: Selenoureas pirimidínicas que apresentaram os melhores resultados de inibição contra células de câncer de mama.	40
Figura 15: Destaque para as porções do aduto de Biginelli onde as alterações estruturais foram planejadas.	42
Figura 16: Adutos de Biginelli derivados da ureia e tiourea isolados e seus respectivos rendimentos.	43
Figura 17: Síntese dos adutos de Biginelli derivados do 2-hidroxibenzaldeído	44
Figura 18: Mecanismo de reação da metilação dos adutos de Biginelli.	48
Figura 19: A) Rendimentos obtidos nas sínteses das isotioureas. B) Ligação de hidrogênio entre a hidroxila fenólica e nitrogênio pirimidínico que leva à estabilização do produto final.	49
Figura 20: Possíveis caminhos de reação para a formação das isotioureas.	51
Figura 21: Mapas de contornos Cosy que evidenciam a correção entre os hidrogênios da metila e o hidrogênio do grupo NH, que confirma a estrutura das isotioureas.	51
Figura 22: Destaque para o acúmulo de carga negativa na estrutura do possível intermediário tetraédrico da reação para o derivado do 2-hidroxibenzaldeído.	54
Figura 23: Série dos adutos de Biginelli sintetizados e caracterizados.	57
Figura 24: Indofenol formado por meio da liberação de amônia proveniente da hidrólise catalisada da ureia.	58
Figura 25: Adutos de Biginelli derivados de ureia, tiourea e selenourea e suas respectivas médias de inibição de urease a 100 uM.	60
Figura 26: Gráfico de Michaelis-Menten e gráfico de Lineweaver-Burk para a reação enzimática na presença dos <i>inibidores</i> ABSe-c (A e B) e AbSe-d (C e D).	67
Figura 27: Compostos orgânicos de boro.	70
Figura 28: Ácidos borônicos aprovados pelas agências reguladoras para uso medicinal.	72
Figura 29: Fuvestranto e fuvestranto modificado incluindo o grupo ácido borônico.	72
Figura 30: Estrutura química de derivados de ácido borônico com atividade antibiótica.	74
Figura 31: Adutos de Biginelli derivados de ácidos borônicos planejados.	77
Figura 32: Síntese dos adutos de Biginelli, contendo ácido borônico derivados da ureia, e seus rendimentos.	78
Figura 33: Síntese dos adutos de Biginelli contendo ácido borônico derivados da ureia e seus rendimentos.	81

Figura 34: A) Gráfico de Michaelis-Menten (V_0 versus $[U]$) para urease na presença do inibidor AcB-e em reações contendo ureia com concentrações variando entre 0,5 e 32 mmol L ⁻¹ e 12,5 mU de urease. B) Gráficos de Lineweaver-Burk para urease na presença do inibidor AcB-e.....	87
Figura 35: Interação da urease com os adutos de Biginelli. A) Titulação fluorimétrica da urease com AcB-e (a linha pontilhada corresponde ao comprimento de onda de emissão máxima de urease livre); B) Constante de dissociação (K_d) dos derivados AcB-d, AcB-e, AcB-f, ABS-c e ABS-a com urease. C) Linearização da equação de Stern-Volmer e D) equação de Scatchard (equação não linear) para o sistema urease-AcB-e em diferentes temperaturas. Os índices a - d nas colunas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Condições: tampão fosfato de sódio pH 7,4 (20 mM).	91
Figura 36: Espectros de fluorescência tridimensionais (3D) para A) urease (2 μ M) e B) urease + AcB-e (40 μ M). Condições: tampão de fosfato de sódio 20mM, pH 7,4, 25°C	94
Figura 37: Diferentes espectros de fluorescência hipotéticos: (A) espectro de fluorescência de excitação (ex); (2) espectro de fluorescência de emissão (em); e (3) espectro de fluorescência síncrona. As esferas verdes e vermelhas representam o status do monocromador sendo “scaning” ou fixo, respectivamente.	95
Figura 38: Avaliação da interação entre a urease e o aduto de Biginelli 4e por meio de fluorescência síncrona. Titulação fluorimétrica da urease com o aduto de Biginelli AcB-e utilizando (A) $\Delta\lambda = 15$ nm e (C) $\Delta\lambda = 60$ nm. Linearização da equação de Stern-Volmer da titulação empregando (B) $\Delta\lambda = 15$ nm e (D) $\Delta\lambda = 60$ nm. Condições: tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, 25°C.	96
Figura 39: Espectros de absorção molecular UV-vis para os sistemas avaliados: AcB-e (10 μ M), urease (10 μ M), e urease + AcB-e. Condições: tampão de fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, 25°C.	97
Figura 40: Espectro de absorção UV-vis para avaliar a complexação de derivados AcB-e com íons Ni ²⁺ em solução. Condições: tampão de fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, 25°C.	98
Figura 41: Proposta mecanística para interação do inibidor AcB-e com os íons de Ni ²⁺ no sítio ativo da urease.	99
Figura 42: Derivados de Selenoureias com atividade antifúngica pronunciada.	102
Figura 43: Derivados de selenoureia com alta seletividade e atividade antifúngica. Os valores de MIC são expressos em μ g.mL ⁻¹ e correspondem as cepas M. pachydermatis (Mp), M. furfur (Mf) e M. globosa (Mg), respectivamente.	103
Figura 44: Derivados de ebselen com alta atividade fungicida. MIC em μ g.mL ⁻¹ e correspondem as cepas C. albicans (Ca) e A. niger (An), respectivamente.	104
Figura 45: Derivado quinolínico contendo selênio com alta atividade fungicida e benzoiltiourea combinada com anfotericina B.	105
Figura 46: Estruturas químicas das benzoilselenoureias incluídas no escopo do trabalho.	108
Figura 47: Estruturas químicas dos adutos de Biginelli avaliados quanto à inibição fúngica.	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados de caracterização do composto ABS-b comparados com os descritos na literatura	45
Tabela 2: Condições reacionais testadas sem sucesso para obtenção dos adutos de Biginelli derivados da selenoureia.....	46
Tabela 3: Dados de caracterização do composto ABSM-e comparados com os descritos na literatura	49
Tabela 4: Dados de caracterização do composto ABSe-b comparados com os descritos na literatura	55
Tabela 5: Parâmetros cinéticos para a reação enzimática ureia-urease na presença do inibidor ABSe-c	66
Tabela 6: Resultados de inibição de ureases por ácidos borônicos	75
Tabela 7: Dados de caracterização do composto AcB-a comparados com os descritos na literatura	80
Tabela 8: Dados de caracterização do composto AcB-d comparados com os descritos na literatura	82
Tabela 9: IC ₅₀ e constantes cinéticas determinados para os Adutos de Biginelli borônicos.....	88
Tabela 10: Parâmetros de ligação entre o aduto de Biginelli AcB-e com urease. Condições: tampão fosfato de sódio pH 7,4 (20 mM).	92
Tabela 11: Parâmetros termodinâmicos do sistema urease-AcB-e.....	93
Tabela 12: Parâmetros associados com os espectros de fluorescência tridimensional (3D) para a interação entre a urease e o inibidor AcB-e.....	94
Tabela 13: Parâmetros de ligação para titulação por fluorescência síncrona entre urease com o inibidor AcB-e. Condições: tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7.4, 25°C	95
Tabela 14: A razão entre a constante de ligação com a urease com o aduto de Biginelli AcB-e na ausência (K _b) e na presença de inibidores competitivos clássicos (K _b ')	98
Tabela 15: Parâmetros de FRET para a interação entre o inibidor AcB-e e a urease na proporção 1:1 e 1:2 (enzima: inibidor).....	100
Tabela 16: Dados de caracterização do composto BSU-6 comparados com os descritos na literatura	110
Tabela 17: Atividade antifúngica de Benzoltioureas (BTU) e Benzolselenioureias (BSU) contra o crescimento de <i>Cryptococcus neoformans</i> H99 e ação inibitória sobre a atividade da urease fúngica.	114
Tabela 18: Atividade antifúngica de Adutos de Biginelli contra o crescimento de <i>Cryptococcus neoformans</i> H99 e ação inibitória sobre a atividade da urease fúngica	117

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Reação de hidrólise da ureia mediada pela urease e formação de NO_2^- e NO_3^- a partir da formação de íon amônio.	21
Esquema 2: Intermediários possivelmente envolvidos no mecanismo de formação dos adutos de Biginelli.	36
Esquema 3: Mecanismo, considerando a catálise ácida, da reação de Biginelli via formação do intermediário imínio.	37
Esquema 4: Síntese de adutos de Biginelli derivados da selenoureia.	38
Esquema 5: Síntese de selenoureias pirimidínicas em três etapas proposta por Barbosa e colaboradores.	39
Esquema 6: Metodologia de síntese de adutos de Biginelli contendo selênio em três etapas. ..	47
Esquema 7: Mecanismo de reação da formação do aduto de Biginelli contendo a porção selenoureia.	52
Esquema 8: Tentativa de síntese de adutos de Biginelli derivados de selênio por meio da reação com super hidreto.	53
Esquema 9: Rota sintética e proposta mecanística para a síntese do aduto de Biginelli contendo selênio derivado do 2-hidroxibenzaldeído. a) rendimento da etapa; b) rendimento global.	55
Esquema 10: Equilíbrio iônico de ácidos borônicos em solução aquosa. a) Ácidos borônicos como ácido de Lewis; b) Ácidos borônicos como ácido de Brønsted–Lowry.	71
Esquema 11: Reação de oxidação do pró-fármaco que leva à formação da camptotecina.	73
Esquema 12: Mecanismo de formação dos adutos de Biginelli catalisada por CeCl_3	79
Esquema 13: Mecanismo de síntese das benzoilselenoureias.	109
Esquema 14: Esquema reacional da síntese das BSUs e os produtos obtidos com seus rendimentos.	110

SUMÁRIO

1. A urease	17
1.1 Urease na agricultura	20
1.2 Microrganismos ureolíticos patógenos	22
1.2.1 <i>Helicobacter pylori</i>	22
1.2.2 <i>Proteus Mirabilis</i>	23
1.2.3 <i>Cryptococcus neoformans</i>	23
2. Objetivo Geral	25
CAPÍTULO I - Compostos orgânicos de selênio: Obtenção de adutos de Biginelli derivados da selenourea e avaliação do potencial inibitório de ureases	26
1.1 Introdução.....	26
1.1.1 Compostos orgânicos de selênio e suas atividades biológicas	26
1.1.2 Adutos de Biginelli: reações multicomponentes, atividades biológicas e mecanismos.....	31
1.1.2.1 Reações multicomponentes.....	31
1.1.2.2 Síntese e atividade biológica de Adutos de Biginelli.....	32
1.1.2.3 O mecanismo da reação de Biginelli.....	35
1.1.2.4 Síntese e atividades biológicas de adutos de Biginelli derivados da selenourea ...	37
1.2 Objetivos	41
1.3 Resultados e Discussão.....	42
1.3.1 Síntese e caracterização dos adutos de Biginelli	42
Síntese e caracterização dos adutos de Biginelli derivados da ureia e tiourea	42
Síntese e caracterização dos adutos de Biginelli derivados da selenourea	45
1.3.2 Testes de inibição de urease por adutos de Biginelli.....	58
1.3.3 Parâmetros cinéticos de reações enzimáticas	62
1.3.4 Determinação dos parâmetros cinéticos da inibição da urease pelo selenomonastrol.....	64
1.4 Conclusões.....	68
CAPÍTULO II - Obtenção de Adutos de Biginelli derivados de ácidos borônicos e a influência do grupo no potencial inibitório de ureases	70
2.1 Introdução.....	70
Interesse medicinal em compostos orgânicos derivados de ácido borônico	70
2.2 Objetivos	76
2.2.1 Objetivos gerais	76
2.2.2 Objetivos específicos	76
2.3 Resultados e Discussões	77
2.3.1 Síntese e caracterização dos adutos de Biginelli derivados de ácidos formilborônicos	77

2.3.1.1 Síntese e caracterização dos adutos de Biginelli borônicos derivados da ureia	78
2.3.1.2 Síntese e caracterização dos adutos de Biginelli borônicos derivados da tiourea	81
2.3.2 Testes de inibição de urease por adutos de Biginelli borônicos	84
2.3.3 Determinação dos parâmetros cinéticos e do mecanismo de inibição dos adutos de Biginelli borônicos	86
2.3.4 Estudos biofísicos da interação entre os adutos de Biginelli borônicos e a urease <i>Canavalia ensiformis</i>.....	88
2.3.4.1 Estudos de interação e parâmetros termodinâmicos	88
2.3.4.2 Avaliação das mudanças conformacionais na urease	93
2.3.4.3 Avaliação da formação do complexo enzima-inibidor por meio de espectroscopia UV-vis	96
2.3.4.4 Avaliação da interação do inibidor AcB-e com o sítio ativo da urease	97
2.3.4.5 Transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET)	99
2.4 Conclusões.....	100
CAPÍTULO III - Compostos orgânicos de selênio na inibição da urease fúngica de <i>Cryptococcus neoformans</i>	102
3.1 Introdução.....	102
3.1.1 Compostos orgânicos de selênio como alternativas terapêuticas para tratamento de infecções fúngicas	102
3.1.2 <i>Cryptococcus neoformans</i>: alternativas no tratamento de um fungo ureolítico	104
3.2 Objetivos	107
3.2.1 Objetivos gerais	107
3.2.1 Objetivos específicos	107
3.3 Resultados e Discussão.....	108
3.3.1 Síntese e caracterização das benzoilselenoureas.....	108
Síntese e caracterização das BSU selecionadas	108
3.3.2 Sessão A: Testes biológicos das BSUs e BTUs envolvendo o fungo ureolítico <i>C. neoformans</i>	112
3.3.2.1 Atividade antifúngica de BSU e BTU em <i>Cryptococcus neoformans</i>	112
3.3.2.2 Inibição da atividade da urease do extrato protéico de <i>Cryptococcus neoformans</i>	112
3.3.3 Sessão B: Testes biológicos dos adutos de Biginelli envolvendo o fungo ureolítico <i>C. neoformans</i>	116
3.3.3.1 Atividade antifúngica de Adutos de Biginelli em <i>Cryptococcus neoformans</i>	116
3.4 Conclusões.....	120
4. Conclusões gerais.....	122
5. Experimental	124
5.1 Técnicas Espectroscópicas e Espectrométricas	124
5.1.1 Espectroscopia no Infravermelho.....	124

5.1.2 Faixas de fusão.....	124
5.1.3 Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HR-MS)	124
5.1.4 Ressonância Magnética Nuclear	124
5.1.5 Titulação espectrofluorimétrica	124
5.2 Reagentes e solventes	124
5.3 Análise estatística dos resultados de atividade anti-ureolítica in-vitro.....	125
5.4 Síntese e caracterização	125
REFERÊNCIAS	137
APÊNDICE.....	147

Introdução Geral

1. A urease

A urease (E.C. 3.5.1.5) é uma enzima pertencente à classe das aminoidrolases, possui dois íons Ni^{2+} no sítio ativo, o que a faz uma enzima níquel-dependente. Essa enzima pode ser encontrada em plantas, algas, fungos, bactérias e em solos. A principal ação da urease é catalisar a hidrólise da ureia (1), a enzima acelera o processo em, aproximadamente, 10^{14} vezes levando à formação de amônia (2) e ácido carbônico (3) (Figura 1).¹

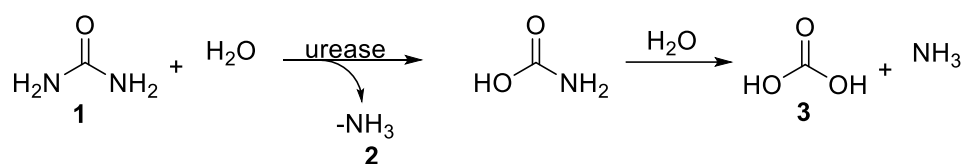


Figura 1: Hidrólise enzimática da ureia.

O histórico de descobertas importantes em torno da urease é robusto e guiou estudos posteriores com enzimas. O primeiro microrganismo ureolítico isolado foi o *Micrococcus ureae*, em 1864, por Van Tieghem². Em 1871, Frédéric Alphonse Musculus isolou a primeira enzima ureolítica, que em 1890 foi denominada de urease.² Em 1926, James B. Summer, isolou de sementes de jack bean (*Canavalia ensiformis*) os primeiros cristais de urease.³ Este trabalho foi pioneiro, e permitiu concluir que enzimas são constituídas por cadeias proteicas. Em 1946 Summer foi laureado com o prêmio Nobel em química por essa descoberta.

No entanto, apenas em 1975 o sítio ativo da urease foi determinado. Dixon e colaboradores determinaram a presença de dois íons de Ni^{2+} na urease a partir de experimentos de espectroscopia de absorção de raios-X. Além disso, os resultados obtidos por espectroscopia de UV-vis sugeriram que a atividade catalítica da enzima dependia intrinsecamente dos átomos de níquel. Foi o primeiro trabalho que relacionou átomos de níquel a processos biológicos.⁴

A estrutura da urease de *jack bean* foi relatada em 2010, 85 anos depois de ser isolada por Summer (Figura 2, pág. 18). Ureases de diferentes fontes também foram alvos de estudos estruturais, a partir deles foi possível identificar que diferentes ureases apresentam pelo menos 55% de similaridade estrutural e que em todas as ureases a ação catalítica se deve aos íons de níquel no sítio ativo.¹

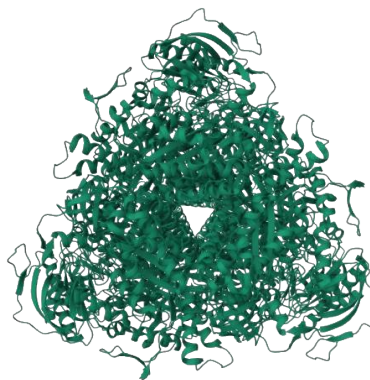


Figura 2: Enzima urease jack bean (*Canavalia ensiformis*). Fonte: PDB 3LA4.

As ureases desempenham papéis importantes tais como, atuar na proteção de plantas contra predadores e patógenos. Estudos relataram a ativação de plaquetas sanguíneas de coelhos e, também, o seu papel importante na microbiota oral podendo prevenir o desenvolvimento de cáries. Além disso, em processos de construção civil a ação catalítica da urease é aplicada na precipitação de calcita por meio do aumento do pH.^{1,5,6}

O principal substrato da urease é a ureia, a primeira molécula orgânica a ser sintetizada. Friedrich Wöhler, em 1828, isolou a ureia do meio de reação entre cianeto de prata e cloreto de amônio. Para a época a síntese foi muito importante, pois foi o contraponto que desvalorizou a Teoria da Força Vital, teoria que afirmava que compostos orgânicos só eram sintetizados no interior de organismos vivos.

No corpo humano, a ureia é produzida a partir da degradação de proteínas, transportada pela corrente sanguínea e excretada pela urina. A ureia é considerada um componente benigno que não apresenta nenhum papel aparente na manutenção dos tecidos. No entanto, em locais que podem ser colonizados por microrganismos patogênicos e ureolíticos o metabolismo da ureia passará pela urease bacteriana, alterando o pH de microambientes, o que traz prejuízos à saúde humana.^{7,1,8}

A presença da ureia na agricultura é massivamente difundida, sendo ela o fertilizante mais utilizado mundialmente. Segundo a EMBRAPA, em 2022, o Brasil importou 7,23 milhões de toneladas de ureia.⁹ Vale ressaltar que a urease também está presente em solos por meio de microrganismos. Atualmente, esforços são feitos para o desenvolvimento de inibidores de urease e outras tecnologias que mitiguem os efeitos da urease tanto na medicina quanto na agricultura.

O consenso sobre as etapas catalíticas no mecanismo da urease mudou através das décadas e até hoje está sob debate. Em 1970, Dixon, Blakeley e Zerner propuseram as etapas

mecanísticas de hidrólise da ureia catalisada, demonstrando a necessidade de dois íons de Ni^{2+} para realizar sua atividade catalítica.⁴

A ordem de formação dos produtos e os resíduos de aminoácidos que participam, e o modo como participam do mecanismo de hidrólise da ureia ainda é foco de discussão na comunidade científica, no entanto, a ação do centro ativo da enzima que considera os íons Ni^{2+} essenciais para a reação é consensual. O mecanismo proposto por Benini e colaboradores é o mais aceito atualmente e está ilustrado na Figura 3 (pág. 20).^{10,11}

A etapa inicial da reação é a coordenação da ureia em um dos íons Ni^{2+} da urease por meio dos pares de elétrons não ligantes da carbonila, concomitantemente observa-se o deslocamento de 3 moléculas de água (Figura 3-B, pág. 20). Na segunda etapa, o segundo íon Ni^{2+} é coordenado pelos pares de elétrons de uma unidade do grupo NH_2 da ureia, levando à formação de um anel de seis membros (Figura 3-C, pág. 20). Em seguida, os pares de elétrons do oxigênio, que atuam como ponte entre os dois átomos de Ni^{2+} , atacam como nucleófilo adicionando-se à carbonila (Figura 3-D, pág. 20). É formado um intermediário tetraédrico que evolui através de uma transferência de próton do grupo OH da ponte entre os átomos de níquel para o grupamento NH_2 da ureia, gerando o primeiro equivalente de amônia (Figura 3, pág. 20). A adição de 4 moléculas de água no centro metálico libera então uma molécula de amônio e uma molécula de carbamato que é decomposto em NH_3 e CO_2 e a estrutura do sítio ativo da enzima é regenerada (Figura 3-A, pág. 20).^{10,12}

O mecanismo de Benini, também conhecido como “mecanismo de hidróxido de ponte” foi alvo de críticas iniciais entre a comunidade bioinorgânica, que consideraram negativa a ideia de um nucleófilo duplamente coordenado. No entanto, logo após esta hipótese ter sido proposta, foram relatados dois estudos que pareciam corroborar isto. Um estudo relatou e discutiu a estrutura cristalina da urease de *Sporosarcina pasteurii* (SPU) em complexo com fosfato¹³ e outro descreveu uma abordagem computacional para o mecanismo enzimático.¹⁴

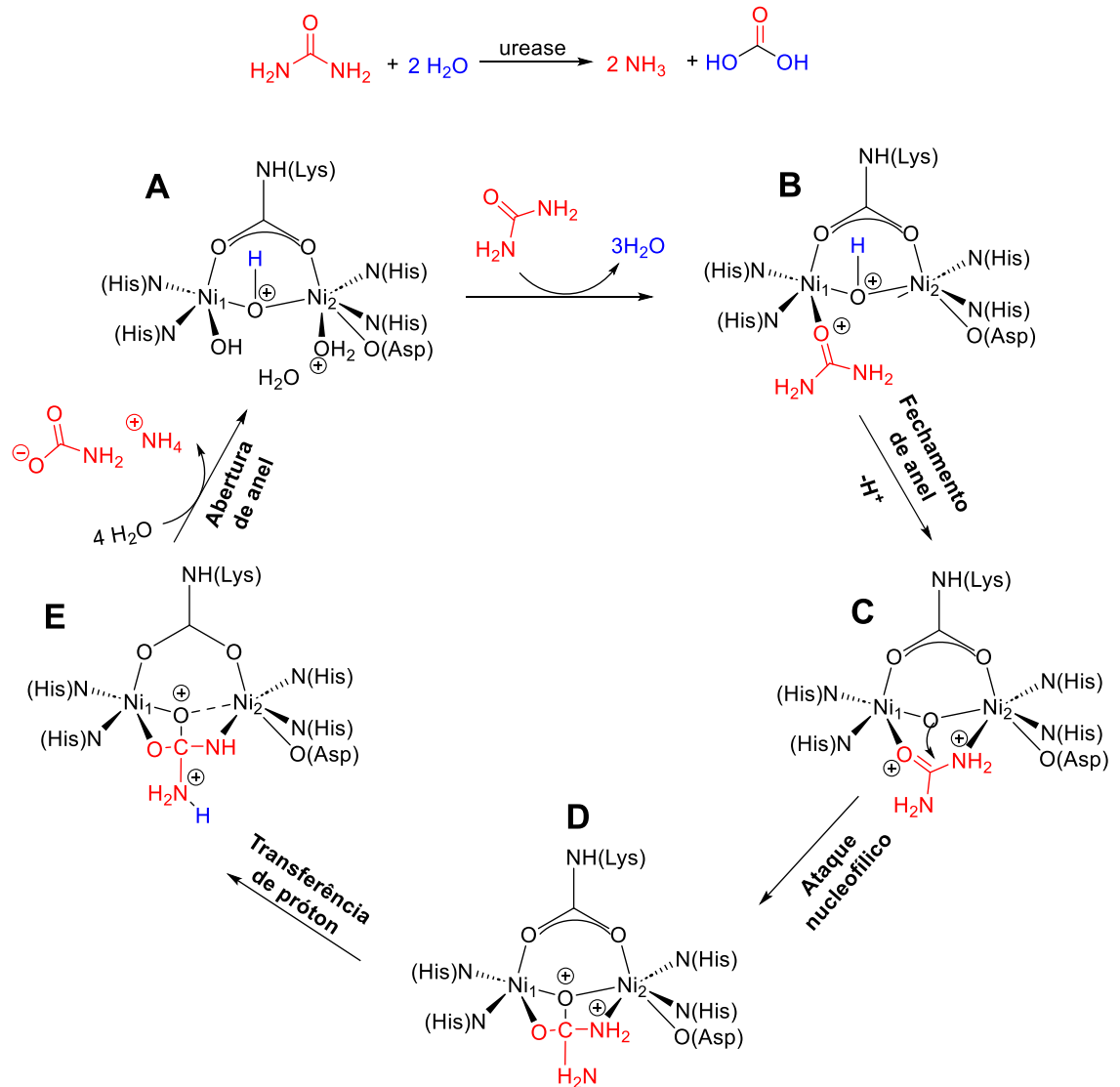


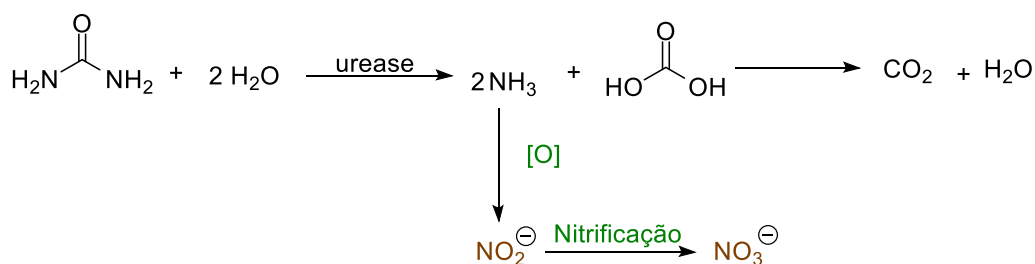
Figura 3: Mecanismo da reação de hidrólise da ureia catalisada pela urease. Adaptado de Benini *et. al.*.

1.1 Urease na agricultura

De acordo com o Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada da Universidade de São Paulo (Cepea-USP) e a Confederação Nacional da Indústria, em 2023, o Produto Interno Bruto (PIB) do agronegócio brasileiro foi de R\$ 2,63 trilhões, o que corresponde a 24,1% do PIB brasileiro. No Brasil, grandes extensões de terras são dedicadas às plantações de alimento, sendo o país o primeiro produtor do mundo no ranking de soja, açúcar e café. Como consequência, hoje o Brasil é o quarto maior consumidor de fertilizantes no mundo, sendo que os mais utilizados são os do tipo NPK constituídos, de nitrogênio, fósforo e potássio.¹⁵

Os insumos agrícolas à base de nitrogênio são historicamente os mais utilizados. Sendo que, dentre esses, a ureia é a fonte de nitrogênio mais utilizada no mundo. O amplo uso da ureia justifica-se por seu alto teor de nitrogênio (46%), alta solubilidade em água, compatibilidade com outros fertilizantes, facilidade de estocagem e baixa toxicidade.¹⁶

A presença de ureases no solo gera inconvenientes significativos ao uso da ureia como fertilizantes. A hidrólise acelerada do insumo resulta na formação de CO_2 e NH_3 , e reações posteriores levam à formação de N_2O , NO , NO_2^- , NO_3^- , por meio de processos de oxidação e nitrificação da amônia. Estima-se que cerca de 30 a 50% da ureia depositada em solos como fertilizante é perdida por meio de volatilização de amônia, o que representa um considerável prejuízo financeiro. No Esquema 1 está representado a reação de hidrólise da ureia e a transformação do íon amônio nos derivados nitrogenados. Essas transformações têm como consequência emissão gases de efeito estufa, a poluição dos solos e da água, e a menor absorção de nitrogênio por parte das culturas.^{17,18}



Esquema 1: Reação de hidrólise da ureia mediada pela urease e formação de NO_2^- e NO_3^- a partir da formação de íon amônio.

A produção de alimentos em quantidade adequada e o desenvolvimento sustentável de práticas agrícolas são desafios atuais devido ao aumento da população em condição de insegurança alimentar e, também, devido às previsões de aumento da população mundial nos próximos anos. O número de pessoas afetadas pela fome em 2021 foi de 828 milhões, um aumento de 46 milhões desde 2020 e 150 milhões desde o início da pandemia de Covid-19. Além disso, conforme o Relatório da Organização das Nações Unidas (ONU) de 2019, a população mundial em 2050 será de 9,7 bilhões de pessoas. Esses números mostram que novas maneiras de produção serão necessárias para que todas as pessoas sejam alimentadas, e além disso essa produção deve ser sustentável.^{19,20}

O desenvolvimento de tecnologias voltadas para a produção de novos fertilizantes, bioestimulantes, inibidores de urease e fertilizantes de maior eficiência são passos prioritários previstos no Plano Nacional de Fertilizantes de 2021, uma vez que 85% dos fertilizantes utilizados nos solos brasileiros são provenientes de importação e novas tecnologias são

necessárias para que o desenvolvimento agrícola brasileiro se torne mais sustentável e independente.²¹

1.2 Microrganismos ureolíticos patógenos

A urease é reconhecida como um fator de virulência de microrganismos patógenos causadores de infecções em seres humanos, como *Helicobacter pylori*, responsável por causar gastrites e úlceras no estômago, *Proteus mirabilis*, bactéria responsável por infecções urinárias e formações de pedras nos rins, e *Cryptococcus neoformans*, patógeno causador da meningite.^{22,7,23,8}

O mecanismo de ação da urease nestas infecções microbianas está relacionado à presença de ureia no corpo humano, proveniente da digestão de aminoácidos, e é distribuída por órgãos como estômago, rins e até mesmo o sistema nervoso central. Desta forma, microrganismos patogênicos podem utilizar a ureia como fonte de nitrogênio, e a ação da urease sob o substrato leva à formação de amônia e dióxido de carbono. No meio fisiológico, a presença de amônia leva ao aumento do pH, interferindo no funcionamento normal do indivíduo infectado.²⁴

1.2.1 *Helicobacter pylori*

A *H. pylori* é uma espécie de bactéria que pode colonizar a mucosa do estômago do ser humano. As infecções causadas por essa bactéria resultam em lesões que podem evoluir para condições graves como úlcera, gastrite crônica e, em casos mais severos, câncer de estômago. Estima-se que 50% da população mundial desenvolva doenças atreladas a infecção por *H. pylori*.²⁵

A urease e a presença de ureia no estômago estão intrinsecamente relacionadas ao modo de sobrevivência da bactéria neste ambiente. O meio ácido do estômago não permitiria a sobrevivência e a manutenção da vida da bactéria por muito tempo; no entanto, a atividade ureolítica da enzima resulta na formação de amônia, que leva à alcalinização em microambientes onde a bactéria está localizada. Essa alteração de pH do meio permite a sobrevivência e proliferação da bactéria no estômago. Além disso, estudos também sugeriram que a urease tem propriedades pró-inflamatória que contribuem para a progressão da infecção por *H. pylori*.^{26,27}

1.2.2 *Proteus Mirabilis*

A *P. mirabilis* é uma bactéria amplamente distribuída no meio-ambiente e responsável por infecções do trato urinário. Infecções causadas por essa bactéria são comuns em ambiente hospitalar e em comunidades. A patologia pode afetar órgãos como rins, uretra e bexiga. Estima-se que as infecções urinárias acometam 150 milhões de pessoas no mundo a cada ano, sendo a maioria mulheres.²⁸

Infecções urinárias podem ser causadas por diferentes bactérias, a bactéria ureolítica *P. mirabilis* é uma delas. A instalação da infecção deve-se, entre outros fatores, à virulência da urease; a alcalinização do ambiente ocasionada pela formação de amônia não só permite a sobrevivência da bactéria, como também possibilita a formação de cálculos.²⁹

1.2.3 *Cryptococcus neoformans*

O fungo *C. neoformans* é o principal patógeno causador da meningite e a contaminação ocorre por inalação dos esporos. Indivíduos imunossuprimidos, devido infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), que apresentam quadros de pancreatite, diabetes e pacientes com longa permanência na UTI são altamente vulneráveis a este tipo de infecção. A meningite criptocócica e a meningoencefalite fazem parte das principais causas de morte de pacientes HIV positivos.³⁰

Devido a estas preocupações, estudos foram desenvolvidos e apontaram que a urease expressada pelo *C. neoformans* está envolvida em diferentes processos metabólicos do fungo. A alteração do pH fisiológico leva à redução da acidez e maturação de fagolisossomos em células fagocíticas, resultando na resistência à morte de patógenos e antígenos. A liberação de amônia pode ocasionar outras doenças sistêmicas. Outros estudos sugerem também que a ação da urease expressada pelo fungo pode promover sequestro microvascular, levando, subsequentemente, a estágios mais severos de meningite devido à maior invasão do sistema nervoso central.^{25,31,32}

Além da ação de virulência da urease, essas infecções ainda tem em comum a característica de multirresistência à antimicrobianos (antibióticos e antifúngicos). Isso significa que essas infecções se tornaram mais difíceis ou impossíveis de tratar com os medicamentos disponíveis. Além disso, aumentar a propagação de doenças, a dificuldade no tratamento também acarreta no agravamento das doenças e, em casos mais extremos, essas infecções levam à morte. O desenvolvimento de terapias alternativas aos antimicrobianos faz parte das diretrizes preconizadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS).³³

O uso de inibidores de urease no tratamento de infecções é uma alternativa aos antimicrobianos, no entanto, ainda é pouco aplicado. Apenas o ácido aceto-hidroxâmico (4- Figura 4) teve seu uso aprovado nos Estados Unidos pela *Food and Drug Administration* (FDA) como medicamento para tratamento de infecções urinárias causadas por *P. mirabilis*. No Brasil o uso desse medicamento não é aprovado pela ANVISA devido aos efeitos teratogênicos que podem acometer os usuários.³⁴

Na agricultura, o inibidor de urease mais utilizado em escala mundial é o *N*-(*n*-butil) tiofosforórico triamida (NBPT) (5- Figura 4). É um inibidor análogo da ureia e que contém um átomo de fósforo em sua estrutura. É comercializado desde a década de 1990 e hoje é o princípio ativo de vários insumos agrícolas que podem ser utilizados com aditivos agrícolas ou como revestimento da ureia. O Brasil não produz este aditivo, de forma que o seu uso em solos nacionais depende de importação.^{16,35}

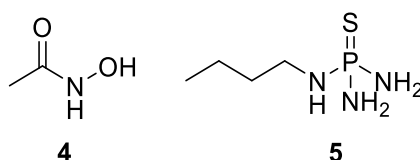


Figura 4: Estruturas químicas dos inibidores de urease ácido aceto-hidroxâmico e NBPT.

Para mitigar os efeitos deletérios da urease, o desenvolvimento de inibidores de urease é um passo necessário para o aumento da qualidade de vida de indivíduos infectados por microrganismos ureolíticos e, também, representa parte dos esforços necessários para a garantia da segurança alimentar nos próximos anos.

Desde o século passado muitos inibidores, com destaque para análogos de ureia e tioureia, ácidos hidroxâmicos, complexos metálicos e heterociclos nitrogenados, foram relatados. No entanto, mesmo para aqueles com excelentes atividades inibitórias, ainda não são aplicados como terapias alternativas nos tratamentos de infecções microbianas ou na agricultura.^{36,37,18}

Diferentes inibidores de urease interagem de maneiras distintas com os sítios da enzima, em geral, inibidores de urease realizam ligações de hidrogênio, possuem átomos capazes de complexarem com os íons de níquel do centro ativo e tem estruturas trigonais planares similares a da ureia.^{38,39} Diferentes classes de compostos foram relatadas como inibidores de urease, alguns exemplos, ilustrados na Figura 5 são tioureias, benzoiltioureias, diidropirimidinonas, bases de Schiff, triazóis e produtos naturais como flavonóides, cumarinas e quinonas. No

entanto, a aplicação desses compostos não foi viabilizada por diferentes razões, como por exemplo, apresentarem toxicidade ao meio ambiente.^{16,23}

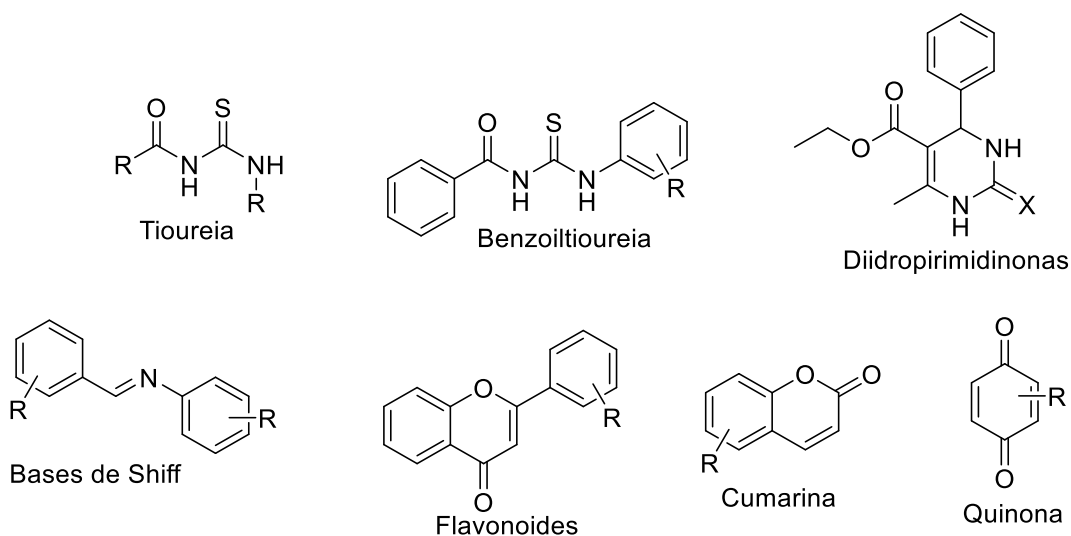


Figura 5: Estruturas químicas básicas de inibidores de urease

Neste sentido, o desenvolvimento de novos inibidores de urease é uma estratégia promissora para contornar problemas ocasionados pela ação da enzima tanto no contexto agrícola quanto no medicinal. Além disso, conhecer por quais mecanismos os inibidores atuam também é importante, pois essas informações contribuem para o desenvolvimento de inibidores mais eficientes.

2. Objetivo Geral

Realizar a síntese e caracterização de adutos de Biginelli contendo selênio, derivados do ácido borônico e benzoilselenoureias. Além disso, investigar o potencial inibitório destes compostos frente a dois tipos de urease e analisar o mecanismo de inibição da enzima urease *in vitro*, utilizando métodos de colorimetria e de fluorescência.

As diidropirimidinonas^{40,41,42} e as benzoilthioureas⁴³, mencionados anteriormente, são classes de compostos que foram relatadas como eficientes inibidores de urease. Este trabalho objetiva investigar a atividade antiureolítica desses compostos modificados sinteticamente para conter átomos de selênio ou boro, a fim de avaliar a atividade antiureolítica e comparar com os inibidores análogos conhecidos.

CAPÍTULO I - Compostos orgânicos de selênio: Obtenção de adutos de Biginelli derivados da selenoureia e avaliação do potencial inibitório de ureases

1.1 Introdução

1.1.1 Compostos orgânicos de selênio e suas atividades biológicas

Selênio é um elemento químico classificado como calcogênio, pertence ao grupo 16 da Tabela Periódica, junto com oxigênio, enxofre, telúrio e polônio. Foi descoberto em 1817 pelo químico sueco Jöns Jacob Berzelius, que também batizou o elemento como uma homenagem à deusa da Lua, Selene.⁴⁴

Inicialmente reconhecido como um elemento tóxico, apenas 150 anos depois de sua descoberta o papel essencial do selênio no organismo de animais foi estabelecido. Em 1957 Klaus Schwartz e Calvin Foltz identificaram o selênio como responsável por prevenir lesões no fígado, vasos sanguíneos e músculos de camundongos e frangos.⁴⁵

Desde a descoberta de Schwartz e Foltz a presença de selênio no corpo humano foi largamente investigada, até que em 1973 Hoekstra e colaboradores identificaram que o selênio é essencial para a ação antioxidante da enzima glutathione peroxidase. Posteriormente, Flohé e colaboradores determinaram que a enzima purificada possui um átomo de selênio por subunidade. Assim, a primeira selenoproteína humana foi identificada,⁴⁶ e em 1980 o selênio foi, pela primeira vez, considerado benéfico para a saúde humana e teve sua deficiência associada a doenças.

Na natureza, o selênio se apresenta de diferentes formas, a principal é a selenocisteína, um aminoácido importante para a formação de selenoproteínas, que é encontrado como ligantes de complexos metálicos de molibdênio e níquel. Outra forma importante é a 5-metilanimometil-2-selenouridina encontrada em bactérias, A selenoneína e a selenometionina também são formas comuns do selênio na natureza⁴⁷ (Figura 6, pág. 27).

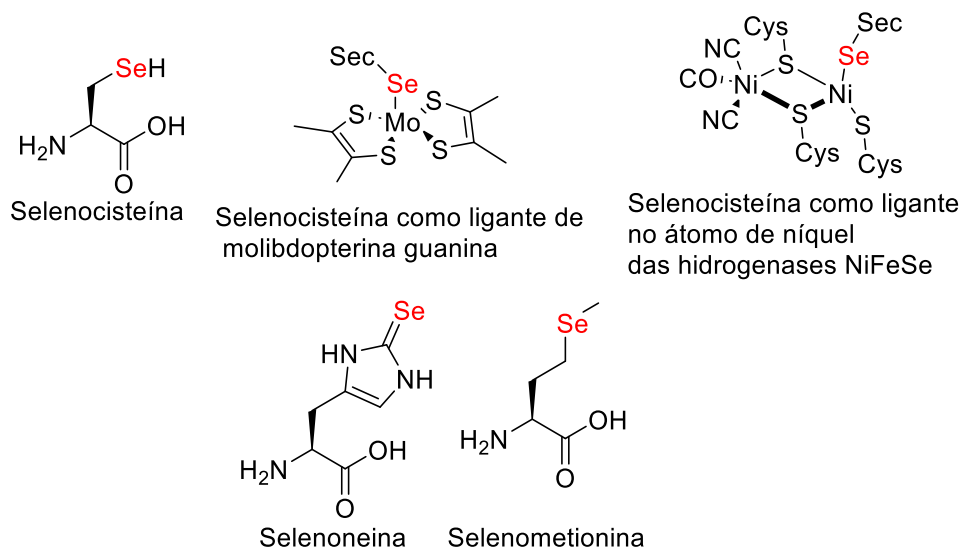


Figura 6: Exemplos de produtos naturais de selênio.

Naturalmente, com a descoberta de biomoléculas de selênio, o interesse por compostos orgânicos sintéticos de selênio com atividades biológicas despontou. Em 1983 o *selenazufurin* foi relatado como agente antiviral⁴⁸ e em 1984, 60 anos após a sua síntese, o *ebselen* (Figura 7, pág. 28) foi relatado como agente mimético da enzima glutathione peroxidase (GPx). O *ebselen* é o composto orgânico de selênio de maior relevância devido ao número de testes clínicos aos quais foi submetido.^{47,48}

Outros exemplos de compostos de selênio sintéticos que apresentam atividade biológica interessante e usados em testes clínicos foram o *ethaselen* e o seleneto ALT2074. O primeiro foi submetido a testes clínicos para o tratamento de células de câncer de pulmão, e o segundo foi identificado como agente mimético da enzima GPx capaz de prevenir alterações endoteliais e lesão de isquemia miocárdica.⁴⁹ Outra classe de moléculas, as selenoureias, também exibiram atividade citotóxica contra células de câncer de mama afirmando mais pronunciadamente o potencial anticâncer de compostos de selênio⁵⁰ (Figura 7, pág. 28).

Do ponto de vista químico, o Se possui uma natureza distinta, que se manifesta em sua presença em diferentes estados de oxidação, sendo mais suscetível à oxidação ou redução por agentes redox em comparação com o enxofre, a selenometionina, por exemplo, participa de reações de oxidação de 10-100 vezes mais rapidamente que a metionina. Essa particularidade permite ao Se desempenhar papéis tanto de nucleófilo quanto de eletrófilo, dependendo do meio de reação em que se encontre.⁵¹

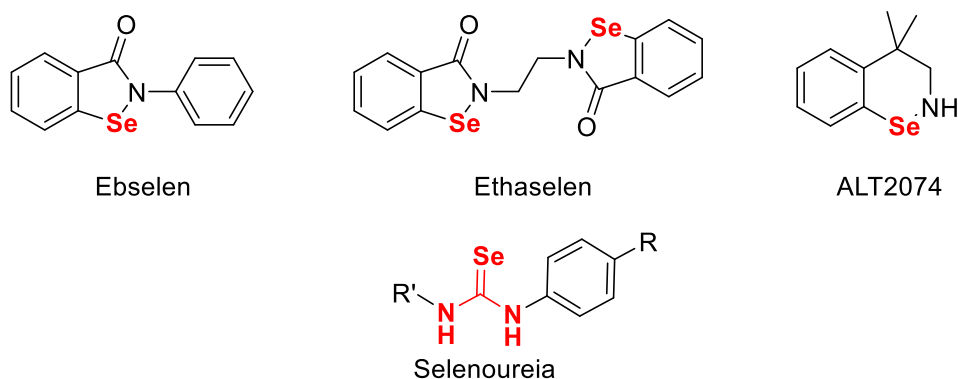


Figura 7: Exemplos de compostos sintéticos orgânicos contendo selênio.

Não por acaso, as diferenças químicas entre o selênio e o enxofre estão muitas vezes associadas a maior atividade biológica de compostos orgânicos de selênio quando comparados aos análogos de enxofre. Algumas dessas características estão elencadas abaixo.^{47,51,52}

- Algumas propriedades químicas do selênio e do enxofre estão relacionadas à diferença de raio atômico desses dois átomos. O maior raio atômico do selênio frente ao enxofre afeta a força de ligação deste elemento com outros átomos, como oxigênio e hidrogênio. No grupo $\text{Se}=\text{O}$, a menor sobreposição orbitalar, comparada à $\text{S}=\text{O}$, resulta em uma força de ligação reduzida, permitindo que o grupo seja mais facilmente reduzido à selenois e selenetos. Da mesma forma, a ligação $\text{Se}-\text{H}$ é mais longa que a $\text{S}-\text{H}$ e por isso observa-se um menor pK_a para a selenocisteína ($\text{pK}_a = 5,24$) frente à cisteína ($\text{pK}_a 8,25$).
- O selênio é mais polarizável que o enxofre, em outras palavras o selênio é uma base de Lewis mais macia, o que permite que o Se seja uma base de Lewis mais eficiente frente a ácidos de Lewis macios, o que é interessante para reações de complexação envolvendo o centro de níquel da urease.
- A maior polarizabilidade do Se confere a fármacos que o contém maior lipofilia e permeabilidade.
- Hidrogênios de selenoamidas são mais ácidos frente aos hidrogênio de tioamidas, e, portanto, selenoamidas são melhores formadoras de ligações de hidrogênio, o que permite melhores interações intermoleculares em meios biológicos.⁵³

As particularidades químicas do selênio atreladas ao potencial biológico de compostos orgânicos contendo este elemento impulsionaram a pesquisa de novas moléculas e de suas aplicações biológicas. A inserção de selênio em moléculas com atividade biológica conhecida emergiu como uma alternativa interessante no *design* de moléculas mais potentes.

Desai e colaboradores demonstraram que a substituição do átomo de enxofre, do composto 6a (Figura 8, pág. 30), um conhecido inibidor de óxido nítrico sintase (HT-29, $IC_{50} > 100 \mu M$; HCT116, $IC_{50} > 100 \mu M$; SW480, $IC_{50} > 100 \mu M$), por selênio, que resulta no composto 6b (Figura 8, pág. 30) aumenta significativamente a atividade antiproliferativa em diferentes linhagens de células tumorais (HT-29, $IC_{50} = 3,84 \mu M$; HCT116, $IC_{50} = 4,72 \mu M$; SW480, $IC_{50} = 5,55 \mu M$).⁵⁴

A presença do selênio também foi importante para a atividade biológica do composto 7b (Figura 8, pág. 30). A selenoureia funcionalizada apresentou, em testes *in vitro*, grande afinidade pelas hCA I, hCA II e hCA IX ($K_i = 6 \text{ nM}$), enquanto que o análogo oxigenado 7a, que foi submetido a testes clínicos (Fase I) apresentou moderada afinidade com as mesmas isoformas das anidrases carbônicas ($K_i = 2028 \text{ nM}$).⁵⁵

Wiles e colaboradores investigaram a atividade antibiótica de compostos análogos ao composto 8b, agente antiestafilocócico, com o objetivo de atenuar a inibição do canal de potássio hERG observada nesse e em outras classes de medicamentos antibacterianos. Foram estudados análogos oxigenados e selenados, e, dentre os compostos avaliados, o selenofeno (8c) apresentou atividade antiestafilocócica comparável à de 8a e 8b (Figura 8, pág. 30). No entanto, 8c mostrou fraca atividade inibitória de hERG, sem citotoxicidade significativa para células normais e com boa estabilidade metabólica.⁵⁶

Arsenyan e colaboradores investigaram a atividade citotóxica em células tumorais do raloxifeno (9a, Figura 8, pág. 30), um modulador seletivo do receptor de estrogênio, e do seu análogo de selênio (9b). Os resultados demonstraram que o composto de selênio tem atividade antiproliferativa mais potente que 9a. Além disso, o composto 9b suprimiu o crescimento tumoral dependente de estrogênio na mama de camundongos xenoinxertados com câncer, enquanto que o raloxifeno foi ineficaz.⁵⁷

Martins e colaboradores relataram que derivados de crisina (10a, Figura 8) e quercetina (11a, Figura 8) 10b-c e 11b-c exibiram atividade citotóxica mais potente que crisina e quercetina. Os derivados contendo selênio, em especial, foram os mais ativos. A crisina (10a) e seus derivados 10b e 10c, por exemplos, exibiram IC_{50} de 50,32, 70,43 e 2,25 μ M, respectivamente, contra células de câncer de mama (MCF-7). De modo semelhante, a quercetina (11a) não inibiu o crescimento celular da linhagem MCF-7, enquanto que seus derivados 11b e 11c apresentaram IC_{50} de 3,08 e 1,31 μ M. Além disso, os derivados de selênio, 10c e 11c, apresentaram atividades semelhantes à GPx de eliminação de DPPH, maior capacidade de superar a resistência à cisplatina e a multirresistência, além de índices de seletividade mais elevados em comparação com seus congêneres de oxigênio e enxofre.⁵⁸

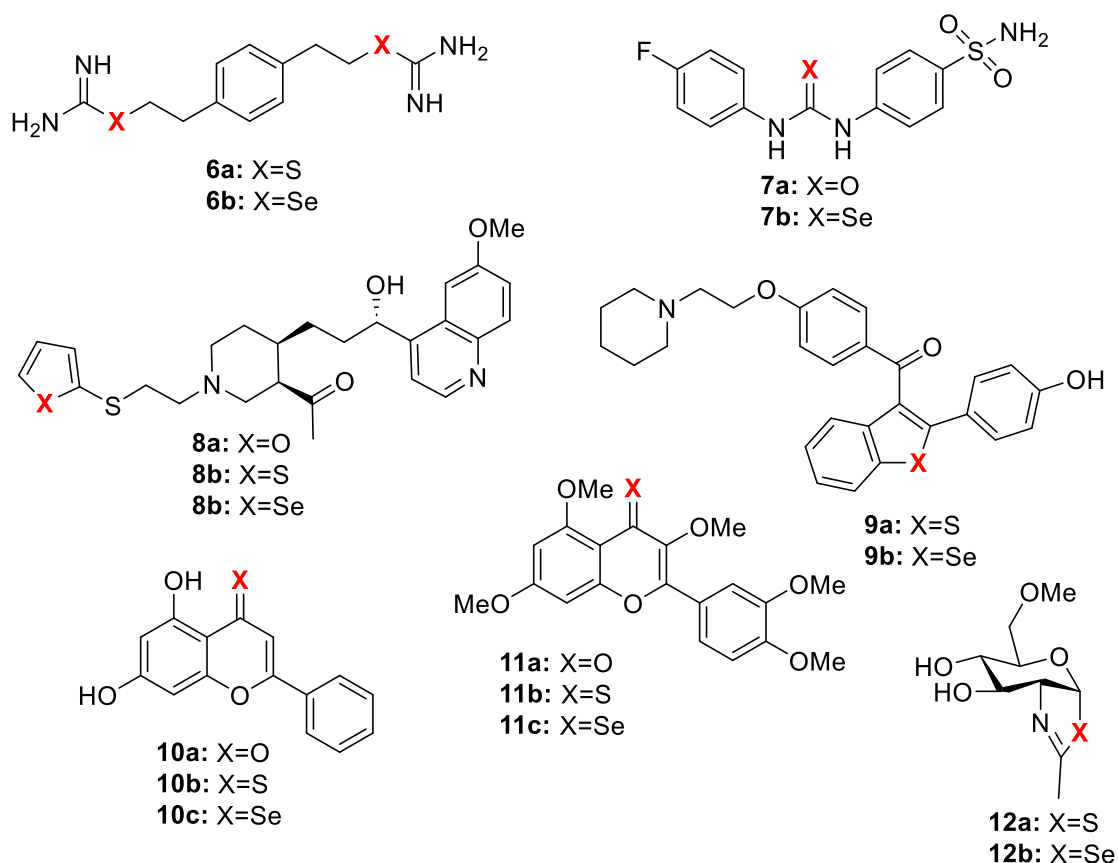


Figura 8: Compostos orgânicos contendo calcogênios com atividade biológica.

Por fim, Kim e colaboradores investigaram a atividade inibitória contra a *O*-GlcNAcase dos compostos 12a e 12b. Os resultados demonstraram que o derivado de selênio é um inibidor mais fraco frente ao composto de enxofre (K_i 70 vezes menor). No entanto, 12b teve efeito na *O*-Glc-*N*-acilação global similar ao de 12a, o que os autores sugerem ocorrer porque 12b pode ser internalizado pelas células mais facilmente do que 12a.⁵⁹

Ainda são raros os exemplos de moléculas orgânicas contendo selênio relatadas como inibidores de urease. No entanto, Macegoniuk e colaboradores demonstraram que heterociclos de selênio e disselenetos baseados no esqueleto estrutural do *ebsele*n exibem significativa inibição de ureases bacterianas, em especial, *H. pylori* e *S. pasteurii*.⁶⁰ Neste ensaio o *ebsele*n foi o mais ativo para *S. pasteurii* e para *H. pylori*, com valores de K_i de $2,11 \pm 0,18$ nM e 226 ± 16 nM, respectivamente.

Esses resultados associados as particularidades químicas da natureza do átomo de selênio atraem o interesse em compostos orgânicos de selênio biologicamente ativos. A troca de enxofre e oxigênio por selênio abre possibilidades sintéticas para o design de novos ativos.

1.1.2 Adutos de Biginelli: reações multicomponentes, atividades biológicas e mecanismos

1.1.2.1 Reações multicomponentes

Reações multicomponentes (RMCs) são aquelas em que três ou mais reagentes formam o produto final sem geração significativa de produtos laterais, caracterizando o que é conhecido como economia atômica (Figura 9). Assim, o produto é formado em uma única etapa de síntese, tornando a metodologia sustentável devido ao menor tempo de reação, bons rendimentos e baixa geração de resíduos. Devido a todas as particularidades citadas somadas a facilidade de obtenção do produto final e, no geral, facilidade de purificação, hoje essa metodologia sintética é aplicada na síntese orgânica de fármacos e agroquímicos.⁶¹

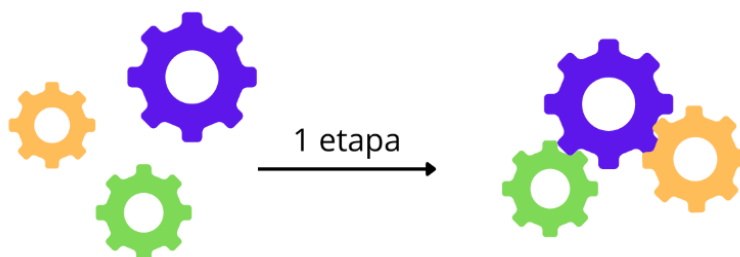


Figura 9: Representação de reação multicomponente com formação de um único produto, em uma única etapa, a partir de três reagentes.

Devido a possibilidade da formação de ligações carbono-heteroátomos em uma etapa, as RMCs são aplicadas na obtenção de heterociclos, cadeias carbônicas cíclicas que são formadas por átomos diferentes de carbono e hidrogênio. Dentro dessa classe, destacam-se os *N*-heterociclos, substâncias nas quais pelo menos um átomo de carbono foi substituído por um átomo de nitrogênio. Alguns exemplos de *N*-heterociclos de ocorrência natural são a nicotina e a cafeína, enquanto as diidropirimidinonas são exemplos de *N*-heterociclos sintéticos obtidos a partir de reações multicomponentes (Figura 10).

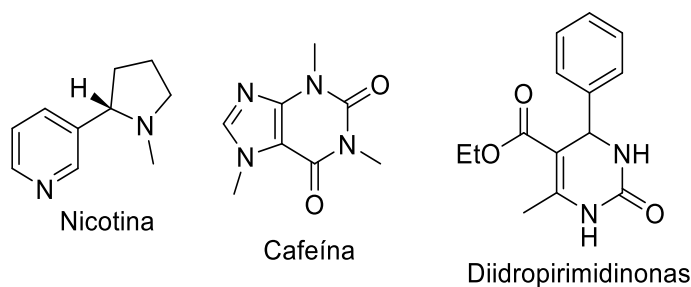


Figura 10: Exemplos de N-heterociclos naturais e sintético.

1.1.2.2 Síntese e atividade biológica de Adutos de Biginelli

As diidropirimidinonas foram sintetizadas pela primeira vez por meio de uma reação multicomponente em 1891 pelo químico italiano Pietro Biginelli, e por isso também são conhecidas como adutos de Biginelli. A reação foi descrita como uma ciclocondensação entre ureia (1), acetoacetato de etila (13), benzaldeído (14) sob catálise de ácido clorídrico (Figura 11)⁶².

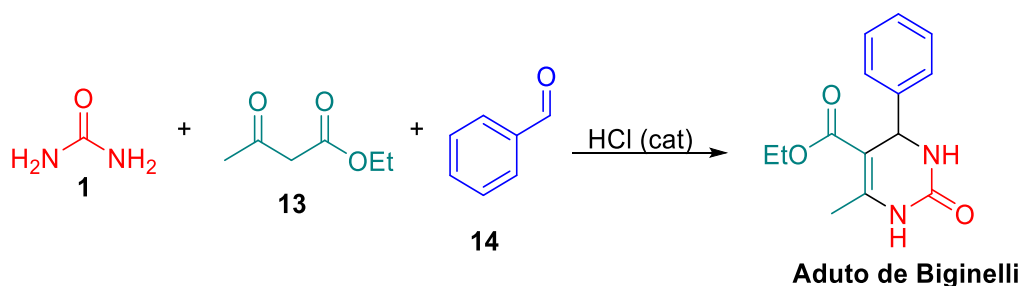


Figura 11: Reação de Biginelli para obtenção de 3,4-diidropirimidin-2(1H)-ona.

Desde a descoberta de Biginelli, a sua reação foi fonte de muitos estudos sendo largamente explorada, o que aumentou a biblioteca de exemplos de diidropirimidinonas relatados e levou a alterações na rota sintética com o uso de novos catalisadores e solventes, bem como sínteses na ausência deles e a aplicação de tecnologia como reator de micro-ondas e ultrassom, o que otimizou o tempo de reação e rendimento final do produto.⁶³

O protagonista da classe de diidropirimidinonas é o monastrol (15, Figura 12, pág. 34). Este composto ganhou notoriedade com o estudo de Meyer e colaboradores, que relatou a atividade inibitória do monastrol sob a enzima Eg5, enzima motora responsável pela formação dos fusos mitóticos, sendo imprescindível para a divisão celular. A Eg5 é um importante alvo terapêutico no tratamento de câncer.⁶⁴

A descoberta do potencial anticancerígeno do monastrol impulsionou outros estudos sobre o potencial biológico de adutos de Biginelli, e hoje além das propriedades anticancerígenas esses compostos se destacam também pela capacidade moduladora de canais de cálcio, bem como suas ações antidiabéticas, anti-inflamatórias, antibióticas e antifúngicas. Além disso, essas substâncias também demonstraram eficiência na inibição da urease.^{40,41,65,66}

Mahgoub *et al.* investigaram a atividade anti-hipertensiva de adutos de Biginelli, avaliando sua capacidade bloqueadora de canais de cálcio. Os compostos 16 e 17 (Figura 12, pág. 34) foram os bloqueadores de canais de cálcio mais potentes apresentando um IC₅₀ de 19,65±1,60 e 20,23±1,79 µg.mL⁻¹, respectivamente, comparáveis à nifedipina, utilizada com padrão de referência (IC₅₀ 21,00±1,20).⁶⁷

Mishra e colaboradores investigaram a atividade anti-inflamatória de derivados de adutos de Biginelli por meio de ensaios *in vivo* de indução de edema em camundongos. Observaram-se que os compostos 18 e 19 foram os mais promissores, exibindo 70,39% e 74,89% de inibição, respectivamente, em 3 horas. Os resultados foram considerados encorajadores por serem comparáveis ao observado para o diclofenaco de sódio (71,30%), utilizado como padrão de referência.⁶⁸

Os adutos de Biginelli também apresentam atividades antimicrobianas. Huseynzada e colaboradores investigaram a atividade antibiótica dessa classe de compostos contra várias cepas bacterianas. Os melhores resultados foram observados para os microrganismos *S. aureus* e *A. baumannii*. Os compostos 20 e 21 demonstraram melhor inibição, exibindo uma concentração inibitória mínima (MIC) de 62,5 µg.mL⁻¹ para ambas as bactérias. Em comparação, os padrões de referência cefotaxima e ceriaxona, apresentam MIC de 250 e 500 µg.mL⁻¹, respectivamente.⁶⁹

Lal investigou a atividade antimicrobiana de uma série de adutos de Biginelli contra os fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Curvularia lunata* e *Trichoderma viride*. Todos os compostos exibiam atividade antifúngica significativa, com os compostos 22 e 23 (Figura 12, pág. 34) destacando-se como os mais ativos, com valores de MIC variando entre 160-40 µM.mL⁻¹ e 20-80 µM.mL⁻¹, respectivamente.⁷⁰

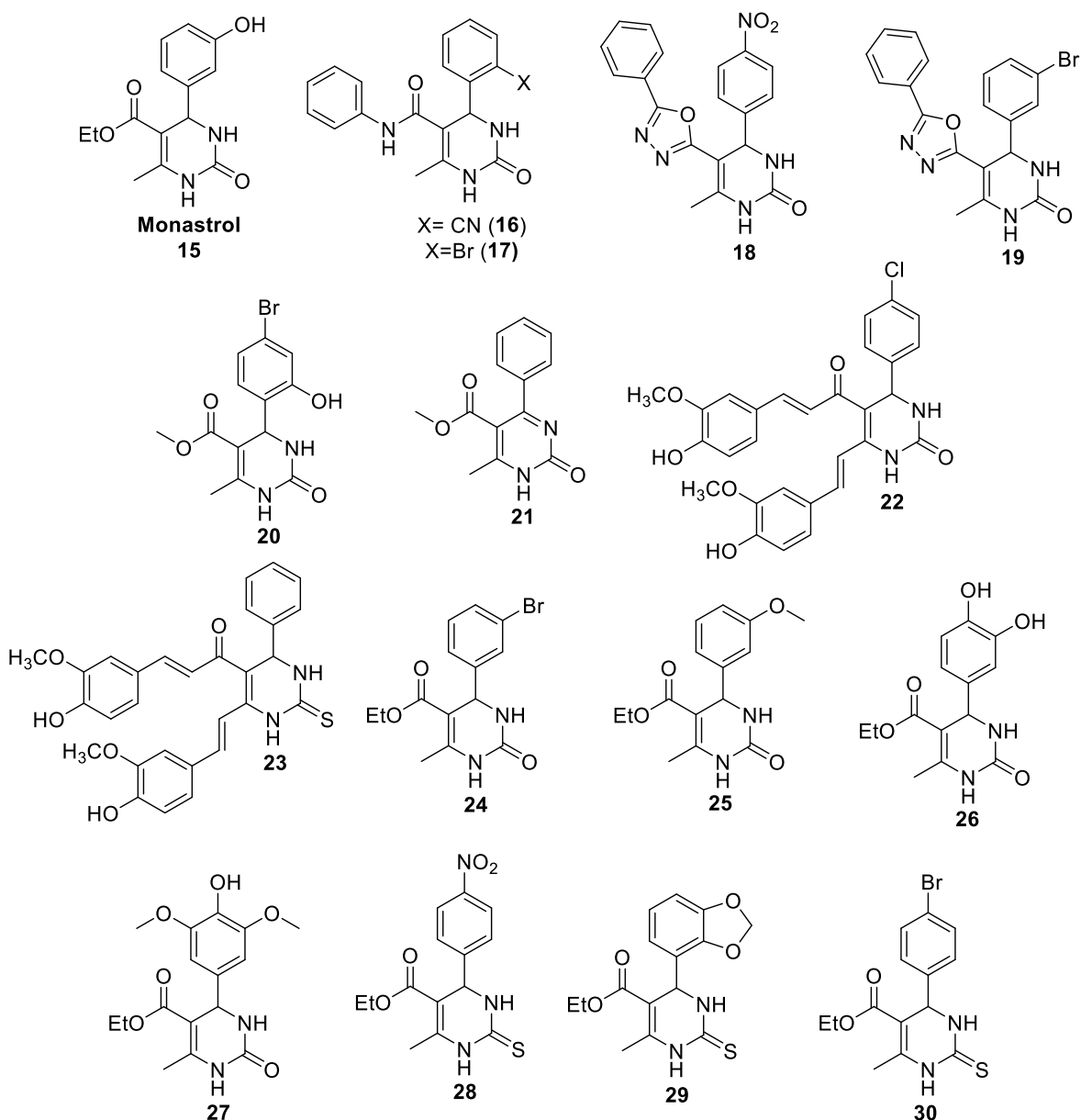


Figura 12: Exemplos de Adutos de Biginelli de interesse medicinal e agrícola.

A atividade antiureolítica de adutos de Biginelli também foi investigada e relatada em diferentes estudos. Ansari e colaboradores identificaram, por meio de triagem virtual, que o monastrol (**15**) é um potente inibidor de urease. Testes *in vitro* confirmaram a inibição da urease, o monastrol apresentou $IC_{50} = 11,76 \mu M$. A atividade antiureolítica foi ainda mais eficaz para os adutos de Biginelli 24 e 25 (Figura 12), que exibiram IC_{50} de 5,36 e 5,4 μM respectivamente.⁴²

Horta e colaboradores também investigaram a atividade antiureolítica de adutos de Biginelli. Os adutos de Biginelli 26 e 27 (Figura 12) apresentaram inibição de urease em solo

comparável ao NBPT, adicionalmente, estudos cinéticos revelaram que estes inibidores atuam por meio do mecanismo de ação misto e apresentam alta afinidade pelo sítio ativo da enzima.⁴⁰

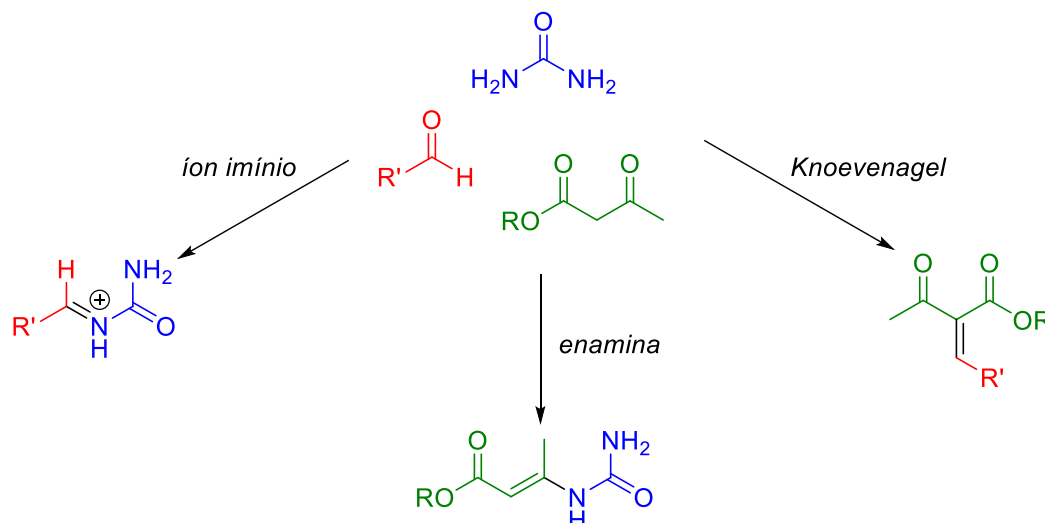
Em 2019, Braga e colaboradores propuseram a síntese de adutos de Biginelli promovida por líquido iônico e avaliaram o potencial antiureolítico de 16 compostos contra a urease *Canavalia ensiformis* (jack bean)³⁷. Os adutos de Biginelli 28, 29 e 30 (Figura 12, pág. 34) apresentaram os melhores resultados, exibindo 48,5% de inibição. Os resultados ainda mostraram que os adutos de Biginelli derivados da tioureia foram mais ativos quando comparados aos seus análogos derivados da ureia.

Além disso, investigações adicionais *in silico* sugeriram que o mecanismo de ação desse adutos envolve os substituintes do anel aromático, que podem formar complexos com o Ni^{2+} da urease, o que pode explicar a diferença de inibição entre os exemplos investigados, dados teóricos revelaram ainda que podem existir interações do tipo π entre o átomo de enxofre e resíduos de His492 e Asp494 da urease, o que contribui com a maior tendência à inibição dos adutos de Biginelli derivados da tioureia.⁴¹

1.1.2.3 O mecanismo da reação de Biginelli

Após a descoberta da reação de Biginelli, naturalmente, cientistas contemporâneos ao químico italiano se debruçaram sobre a reação com a intenção de entender o mecanismo que, envolvendo três reagentes simultaneamente, leva ao produto final. Diferentes grupos chegaram a diferentes propostas de mecanismos, e, em 1933, Folkers e Johnson propuseram que três intermediários que poderiam estar envolvidos na formação do produto (Esquema 2, pág. 36): i) o íon imínio, oriundo da reação entre o aldeído e a ureia; ii) o intermediário enamina, resultado da reação de condensação entre a ureia e o composto dicarbonílico; iii) e, por fim, o intermediário de Knoevenagel, formado via a reação entre o benzaldeído e o composto dicarbonílico⁷¹.

As propostas mecanísticas para a reação de Biginelli se renovaram com o tempo. Em 1973, Sweet e Fissekis propuseram um mecanismo mais detalhado, baseado na formação do intermediário de Knoevenagel, que na etapa seguinte reagiria com a ureia e, em uma etapa final, o produto seria formado via uma condensação intramolecular⁷².



Esquema 2: Intermediários possivelmente envolvidos no mecanismo de formação dos adutos de Biginelli.

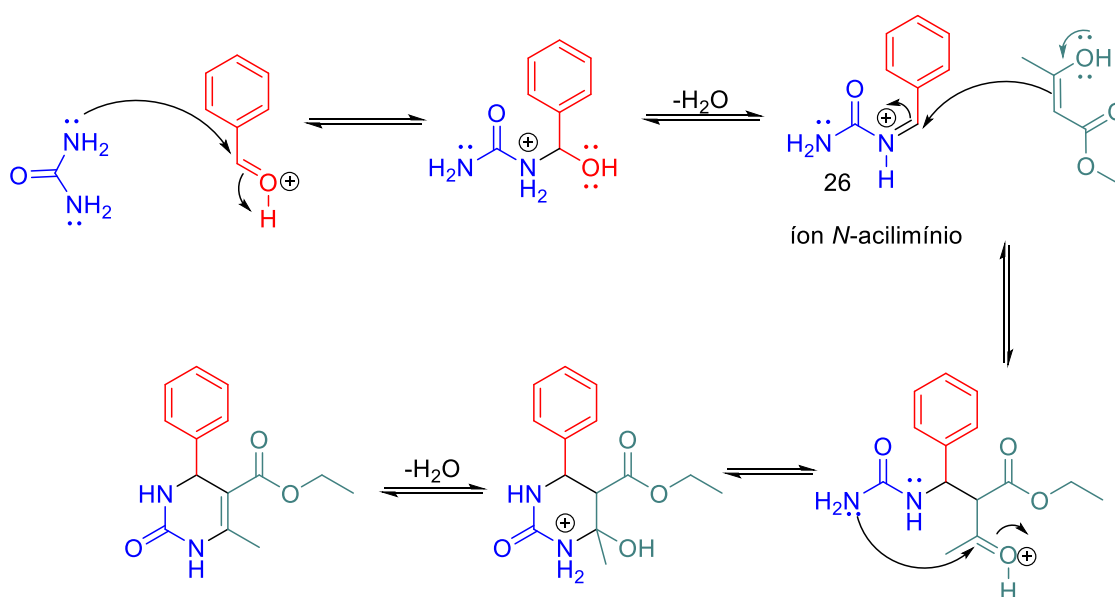
No final do século passado, Kappe investigou a reação de Biginelli identificando os intermediários por meio de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Ao avaliar a reação por 20 minutos Kappe identificou o íon imínio e não observou os intermediários de Knoevenagel e enamina. Deste modo, os autores sugeriram que a formação do aduto de Biginelli se dá preferencialmente pela formação do íon imínio⁷³.

O mecanismo da reação de Biginelli ainda é objeto de estudo de muitos grupos de pesquisa. A literatura atual mostra que o mecanismo depende das condições reacionais aplicadas, principalmente a natureza do catalisador⁷⁴. Maskrey e colaboradores, por exemplo, investigaram o mecanismo da reação de Biginelli quando na presença de brometo de índio e observaram a presença do intermediário de Knoevenagel⁷⁴.

Em contrapartida, ao utilizar SbCl₃ Cepanec e colaboradores concluíram que a formação do aduto de Biginelli ocorreu via formação da enamina, e Ramos, em 2012, por meio da análise por espectrometria de massas, utilizando formaldeído como catalisador, observou que os intermediários mais abundantes eram provenientes do mecanismo via íon imínio^{75,76}.

De modo geral, o mecanismo via íon imínio é considerado o mais favorável devido as menores barreiras de energias observadas em investigações teóricas. Esse mecanismo envolve a adição nucleofílica da ureia ao aldeído ativado levando à formação do intermediário tetraédrico, que evolui para o íon *N*-acilimínio por meio da perda de uma molécula de água. Na etapa seguinte, a forma enólica do 1,3-dicarbonílico ataca o íon *N*-acilimínio e leva à formação de um segundo intermediário tetraédrico.

Por fim, a ciclização do anel de seis membros ocorre pelo ataque nucleofílico do segundo átomo de nitrogênio da ureia na carbonila de cetona da porção dicarbonílica. A última etapa leva à formação do aduto de Biginelli por meio da eliminação de uma segunda molécula de água (Esquema 3).

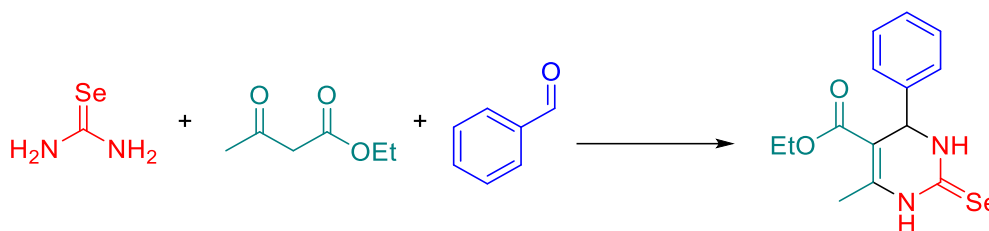


Esquema 3: Mecanismo, considerando a catálise ácida, da reação de Biginelli via formação do intermediário imínio.

1.1.2.4 Síntese e atividades biológicas de adutos de Biginelli derivados da selenoureia

Desde que a inibição da enzima motora Eg5 pelo monastrol foi relatada, propostas de alterações estruturais no esqueleto dessa molécula para otimizar a sua ação anticancerígena foram investigadas. Mais recentemente, os efeitos antioxidantes de compostos contendo selênio também tem sido empregados como novas ferramentas para desenvolver adutos de Biginelli inovadores, que podem apresentar ação anticancerígena pronunciada⁷⁷.

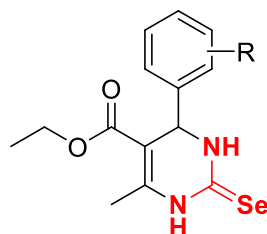
A síntese dessas selenoureias pirimidínicas ocorre, de modo geral, sob catálise ácida como a reação clássica de Biginelli.⁷⁸ No entanto, a síntese catalisada por líquidos iônicos também foi descrita.⁷⁹ No Esquema 4 é ilustrada a reação que leva à formação destes compostos.



Esquema 4: Síntese de adutos de Biginelli derivados da selenoureia.

A síntese e a investigação da inibição da enzima Eg5 por parte do análogo de selênio do Monastrol foi relatada por Klein e colaboradores em 2007. Neste estudo a síntese foi realizada sem solvente e catalisada por MgCl_2 hexaidratado, o que permitiu obter o produto de interesse com 76% de rendimento. No entanto, as investigações sobre a inibição da enzima motora revelaram que a presença do selênio causou uma diminuição de duas vezes na atividade quando comparado ao Monastrol.⁸⁰

Samdhian e colaboradores sintetizaram e avaliaram a atividade antimicrobiana de adutos de Biginelli derivados da selenoureia. A reação de Biginelli ocorreu em etanol, na presença de HCl e sob irradiação de micro-ondas. Os compostos avaliados estão representados na Figura 13 (pág 33). Os resultados da avaliação antibacteriana indicaram que os compostos BSe-a e BSe-e foram os mais ativos contra a bactéria *Pseudomonas fluorescens* ($\text{MIC} = 8 \mu\text{g.mL}^{-1}$), enquanto que os compostos BSe-b e BSe-d exibiram melhores resultados contra as bactérias *Klebsellia pneumoniae* e *Escherichia coli*, respectivamente, ambas exibindo $\text{MIC} = 8 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O composto BSe-f foi o único que demonstrou inibir as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus pyrogens* ($\text{MIC} = 8 \mu\text{g.mL}^{-1}$), e os adutos BSe-c e BSe-g exibiram atividade antifúngica significativa contra *Aspergillus janus* e *Penicillium glabrum*, ambas apresentaram $\text{MIC} = 8 \mu\text{g.mL}^{-1}$.⁸¹

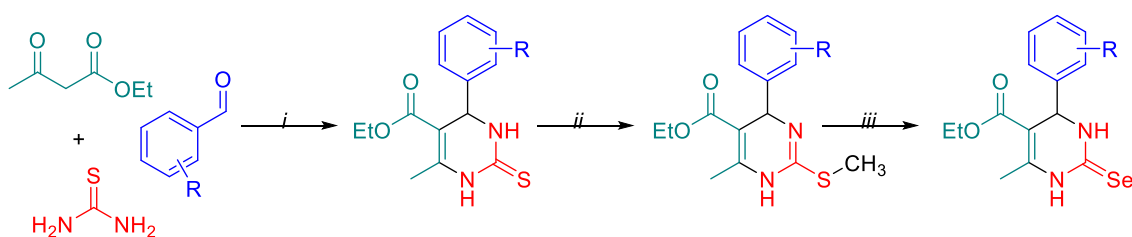


BSe-a: R = H, **BSe-b:** R = 4- OCH_3 ,
BSe-c: R = 3- NO_2 , **BSe-d:** R = 4-OH,
BSe-e: R = 3- OCH_3 , 4-OH, **BSe-f:** 2,3- OCH_2O , **BSe-g:** R = 2,4-Cl

Figura 13: Adutos de Biginelli sintetizados e avaliados quanto à ação antimicrobiana por Samdhian e colaboradores.

Barbosa e colaboradores sintetizaram e investigaram a ação de selenoureias pirimidínicas contra células de câncer e células normais. Neste caso, os autores não sintetizaram os adutos de Biginelli por meio da reação de condensação envolvendo a selenoureia diretamente, mas sim em três etapas, sendo que o selênio é incorporado na última etapa por substituição da isotioureia, como mostrado no Esquema 5.⁷⁷

A nova metodologia de síntese proposta por Barbosa elimina a necessidade do uso de selenoureia na formação do produto final. Essa abordagem é particularmente vantajosa devido ao elevado custo de mercado da selenoureia. Além de reduzir custos, as reações descritas demonstraram bons rendimentos e dispensaram o uso de coluna cromatográfica na etapa de purificação.



i: HCl, 100 °C, 55-99%; ii) MeI, EtOH, refluxo, 1h, 72- 99%; iii) NaBH₄, Se⁰, EtOH, refluxo, 15h, 65-99%.

Esquema 5: Síntese de selenoureias pirimidínicas em três etapas proposta por Barbosa e colaboradores.

Por meio dessa metodologia, Barbosa e colaboradores prepararam uma série de onze adutos de Biginelli. Investigaram a atividade inibitória em células de câncer de mama (MCF-7) e adenocarcinoma cervical (HeLa). O composto BSe-h (Figura 14, pág 34) exibiu o melhor resultado contra a célula MCF-7, IC₅₀ = 25,2 µM, sendo mais ativo que o Monastrol (IC₅₀ = 59,1 µM) e apresentou seletividade entre as células cancerígenas e células normais.

Os resultados promissores observados para o composto BSe-h encorajaram a síntese do análogo cíclico, o composto BSe-i. Esse novo derivado exibiu seletividade e citotoxicidade mais alta contra células de câncer de mama (IC₅₀ = 3,9 µM), além disso, causou danos ao DNA, inibiu a proliferação celular, interrompeu o ciclo celular e induziu a morte celular através de apoptose nas células MCF-7.⁷⁷

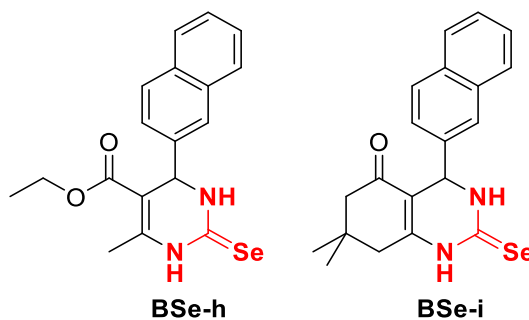


Figura 14: Selenoureias pirimidínicas que apresentaram os melhores resultados de inibição contra células de câncer de mama.

A facilidade sintética associada ao potencial biológico, bem como os dados encontrados na literatura sobre mecanismos de ação dos adutos de Biginelli, justificam o considerável interesse sintético que envolve essa reação. Modificar a estrutura fundamental dos adutos via a adição de grupos de interesse biológico por meio de reações químicas é importante pois pode resultar em moléculas ainda mais eficazes na interação com alvos terapêuticos.

1.2 Objetivos

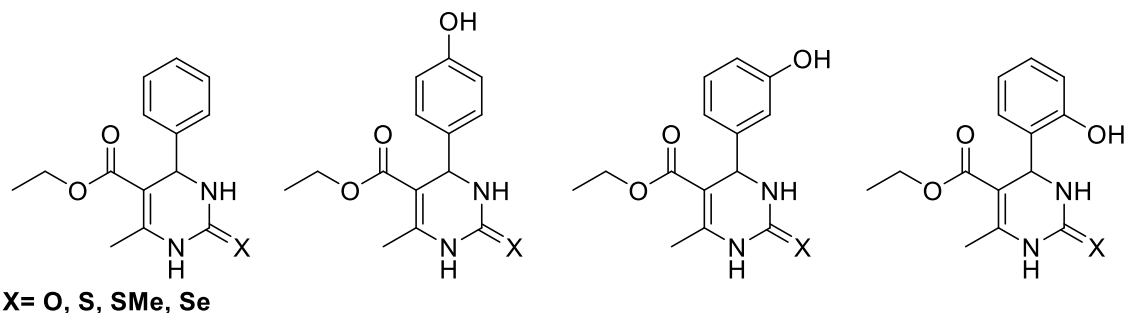
1.2.1 Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar os adutos de Biginelli derivados da ureia, tioureia, isotioureia e selenoureia, e investigar a atividade inibitória desses compostos contra a enzima urease, de modo a compreender a influência do selênio na ação inibitória dessa classe de compostos.

1.2.2 Objetivos específicos

- Determinar as melhores condições para a síntese de adutos de Biginelli derivados da selenoureia;
- Realizar a síntese dos adutos de Biginelli derivados de ureia, tioureia, isotioureia e selenoureia;
- Realizar o *screening* para determinar a porcentagem de inibição contra a urease *C. ensiformis* de todos os adutos de Biginelli em uma concentração fixa;
- Determinar o IC₅₀ da inibição de urease para os inibidores mais ativos;
- Determinar o mecanismo de inibição e os parâmetros cinéticos para os melhores inibidores.

Esquema geral dos adutos de Biginelli planejados



1.3 Resultados e Discussão

1.3.1 Síntese e caracterização dos adutos de Biginelli

A síntese dos adutos de Biginelli, que foram investigados quanto à sua ação inibitória da urease, começou com a delimitação das moléculas a serem estudadas. A decisão foi fundamentada em dois aspectos importantes: primeiro, o potencial biológico previamente evidenciado pelo monastrol em pesquisas anteriores; segundo, a possível maior afinidade do selênio com os átomos de níquel do centro ativo, devido a sua maior polarizabilidade em comparação aos outros calcogênios (O, S). Isso se justifica porque o selênio apresenta caráter de base de Lewis macia, o que permite que o Se seja um ligante mais eficiente que o enxofre e o oxigênio frente ao íon Ni^{2+} .

Assim, o escopo do estudo foi definido de modo a garantir que o conjunto de produtos apresentassem a hidroxila no anel aromático nas posições *orto*, *meta*, *para*, de maneira a avaliar a atividade inibitória de isômeros de posição do monastrol. Também foi considerado importante avaliar a atividade antiureolítica dos derivados sem hidroxila no anel. Além disso, decidiu-se investigar os derivados de ureia, tioureia isotioureia e selenoureia. Desta forma, foi possível analisar como a presença e a posição do grupo -OH assim como a natureza do átomo de calcogênio (O, S ou Se) influenciam na atividade inibitória de urease dos adutos de Biginelli. Na Figura 15 são ilustradas as alterações estruturais planejadas.

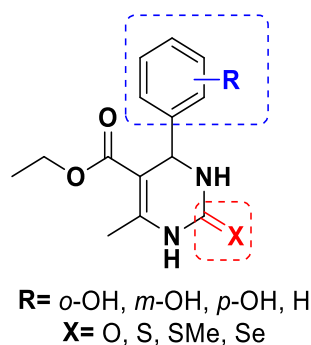


Figura 15: Destaque para as porções do aduto de Biginelli onde as alterações estruturais foram planejadas.

Síntese e caracterização dos adutos de Biginelli derivados da ureia e tioureia

Os adutos de Biginelli derivados da ureia e tioureia foram sintetizados conforme descrito na literatura, empregando-se quantidade catalítica (5 mol%) de ácido *para*-toluenossulfônico (PTSA, do inglês *p*-toluenesulfonic acid), em etanol sob refluxo (78°C) por

8h. Com exceção dos derivados do 2-hidroxibenzaldeído todos os produtos foram obtidos com bons rendimentos. A obtenção dos produtos puros não apresentou dificuldades, sendo o produto precipitado com adição lenta de gotas de água gelada ao meio de reação, o precipitado foi então filtrado sob pressão reduzida e lavado com água gelada. Na Figura 16 é representada a reação realizada, bem como os produtos obtidos e seus rendimentos. Todos os produtos isolados são descritos na literatura.

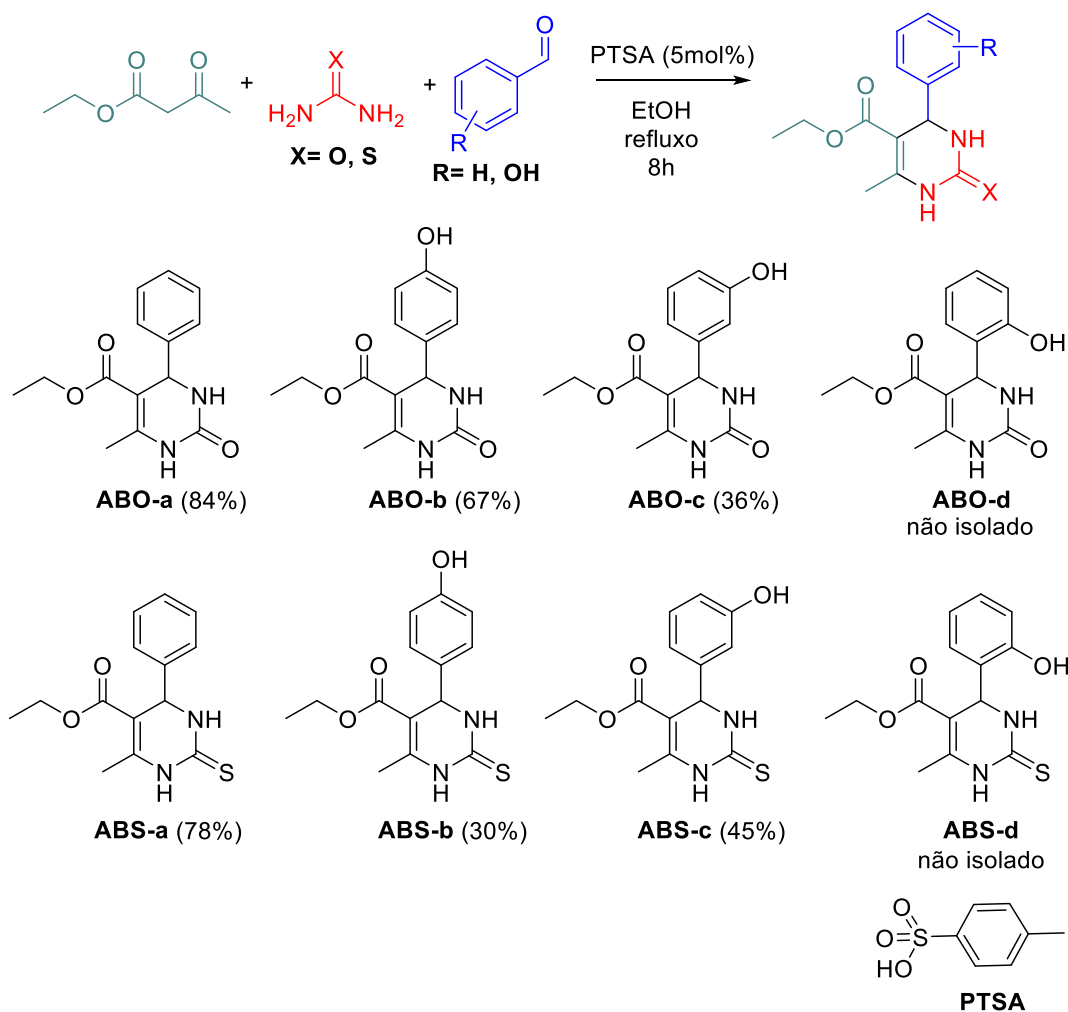


Figura 16: Adutos de Biginelli derivados da ureia e tiourea isolados e seus respectivos rendimentos.

Os maiores rendimentos foram observados, nas duas séries, para os adutos de Biginelli derivados de benzaldeído (sem substituinte no anel aromático). Experimentalmente foi verificado que os produtos hidroxilados (ABS-b-c) apresentam maior dificuldade de precipitação. Esse comportamento pode levar a perdas significativas de produto durante o processo de isolamento e purificação.

Como para os derivados do 2-hidroxibenzaldeídos uma mistura complexa foi obtida por essa primeira metodologia, outras, descritas na literatura, foram empregadas. Deste modo, os

produtos foram obtidos a partir de reação catalisada por NH_4Cl (20 mol%), em metanol, sob refluxo por 8 horas.⁸² A purificação dos produtos foi feita por meio de recristalização com acetato de etila. A metodologia e os rendimentos observados para os produtos estão descritos na Figura 17.

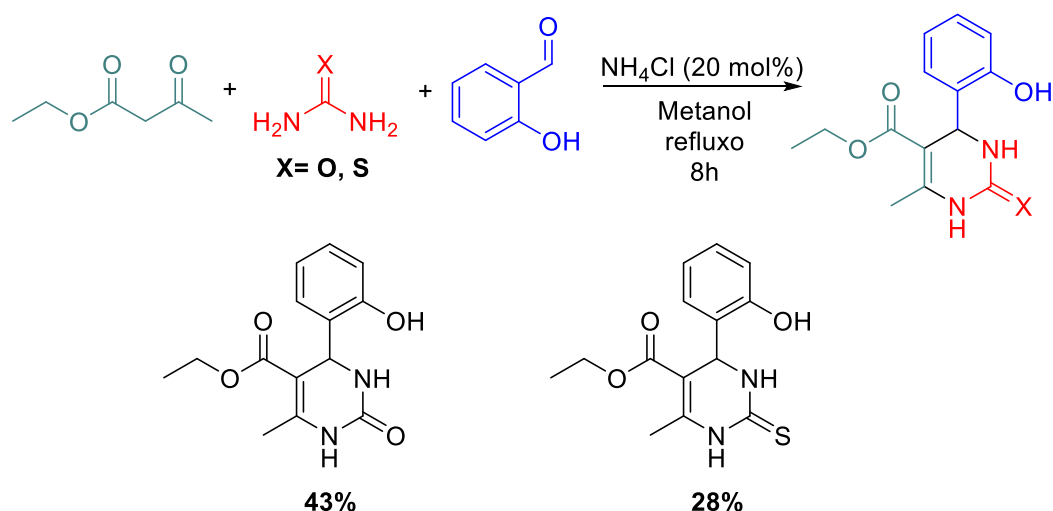
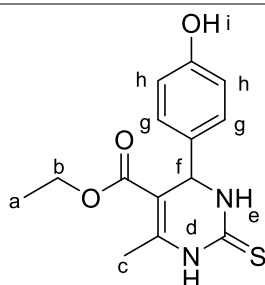


Figura 17: Síntese dos adutos de Biginelli derivados do 2-hidroxibenzaldeído

Todos os produtos obtidos foram caracterizados através de espectros na região do infravermelho e RMN de ^1H e ^{13}C . Os resultados estão em concordância com os dados descritos na literatura (Tabela 1).

Como exemplo da caracterização será discutido o composto ABS-b (Figura 16, pág. 43). O espectro de RMN de ^1H (Figura S11, pág. 152) exibe um tripleto com deslocamento em 1,09 ppm integrado para 3 hidrogênios, atribuído aos hidrogênios do CH_3 do grupo etoxila, ainda nesse grupamento, observa-se um quarteto em 3,99 ppm referente ao CH_2 . O simpleto exibido em 2,27 ppm foi atribuído à metila que provém do acetoacetato de etila, identificada como **c**. Os simpletos com deslocamento em 9,53 e 10,22 ppm foram atribuídos aos hidrogênios ligados aos nitrogênios derivados da ureia; o simpleto em 5,05 ppm é característico do hidrogênio CH do anel pirimidínico, identificado como **f**. Por último foram atribuídos os deslocamentos referentes aos hidrogênios do anel aromático, sendo dois dupletos em 7,01 e 6,70 ppm referentes aos hidrogênios identificados como **g** e **h**, respectivamente.

Tabela 1: Dados de caracterização do composto ABS-b comparados com os descritos na literatura



RMN de ^1H , 400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$					RMN de ^1H , 200 MHz, $\text{DMSO}-d_6^*$				
Hidrogênio	δ	M	I	J	Hidrogênio	δ	M	I	J
H _a	1,09	t	3	8,0	H _a	1,09	t	3	6,9
H _b	3,99	q	2	8,0	H _b	3,97	q	2	6,9
H _c	2,27	s	3	-	H _c	2,23	s	3	-
H _d	10,22	s	1	-	H _d	9,34	s	1	-
H _e	9,53	s	1	-	H _e	9,12	s	1	-
H _f	5,05	s	1	-	H _f	5,04	s	1	-
H _g	7,01	d	2	8,0	H _g	7,03	d	2	8,0
H _h	6,70	d	2	8,0	H _h	6,68	d	2	8,0
H _i	9,43	s	1	-	H _i	7,62	s	1	-

*Resultados descritos na literatura (Braga, *et. al.*, 2019)⁴¹; δ = deslocamento químico (ppm), M = multiplicidade, I = integração, J = acoplamento (Hz), s = simpleto, d = duplete, t = tripleto, q = quarteto.

Além disso, no espectro na região do infravermelho (Figura S40, pág. 167) observa-se uma banda larga em 3488 cm^{-1} , característica de hidroxilas, que foi atribuída ao estiramento da ligação O-H. As bandas em 3247 e 3179 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos das ligações N-H; em 1683 cm^{-1} observa-se o estiramento atribuído à carbonila do grupo éster e em 1191 cm^{-1} observa-se o estiramento característico da ligação C=S. Essas informações permitem confirmar a estrutura proposta para o produto ABS-b.

Os demais compostos (ABS-a, ABS-c, ABS-d e ABO-a-d) foram caracterizados de forma análoga.

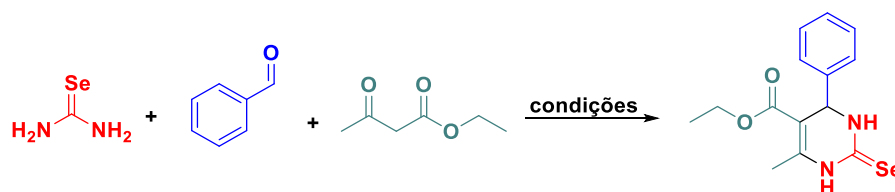
Síntese e caracterização dos adutos de Biginelli derivados da selenoureia

A síntese dos adutos de Biginelli derivados da selenoureia por meio da reação tricomponente é descrita na literatura, conforme foi citado anteriormente. De modo geral, o

produto é obtido por meio de uma reação tricomponente envolvendo um aldeído e um composto dicarbólico adequados e a selenoureia sob catálise ácida.

Mais comumente a reação ocorre em etanol, sob aquecimento e o HCl é utilizado como catalisador da reação.⁷⁸ Deste modo, para isolar esses produtos, as metodologias conhecidas foram reproduzidas usando a reação com o benzaldeído como reação padrão. No entanto, as metodologias descritas não permitiram isolar os adutos de Biginelli de interesse (Tabela 2). Assim, o PTSA, foi empregado como catalisador, em diferentes quantidades, mas a reação também não ocorreu em nenhum dos experimentos.

Tabela 2: Condições reacionais testadas sem sucesso para obtenção dos adutos de Biginelli derivados da selenoureia

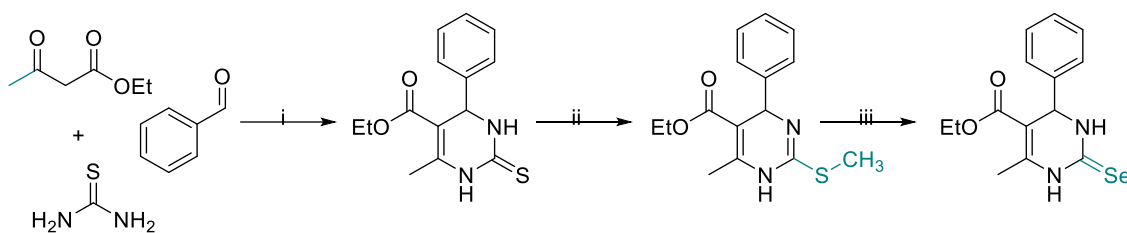


Temp. (°C)	Atmosfera	Catalisador	Solvente	Aquecimento
78,5	ar	HCl (0,5 mL)	Etanol	Refluxo
90	ar	HCl (0,5 mL)	Etanol	Micro-ondas
78,5	ar	PTSA (20 mol%)	Etanol	Refluxo
78,5	Ar	PTSA (20 mol%)	Etanol seco	Refluxo
T.A	Ar	PTSA (5mol%)	Etanol seco	-
50	Ar	HCl (0,5 mL)	Etanol	Refluxo
100	ar	MgCl ₂ (20 mol%)	S.S	Refluxo

T.A = temperatura ambiente; S.S = sem solvente; PTSA = ácido *p*-toluenossulfônico.

Observou-se que, além de parte dos reagentes serem recuperados, em reações com etanol sob oxigênio ocorria a formação de selênio elementar no meio de reação, indicando que as condições reacionais aplicadas levavam a decomposição da selenoureia. Desse modo, reações em solvente anidro e sob atmosfera inerte (argônio) foram realizadas, mas, novamente, o produto não foi obtido. Modos de aquecimento e temperatura também foram alteradas, porém os experimentos continuaram infrutíferos (Tabela 2, pág 40).

Como a síntese tricomponente dos adutos de Biginelli derivados da selenoureia não foi efetiva, aplicou-se então a metodologia descrita por Barbosa e colaboradores⁷⁷ (Esquema 6). Por essa metodologia o produto de interesse é obtido em três etapas: primeiro, fez-se síntese do aduto de Biginelli derivado da tioureia, segundo a metilação do primeiro produto levando à formação de uma isotioureia e, terceiro, ocorre a reação de substituição com NaSeH levando à formação do produto final.



i: PTSA (5mol%), etanol, refluxo; *ii*) MeI, EtOH, refluxo, 1h, 72- 99%; *iii*) NaBH₄, Se⁰, EtOH, refluxo, 15h, 65-99%.

Esquema 6: Metodologia de síntese de adutos de Biginelli contendo selênio em três etapas.

Apesar de apresentar três etapas e aumentar o número de reagentes necessários, a nova rota sintética foi considerada a melhor opção porque foi possível obter os produtos com rendimentos moderados. Na primeira etapa foi aplicada a mesma metodologia apresentada na sessão anterior para a síntese dos adutos de Biginelli derivados da tioureia e ureia. Esse aduto foi, na segunda etapa, submetido à reação de metilação com iodeto de metila que ocorreu em etanol, sob refluxo por uma hora.

Como a síntese do produto final dependia da isotioureia esses produtos foram adicionados ao escopo inicial de trabalho. Deste modo, esses produtos foram caracterizados e suas atividades antiureolíticas também foram investigadas.

A obtenção das isotiureias (ABSMe - a-d) ocorre por meio de uma reação de metilação que, por sua vez, se dá via um mecanismo de substituição nucleofílica, no qual o iodeto de metila atua como eletrófilo da reação. Embora a hidroxila fenólica seja considerada um nucleófilo, a incorporação da metila acontece exclusivamente no enxofre, inclusive nos derivados hidroxilados (ABSMe b-d, Figura 19A, pág. 48).

A predominância da S-metilação pode ser explicada pela maior eletronegatividade do oxigênio em relação ao enxofre e ao fato dos elétrons não ligantes do oxigênio estarem

comprometidos com a ressonância do anel aromático, o que torna os pares de elétrons não ligantes menos disponíveis para atacar o eletrófilo da reação. Além disso, o solvente da reação é o etanol, um solvente polar prótico. Como o oxigênio é um átomo menor e mais eletronegativo que o enxofre, ele deve estar mais solvatado e menos disponível que o enxofre para participar da reação de metilação. O mecanismo da reação de metilação é apresentado na Figura 18.

Observou-se que os derivados com a hidroxila na posição *para* e *meta* apresentaram rendimentos significativamente menores em comparação com os derivados não substituído e com a hidroxila na posição *orto*, tendo esse último apresentado o maior rendimento. O rendimento mais elevado observado para o derivado do 2-hidroxibenzaldeído pode ser justificado pela possível formação de uma ligação de hidrogênio entre o hidrogênio da hidroxila fenólica e o nitrogênio do anel pirimidínico (Figura 19A, pág 43). Essa interação forma um pseudoanel de seis membros, estabilizando assim o produto final (Figura 19B, pág 43).

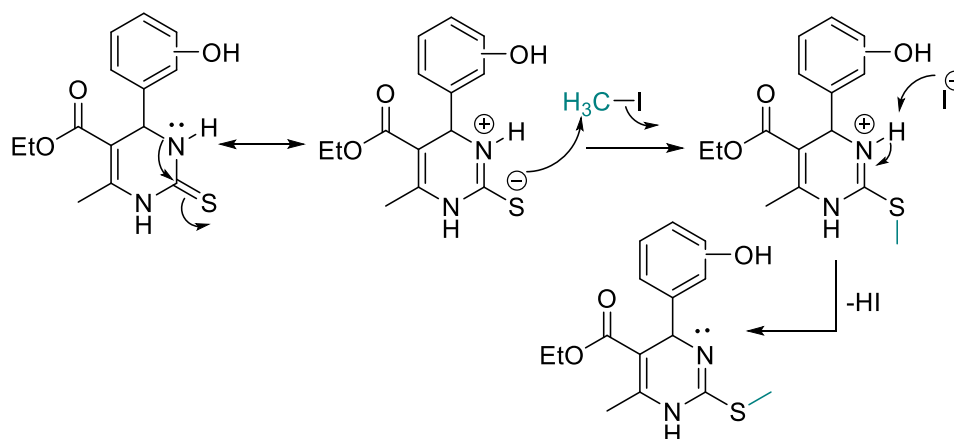


Figura 18: Mecanismo de reação da metilação dos adutos de Biginelli.

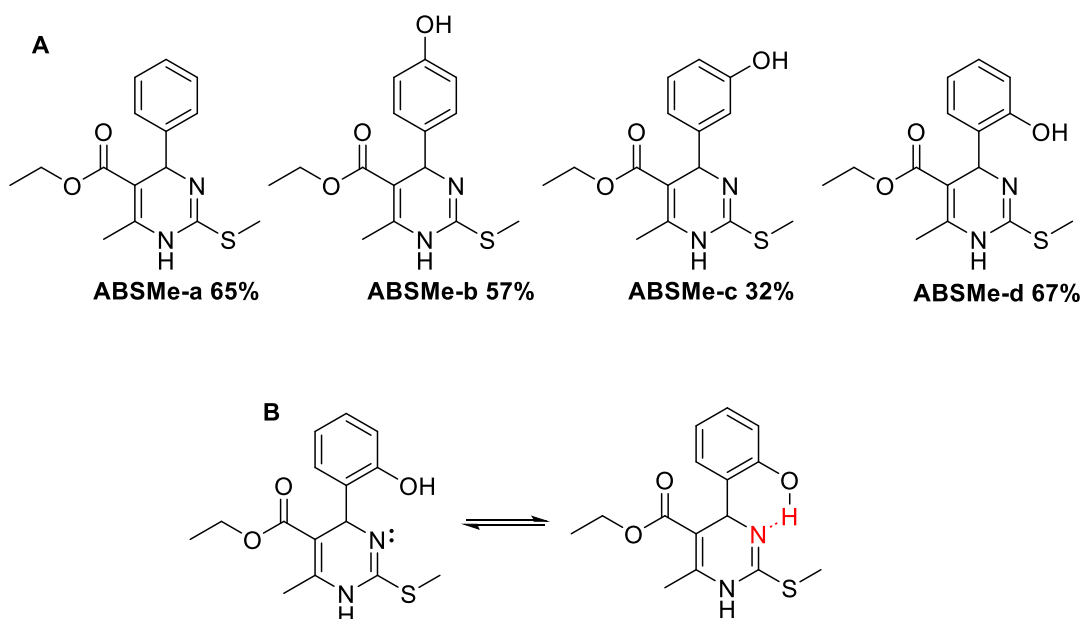


Figura 19: A) Rendimentos obtidos nas sínteses das isotioureias. B) Ligação de hidrogênio entre a hidroxila fenólica e nitrogênio pirimidínico que leva à estabilização do produto final.

Todas as isotioureias foram caracterizadas por meio de espectroscopia na região do infravermelho e RMN de ^1H e ^{13}C e estão de acordo com os dados apresentados na literatura⁶⁷ (Tabela 3).

Tabela 3: Dados de caracterização do composto **ABSMe-b** comparados com os descritos na literatura

RMN de ^1H , 400 MHz, DMSO- d_6					RMN de ^1H , 400 MHz, DMSO- d_6^*				
Hidrogênio	δ	M	I	J	Hidrogênio	δ	M	I	J
H _a	1,12	t	3	8,0	H _a	1,12	t	3	7,0
H _b	3,98	q	2	8,0	H _b	3,99	q	2	7,0
H _c	2,21	s	3	-	H _c	2,21	s	3	-
H _d	9,50	s	1	-	H _d	9,49	s	1	-
H _e	2,26	s	3	-	H _e	2,27	s	3	-
H _f	5,39	s	1	-	H _f	5,40	s	1	-
H _g	6,99	d	2	8,0	H _g	7,00	d	2	8,5

H _h	6,65	d	2	8,0	H _h	6,66	d	2	7,0
H _i	9,21	s	1	-	H _i	9,21	s	1	-

*Resultados descritos na literatura (Barbosa *et al.*, 2018); δ = deslocamento químico (ppm), M = multiplicidade, I = integração, J = acoplamento (Hz), s = simpleto, d = duplete, t = tripleto, q = quarteto.

Como exemplo da caracterização será discutido o composto ABSMe-b (Figura 19A, pág.48). O espectro de RMN de ¹H (Figura S19, pág. 156) exibe para o grupamento etoxila um tripleto com deslocamento em 1,12 ppm integrado para 3 hidrogênios, atribuído aos hidrogênios do CH₃ e um quarteto em 3,98 ppm referente ao CH₂. O simpleto exibido em 2,21 ppm integrado para 3 hidrogênios foi atribuído à metila proveniente do acetoacetato de etila, e o simpleto em 2,26 ppm integrado para 3 hidrogênios foi atribuído à metila da ligação S-CH₃. O simpleto com deslocamento 9,50 ppm foi atribuído ao hidrogênios do grupo NH e o simpleto em 5,05 ppm é característico do hidrogênio CH do anel pirimidínico. Por último foram atribuídos os deslocamentos químicos referentes aos hidrogênios do anel aromático, sendo dois dupletos em 6,99 e 6,65 ppm referentes aos hidrogênios identificados como g e h, respectivamente.

No espectro na região do infravermelho (Figura S44, pág. 169) foi possível observar o estiramento característico de NH em 3319 cm⁻¹, o estiramento da carbonila do éster em 1648 cm⁻¹ e o estiramento característico da ligação S-C que é exibido em 617 cm⁻¹.

Para confirmar indubitavelmente a estrutura das isotioureas formadas considerou-se a hipótese de que é razoável que a reação de metilação possa levar a formação de dois produtos diferentes, que são apresentados na figura 20. No caso do produto A, o nitrogênio 1 auxilia o ataque nucleofílico do enxofre no iodeto de metila levando à formação de um núcleo homoaromático. Enquanto que no produto B esse auxílio é feito pelo nitrogênio 2 e leva à formação de um produto que apresenta a extensão da conjugação de elétrons π do sistema.

Para confirmar a estrutura do produto final, foi realizada uma análise bidimensional do Cosy (do inglês, *CORrelation SpectroscopY*) de acoplamento de longa distância, focada nas correlações entre os hidrogênios. Essa técnica permitiu identificar as correlações entre os hidrogênios da metila, provenientes do acetoacetato de etila, e o NH da ureia (Figura 20).

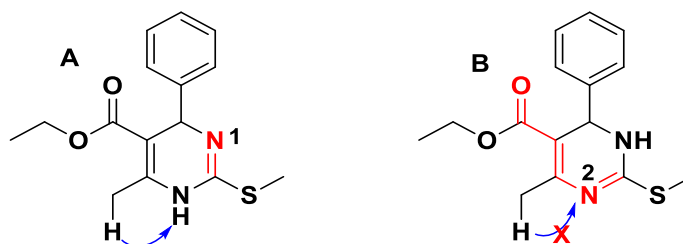


Figura 20: Possíveis caminhos de reação para a formação das isotioureias.

Essas correlações são cruciais para determinar a estrutura final das isotioureias. Especificamente, se o produto formado corresponde à estrutura A, a correlação entre os hidrogênios mencionados deve estar no mapa de contorno Cosy. Por outro lado, se a estrutura é a do produto B, essa correlação não deve aparecer.

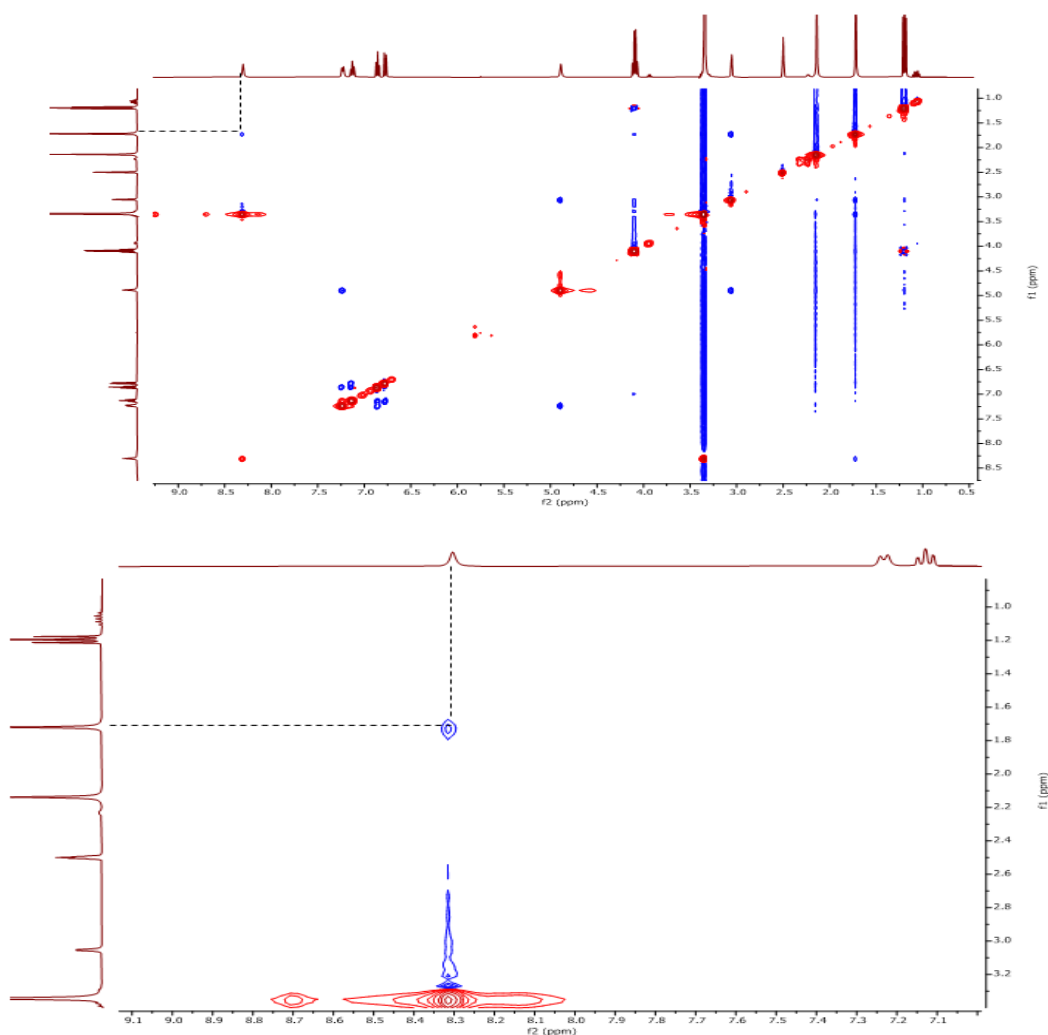
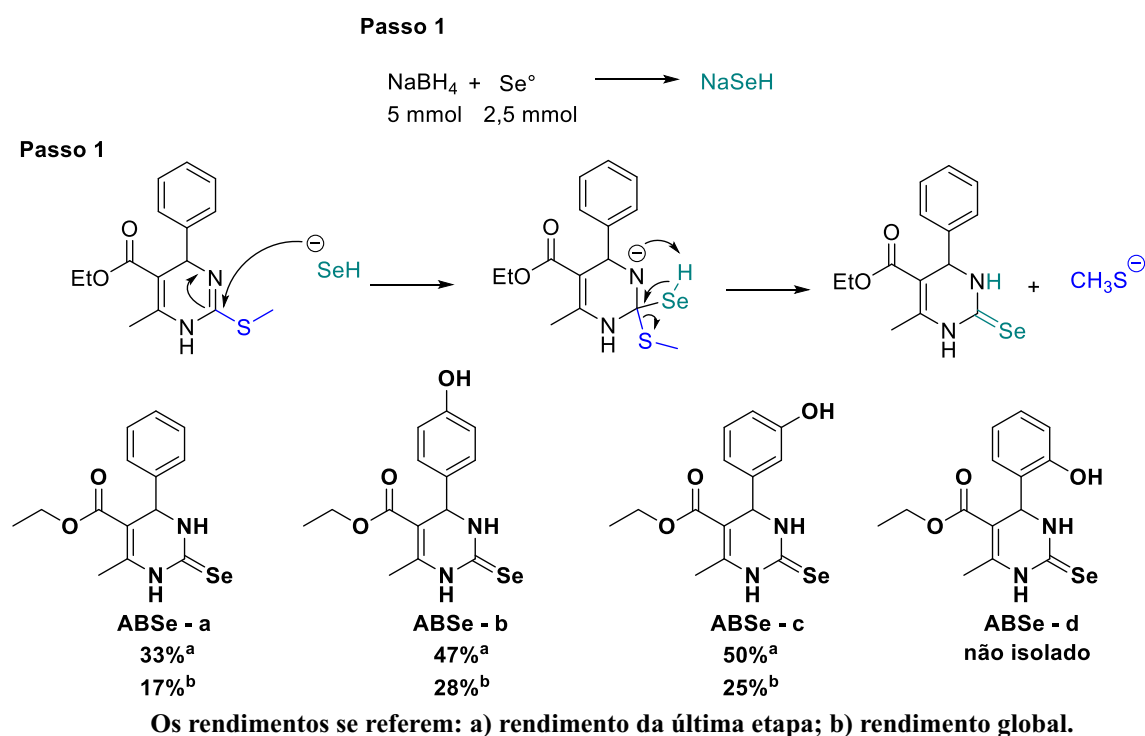


Figura 21: Mapas de contornos Cosy que evidenciam a correlação entre os hidrogênios da metila e o hidrogênio do grupo NH, que confirma a estrutura das isotioureias.

Os mapas de contorno cosy são apresentados na figura 21. Nele é possível observar a correlação entre o deslocamento atribuído aos hidrogênios da metila com o deslocamento

atribuído ao NH. Desta forma, foi possível concluir que a estrutura da isotioureias é a representada pelo produto A (Figura 20, pág. 50). Os demais compostos (ABSM-e-a, ABSMe-c e ABSMe-d) foram caracterizados de forma análoga. Todas as isotioureias foram anteriormente descritas na literatura, com exceção do composto ABSMe-d.

Finalmente, na última etapa da síntese global, o selênio é incorporado ao aduto de Biginelli por meio de uma reação *one-pot* de substituição nucleofílica. No primeiro passo, ocorre a redução do selênio elementar à Se^{2-} por meio de reação com boro hidreto de sódio, em etanol anidro e temperatura ambiente, que leva à formação da espécie nucleofílica de selênio SeH^- . Após redução completa do selênio, evidenciada pela mudança de coloração da reação (de cinza para incolor), o segundo passo é a adição da isotioureia. A reação ocorre em refluxo por 15h em atmosfera de argônio. O mecanismo de formação do produto final é apresentado no Esquema 7.⁷⁷

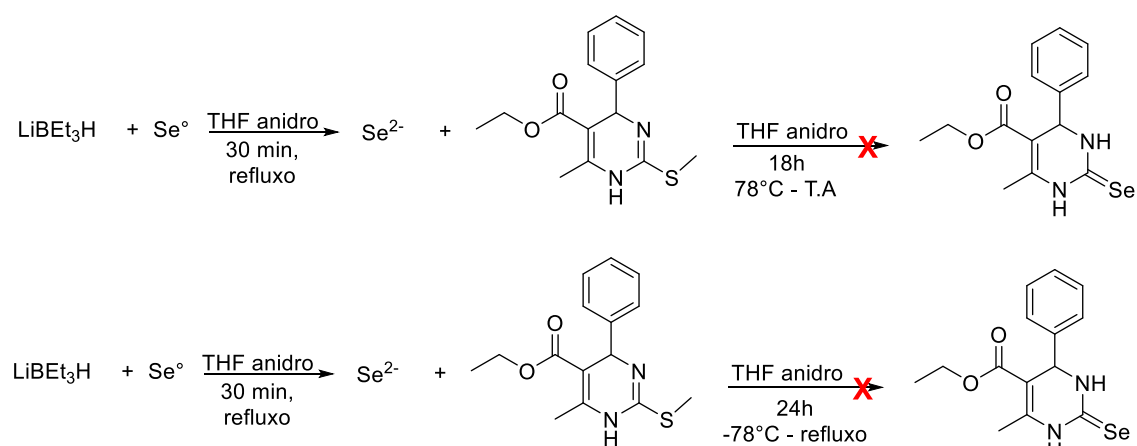


Esquema 7: Mecanismo de reação da formação do aduto de Biginelli contendo a porção selenoureia.

A metodologia empregada permitiu a síntese dos derivados de interesse com rendimentos moderados, com exceção do derivado do 2-hidroxibenzaldeído. Para melhorar os rendimentos e obter o derivado do 2-hidroxibenzaldeído foi explorada uma nova abordagem.

Assim, foram utilizados tetraidrofurano anidro (THF), como solvente, e o composto LiBEt_3H ,⁸³ também conhecido como super hidreto, como fonte de hidreto. (Esquema 8, pág. 53).

O primeiro experimento com o super hidreto aconteceu em duas fases: inicialmente, o íon Se^{2-} foi gerado pela reação de redução entre o selênio elementar e LiBEt_3H em THF, sob refluxo, em atmosfera de argônio por 30 min. Em seguida, a solução do ânion de selênio foi adicionada à solução do aduto de Biginelli metilado em THF, utilizando-se uma cânula, em um banho criogênico a -78°C , mantendo-se por 30 minutos, e depois deixou-se a reação à temperatura ambiente por 18 horas. Ao final da reação e elaboração do produto observou-se que não ocorreu transformação e o reagente de partida foi recuperado.



Esquema 8: Tentativa de síntese de adutos de Biginelli derivados de selênio por meio da reação com super hidreto.

No segundo experimento, os mesmos procedimentos foram seguidos, exceto pela etapa final, que foi realizada sob refluxo por 24 horas. No entanto, após a conclusão da reação, constatou-se que o produto obtido era, novamente, o material de partida, ou seja, o aduto de Biginelli metilado. Diante disso, optou-se por manter a metodologia anterior, que utilizava NaBH_4 como fonte de hidreto e etanol anidro como solvente, para a síntese dos produtos ABSe-a-c.

Para a síntese do composto ABSe-d foi necessário empregar outra abordagem. Levantou-se a hipótese de que o acúmulo de densidade de carga negativa em uma mesma região da molécula no intermediário tetraédrico estava limitando o progresso da reação. Esse acúmulo foi atribuído à presença da hidroxila fenólica desprotonada na posição *orto*, e ao par de elétrons da ligação dupla do anel pirimidínico, que se desloca para o nitrogênio durante a formação do intermediário tetraédrico. Considerou-se que esse acúmulo de carga negativa dificultava a formação do intermediário tetraédrico, comprometendo assim a obtenção do produto final (Figura 22, pág. 53).

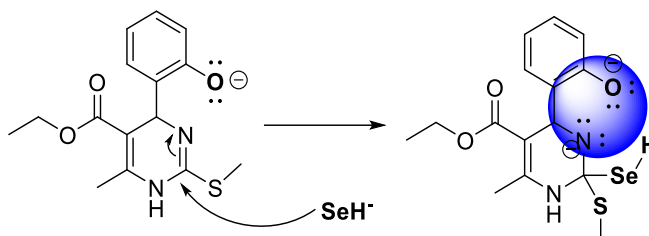


Figura 22: Destaque para o acúmulo de carga negativa na estrutura do possível intermediário tetraédrico da reação para o derivado do 2-hidroxibenzaldeído.

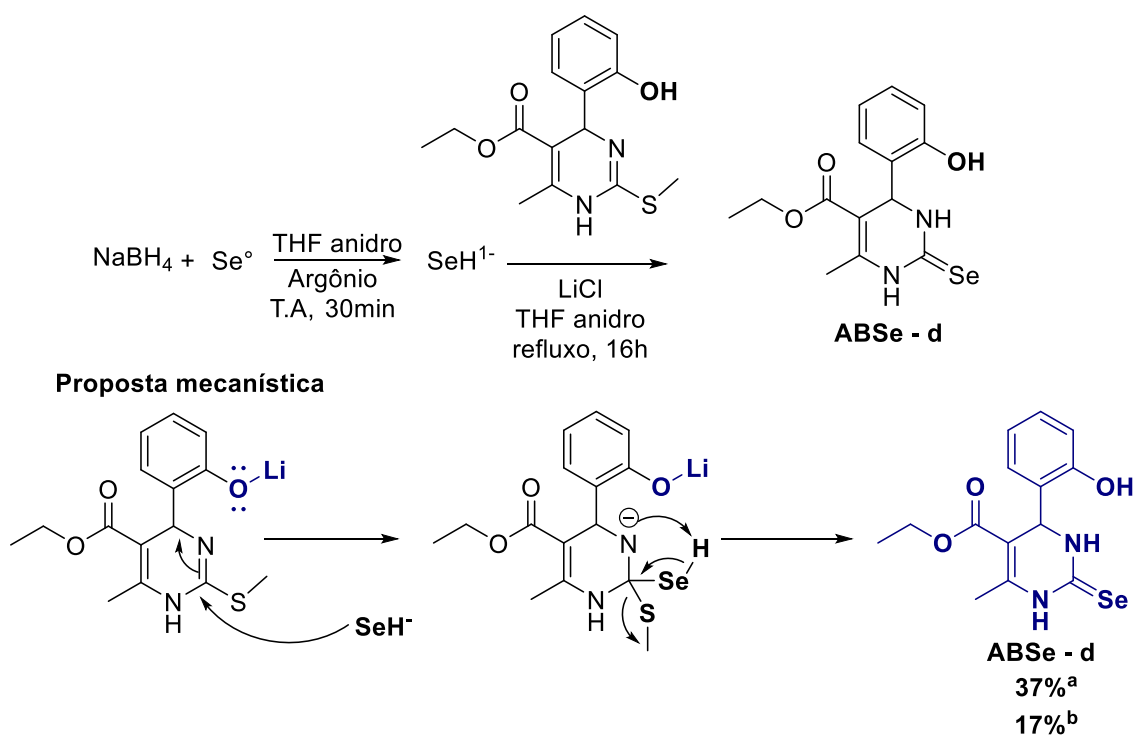
Com base nessa hipótese, a nova metodologia adotada promoveu duas alterações em relação à anterior: o uso de THF como solvente no lugar de etanol e a adição de uma quantidade equimolar de cloreto de lítio à reação. A inclusão do cloreto de lítio teve como objetivo permitir que o lítio coordenasse com o átomo de oxigênio, reduzindo assim a concentração de carga negativa próxima ao nitrogênio. Essas modificações visaram facilitar a formação do intermediário tetraédrico da reação.

O possível mecanismo de reação está ilustrado no esquema 9 (pág.55). Essa metodologia foi eficaz na obtenção do aduto de Biginelli contendo selênio derivado do 2-hidroxibenzaldeído e não foi aplicada para os demais derivados. O produto foi isolado com rendimento global moderado. Essa metodologia permitiu isolar o último aduto de Biginelli da série de 16 compostos: 4 derivados da ureia, 4 derivados da tioureia, 4 adutos metilados e 4 adutos contendo selênio.

Todos os adutos de Biginelli contendo selênio também foram caracterizados por meio dos espectros na região do infravermelho e RMN de ^1H , ^{13}C e ^{77}Se e estão de acordo com os dados apresentados na literatura⁶⁷ (Tabela 4, pág. 55).

Como exemplo da caracterização será discutido o composto ABSe-b (Esquema 7, pág. 52). O espectro de RMN de ^1H (Figura S28, pág. 160) exibe um tripleto com deslocamento em 1,10 ppm integrado para 3 hidrogênios, que foi atribuído aos hidrogênios do CH_3 do grupo etoxila; observa-se um quarteto em 4,00 ppm referente ao CH_2 da etoxila. O simpleto exibido em 2,27 ppm foi atribuído à metila que provém do acetoacetato de etila. Os simpletos com deslocamento em 10,05 e 10,08 ppm foram atribuídos aos hidrogênios ligados aos nitrogênios da selenoureia; o simpleto em 5,07 ppm é característico do hidrogênio CH do anel pirimidínico. Por último foram atribuídos os deslocamentos referentes aos hidrogênios do anel aromático,

sendo dois dupletos em 7,01 e 6,71 ppm referentes aos hidrogênios identificados como g e h, respectivamente.



Esquema 9: Rota sintética e proposta mecanística para a síntese do aduto de Biginelli contendo selênio derivado do 2-hidroxibenzaldeído. a) rendimento da etapa; b) rendimento global.

Tabela 4: Dados de caracterização do composto ABSe-b comparados com os descritos na literatura

RMN de ^1H , 400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$					RMN de ^1H , 400 MHz, $\text{DMSO}-d_6^*$				
Hidrogênio	δ	M	I	J	Hidrogênio	δ	M	I	J
H _a	1,10	t	3	8,0	H _a	1,09	t	3	7,1
H _b	4,00	q	2	8,0	H _b	4,03- 3,96	m	2	-
H _c	2,29	s	3	-	H _c	2,28	s	3	-

H _d	10,05	s	1	-	H _d	10,08	s	1	-
H _e	10,08	s	3	-	H _e	10,55	s	3	-
H _f	5,07	s	1	-	H _f	5,07	s	1	-
H _g	7,01	d	2	8,0	H _g	7,01	d	2	8,6
H _h	6,71	d	2	8,0	H _h	6,72	d	2	8,6

*Resultados descritos na literatura (Barbosa *et al.*, 2018); δ = deslocamento químico (ppm), M = multiplicidade, I = integração, J = acoplamento (Hz), s = simpleto, d = duplete, t = tripleto, q = quarteto.

No espectro na região do infravermelho (Figura S48, pág. 171) observa-se uma banda características de estiramento NH em 3534 cm^{-1} , em 1687 cm^{-1} observa-se o estiramento atribuído à carbonila do grupo éster. Ainda é possível observar as bandas características de estiramentos da ligação C=Se 1425 e 707 cm^{-1} . Essas informações permitem confirmar a estrutura proposta para o produto ABSe-b. Os demais compostos (ABSe-a, ABSe-c e ABSe-d) foram caracterizados de forma análoga.

Dessa maneira todos os compostos racionalizados no escopo inicial do trabalho, e também os 4 adutos de Biginelli metilados, foram obtidos e caracterizados (Figura 23, pág. 57). Todos os compostos foram anteriormente descritos na literatura, com exceção do composto ABSe-d. De posse desses compostos, os testes de inibição de urease foram realizados para toda a série. Foi possível investigar a ação antiureolítica desses compostos contra a urease vegetal *Canavalia ensiformis*.

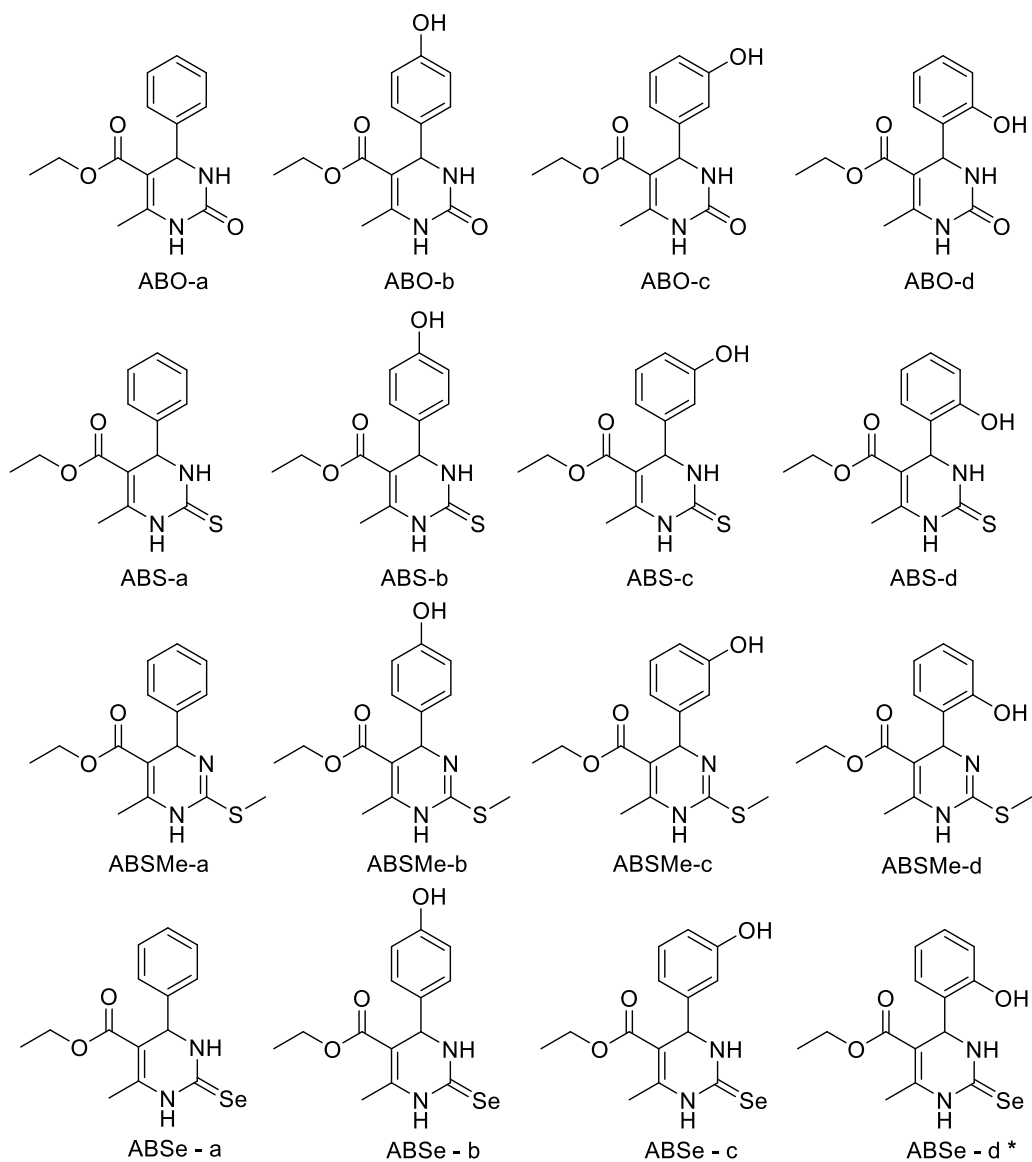


Figura 23: Série dos adutos de Biginelli sintetizados e caracterizados.

*composto inédito.

1.3.2 Testes de inibição de urease por adutos de Biginelli

A maioria dos inibidores podem interagir com o alvo enzimático reversivelmente e podem se ligar à enzima de diferentes maneiras: diretamente à enzima livre, ao complexo enzima-substrato (no caso da urease o complexo formado é urease-ureia) ou em ambas as formas. A interação entre o inibidor e a enzima diminui a ação catalítica da enzima sob o substrato e essa taxa de inibição pode ser medida.⁸⁴ Nesse trabalho, foi utilizado o método do indofenol para a quantificação de amônia para mensurar a atividade inibitória dos adutos de Biginelli.

O método do indofenol consiste em quantificar a amônia gerada na hidrólise da ureia catalisada pela enzima urease, na presença e na ausência do potencial inibidor, por meio de uma sequência específica de reações químicas. Inicialmente, a amônia é gerada durante a hidrólise da ureia. Na segunda etapa, em pH alcalino, ela é oxidada por hipoclorito gerando a cloro amina. No terceiro passo, o íon amônio sofre o ataque de dois equivalentes do íon fenolato formando o indofenol. As reações químicas envolvidas estão ilustradas na Figura 24.

O indofenol apresenta coloração azul, a leitura de absorbância das reações dos ensaios enzimáticos permite medir a concentração do indofenol formado. Essa concentração é proporcional à quantidade de amônio formado na reação de hidrólise, que por sua vez, é inversamente proporcional à inibição enzimática.

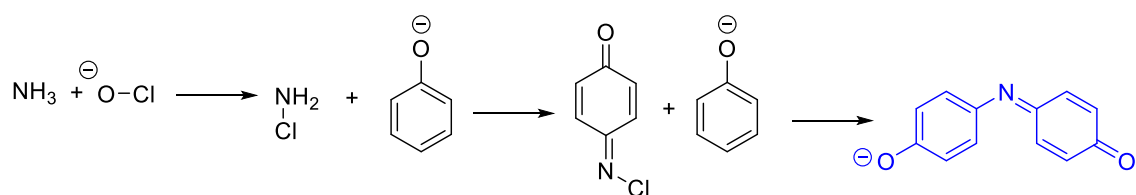
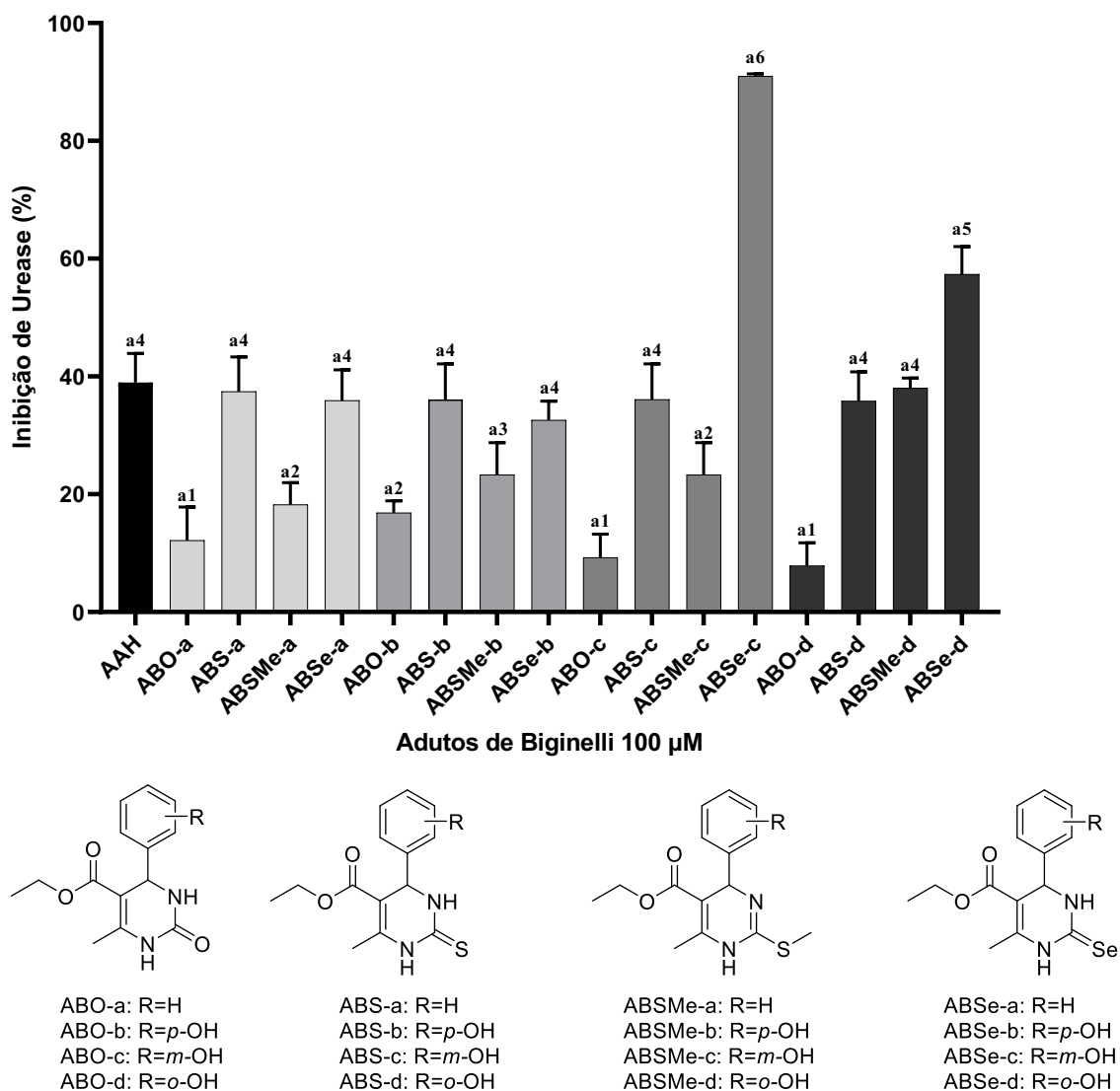


Figura 24: Indofenol formado por meio da liberação de amônia proveniente da hidrólise catalisada da ureia.

Para iniciar as investigações sobre a inibição da urease *C. ensiformis* foi feito um estudo de triagem, em quadruplicata, dos 16 adutos de Biginelli sintetizados e a concentração de todos os inibidores foi 100 μ M e da urease de 12,5 mM, em tampão fosfato EDTA pH igual a 7, empregando o ácido aceto hidroxâmico (AAH) como padrão de referência. Os dados obtidos foram tratados estatisticamente com o teste de Scott Knott (significância de 0,05), e por este os compostos foram agrupados de acordo com a significância de atividade inibitória. Este agrupamento é indicado pelos índices a1-a6 (Gráfico 1).

Gráfico 1: Média de inibição de urease dos adutos de Biginelli a 100uM

Condições de reação: 12,5 uM de urease, 20 mM de ureia e 100 µM de cada composto testado. As soluções dos adutos de Biginelli foram preparadas dissolvendo os compostos em etanol. A solução de trabalho de urease foi preparada em tampão de fosfato 20 mM (pH 7,4 ± 0,1). Ácido aceto-hidroxâmico foi utilizado como referência para a inibição da urease. Os índices a1-a6 referem-se ao agrupamento de resultados de mesma significância estatística definida por meio do teste de Scott Knott (significância de 0,05).

Observa-se que o aduto de Biginelli de selênio ABSe-c é o único elemento no grupo a6, enquanto que o compostos ABSe-d é o único elemento no grupo a5. Isso significa que esses adutos, além de serem os mais ativos, não apresentam atividade inibitória de urease similar a nenhum outro derivado, nem ao padrão de referência.

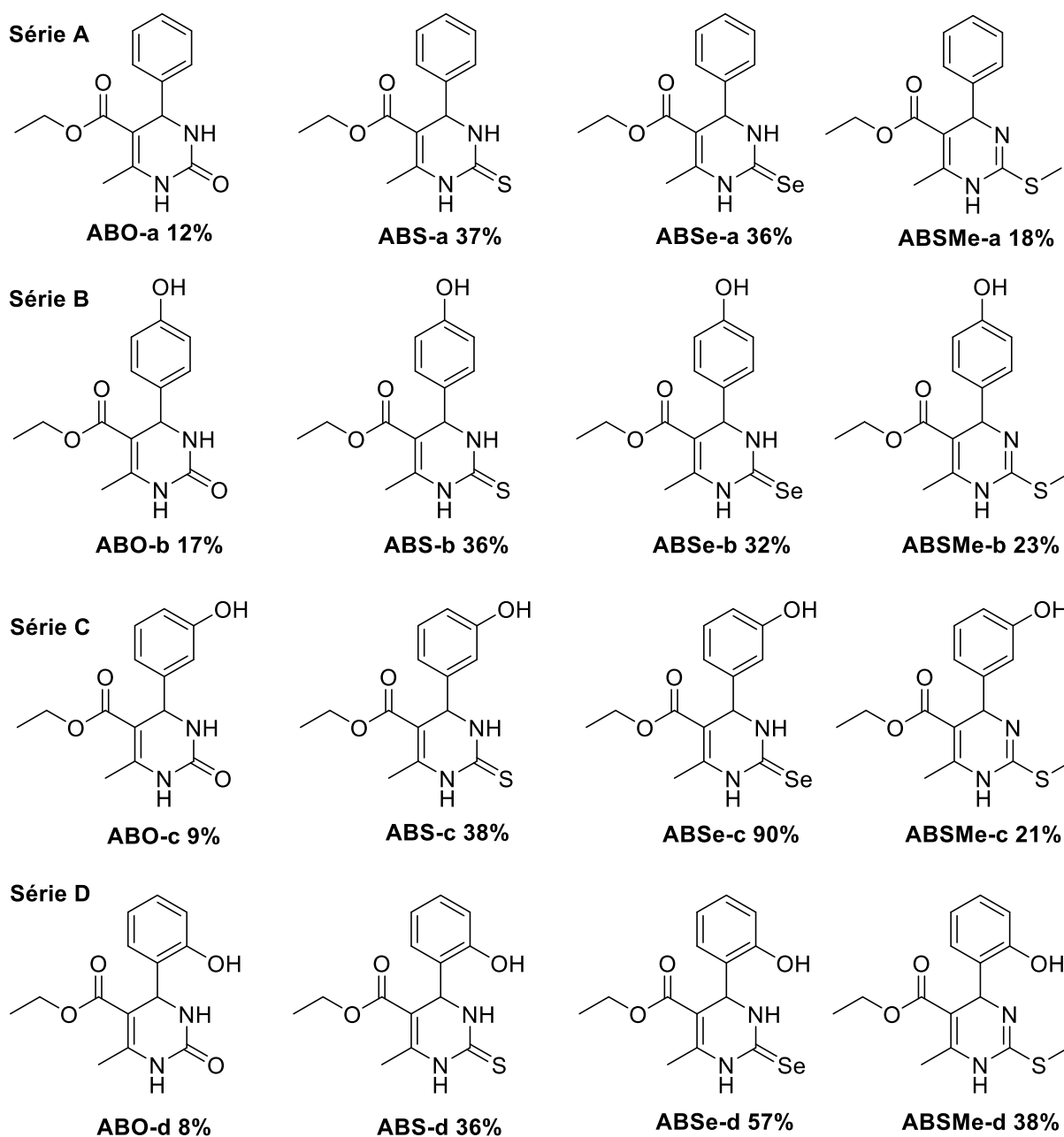


Figura 25: Adutos de Biginelli derivados de ureia, tioureia e selenoureia e suas respectivas médias de inibição de urease a 100 μ M

Os resultados dos testes de inibição evidenciaram que a atividade antiureolítica é afetada com a mudança do átomo de calcogênio presente nos adutos de Biginelli. Nota-se uma tendência de melhoria na inibição dos derivados de tioureia em relação aos derivados de ureia, no entanto, são os derivados de selenoureia os mais eficazes.

Nas séries A e B (Figura 25) a atividade antiureolítica dos adutos de selênio não diferiram muito da inibição apresentada para os adutos derivados da tioureia, no entanto, é importante

pontuar que o composto ABSe-b exibiu baixa solubilidade em etanol (solvente utilizados nos testes *in vitro*). Essa baixa solubilidade pode interferir na disponibilidade no inibidor no meio de reação, consequentemente a taxa de inibição é afetada. Ou seja, não é possível, por este estudo, concluir que o selênio não melhora a atividade antiureolítica dos compostos da série B.

Por outro lado, observa-se uma inibição mais proeminente para os compostos de selênio nas séries C e D, nas quais a inibição destes compostos é quase duas e três vezes maiores, respectivamente, do que os análogos de enxofre correspondentes.

Comparando a inibição média da urease entre os adutos derivados da tiourea e os que contém selênio, observa-se que a presença do átomo de selênio é importante para maximizar a inibição de urease dos adutos de Biginelli quando o grupo hidroxila está nas posições *orto* e *meta* do anel aromático (ABSe-d e ABSe-c). Enquanto que nos adutos com a hidroxila na posição *para* ou sem substituição, (ABSe-b e ABSe-a) a presença do selênio não é mandatória na inibição da urease.

Essa observação sugere que a posição do grupo hidroxila pode influenciar a eficácia da inibição da urease. Portanto, estudos mais aprofundados são necessários para esclarecer as possíveis interações entre os diferentes adutos de Biginelli e a urease.

Os resultados mostram que, em todas as séries, os adutos de Biginelli derivados da ureia são os menos ativos e exibem inibição da atividade da enzima entre 8-17%. Isso corrobora a tendência apresentada na literatura por Braga e colaboradores³⁷, na qual os derivados da ureia também foram os inibidores menos eficazes.

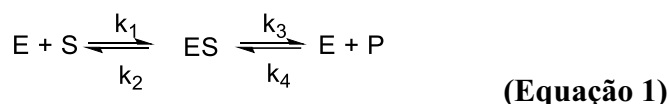
Adicionalmente, a inibição exibida pelas isotioureas (ABSMe-a-d) indica que, em sua maioria, a presença da metila ligada ao enxofre diminui consideravelmente a atividade inibitória da urease quando comparada aos adutos de Biginelli derivados de tiourea. No entanto, o composto metilado que possui a hidroxila na posição *orto* do anel aromático, apresentou uma inibição de urease de 38%, muito semelhante à observada para o composto correspondente não metilado, nesse caso, a posição da hidroxila parece ter sido determinante para a manutenção da taxa de inibição.

De posse dos resultados da triagem inicial, os dois compostos mais ativos foram selecionados para determinação do IC₅₀. Foi determinado que para o composto ABSe-c (selenomonastrol) a concentração mínima que inibe 50% da urease é $30,11 \pm 5,26 \mu\text{M}$, enquanto que

para o derivado ABSe-d esse valor é de $53,65 \pm 9,41 \mu\text{M}$. Também foi feita a avaliação do mecanismo de inibição e a determinação dos parâmetros cinéticos para esses dois inibidores.

1.3.3 Parâmetros cinéticos de reações enzimáticas

A abordagem mais antiga, e ainda a mais importante, para determinar o mecanismo das enzimas é determinar a velocidade da reação e avaliar como ela responde a alterações nos parâmetros experimentais. Os fatores que influenciam a cinética das reações enzimáticas foram estudados por Leonor Michaelis e Maud Menten e para demonstrá-los eles consideraram que as reações enzimáticas ocorrem em duas etapas (Equação 1).^{85,86}



O substrato (S) primeiro se une à sua enzima (E), formando um complexo enzima-substrato (ES). Essa ligação ocorre rapidamente, mas de forma reversível (onde k_1 e k_2 são as constantes de velocidade para esses processos). O substrato ligado à enzima é então transformado em um produto (P) que se dissocia da enzima, um processo também reversível (constantes de velocidade k_3 e k_4). O poder catalítico de uma enzima em um determinado substrato envolve duas variáveis básicas: K_m , chamada de constante de Michaelis - Menten, que é uma medida da afinidade da enzima pelo seu substrato, e V_{max} , que é uma medida da velocidade máxima da catálise enzimática.⁸⁶

Um fator que afeta a velocidade das reações catalisadas por enzimas é a concentração do substrato. Entretanto, como a concentração do substrato se modifica à medida que ele se transforma em produto, é complexo medir os efeitos da concentração na velocidade da reação. Uma abordagem que simplifica os experimentos é medir o efeito da [S] na velocidade inicial (V_0) da reação enzimática. Quando a [S] é relativamente baixa, V_0 aumenta quase linearmente com o aumento de [S], em altas concentrações de substrato, V_0 aumenta muito pouco, essa tendência se mantém até que é atingido um ponto no qual o aumento de [S] leva a um aumento insignificante de V_0 . Nesse ponto V_0 atinge um platô próximo à velocidade máxima, como mostrado no Gráfico 2 (pág. 63).

No gráfico 2 nota-se que a velocidade máxima, V_{max} , é extrapolada do gráfico porque V_0 se aproxima, mas nunca atinge V_{max} , além disso, a concentração do substrato na qual V_0 é

metade da velocidade máxima é K_m , a constante de Michaelis-Menten. O efeito da concentração do substrato na velocidade da reação pode ser demonstrado matematicamente por meio da equação de Michaelis-Menten (equação 2).

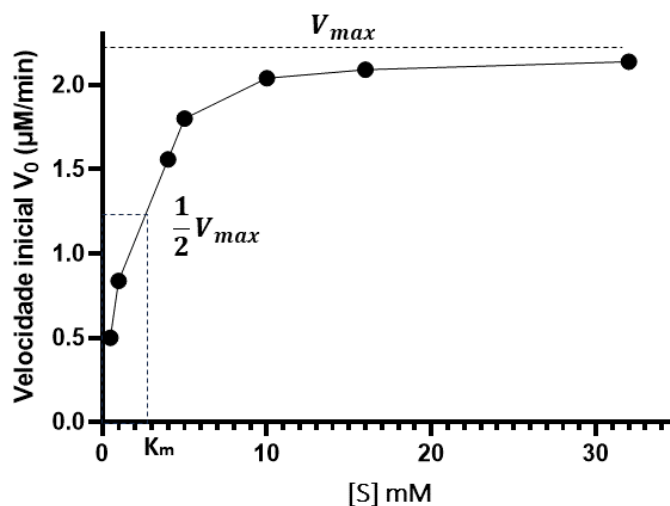


Gráfico 2: Efeito da $[S]$ na velocidade inicial de uma reação enzimática.

$$V = V_{max} [S] / (K_m + [S]) \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde, V = velocidade da reação, $[S]$ = concentração do substrato, V_{max} = velocidade máxima de reação e $K_m = [S]$ em $\frac{1}{2} V_{max}$ ⁸⁵.

A constante de Michaelis-Menten, além de indicar a concentração do substrato onde a velocidade da reação é a metade da velocidade máxima, indica a magnitude da interação substrato-enzima. Uma enzima com baixa afinidade pelo substrato apresenta alto valor de K_m , enquanto que uma enzima com alta afinidade pelo substrato apresenta baixo valor de K_m .

Os parâmetros K_m e V_{max} podem ser obtidos, de forma mais intuitiva, a partir do gráfico do inverso do gráfico de Michaelis-Menten, chamado de gráfico duplo-recíproco, conhecido também como linearização de Lineweaver-Burk (Gráfico 3, pág. 64). O gráfico linearizado responde à equação 3, o inverso da equação 2:

$$\frac{1}{V} = (K_m/V_{max}) (1/[S]) + (1/V_{max}) \quad \text{(Equação 3)}$$

A inclinação da reta para esta equação é dada por K_m/V_{max} . O ponto no qual a linha de regressão linear intercepta o eixo y é numericamente equivalente a $1/V_{max}$, e o ponto no qual

intercepta o eixo x é $-1/K_m$. Portanto, um gráfico de Lineweaver-Burk fornece intercepções facilmente identificáveis nos eixos x e y que, por sua vez, definem as duas variáveis cinéticas, K_m e V_{max} e por isso é mais prático para definir os parâmetros cinéticos de reações enzimáticas.⁸⁵

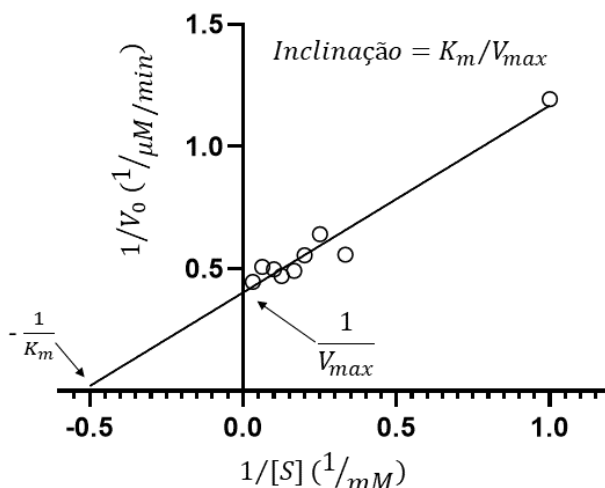


Gráfico 3: Gráfico duplo recíproco (Lineweaver-Burk).

1.3.4 Determinação dos parâmetros cinéticos da inibição da urease pelo selenomonastrol

A avaliação dos parâmetros cinéticos da reação entre enzima e substrato na presença de inibidor permite definir o mecanismo de ação do inibidor em estudo. Os inibidores mais comuns são os reversíveis, esses podem ser classificados como inibidores competitivos, não competitivos e mistos.

Inibidores competitivos, como o nome sugere, competem com o substrato pelo sítio ativo da enzima. Devido a essa competição, se $[S]$ for alta o efeito do inibidor competitivo pode ser superado caso o substrato ocupe todos os sítios de ligação. A V_{max} da reação catalisada pela enzima na presença de um inibidor competitivo permanece inalterada em relação ao normal. Por outro lado, o valor K_m , nesse caso chamado de K_m aparente, é aumentado, uma vez que uma concentração mais alta de substrato é necessária para superar os efeitos inibitórios do competidor.^{85,86}

Inibidores não competitivos não competem pelo sítio ativo e se ligam apenas ao complexo enzima-substrato. A ação desses inibidores altera tanto o valor de V_{max} quanto o de K_m . Por fim, inibidores mistos interagem em sítios diferentes do sítio ativo da enzima e podem interagir tanto com a enzima livre, quanto com o complexo enzima-substrato. Nesse caso, o

inibidor afeta K_m e V_{max} . O efeito na V_{max} é justificado pela inativação da enzima provocada pelo inibidor, que leva à diminuição de $[E]$ efetiva da qual V_{max} depende. O valor de K_m pode aumentar ou diminuir, dependendo de qual das formas da enzima, E ou ES, o inibidor liga mais fortemente.^{85,86} Diante disso, foi possível então, por meio de ensaios enzimáticos, definir o tipo de inibição dos compostos ABSe-c (seleno-monastrol) e ABSe-d sob a enzima urease e os valores dos parâmetros cinéticos.

O gráfico do duplo recíproco (Figura 26B, pág. 67) para seleno-monastrol mostra que a interseção das retas ocorre sobre o eixo y do gráfico, o que é característico de um inibidor competitivo. Desse modo o tratamento matemático adequado foi utilizado para os valores dos parâmetros cinéticos de interesse. A equação de Michaelis-Menten para inibidores competitivos toma a forma da equação 4.

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_m + [S]} \quad \text{(Equação 4)}$$

Em que $\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$ e $K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$, onde $[E]$ é a concentração da enzima livre;

$[I]$ é a concentração do inibidor e $[EI]$ é a concentração do complexo enzima-inibidor e αK_m é a constante de Michaelis-Menten para a reação enzimática na presença de um inibidor competitivo. A constante K_i é denominada constante de dissociação e mensura a afinidade do inibidor com a enzima: quanto menor a constante de dissociação maior a afinidade inibidor-enzima. O valor α refere-se ao fator de multiplicação entre K_m na ausência de inibidor e K_m na presença de inibidor (também chamado de K_m aparente).

Os parâmetros K_m e V_{max} foram definidos por meio do gráfico do duplo recíproco. No caso de inibidores competitivos, o gráfico responde ao inverso da equação 4. A forma linear é dada pela equação 5A que tem a fórmula genérica $Y = ax + b$. Os valores de K_i e α foram determinados por meio das relações matemáticas descritas na equação 5B.

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad \text{(Equação 5A)}$$

$$\alpha = \frac{K_{map}}{K_m} ; K_i = \frac{[I]}{(\alpha - 1)} \quad \text{(Equação 5B)}$$

Os resultados mostraram que a velocidade $V_{\max}$ da urease não foi afetada pela presença do inibidor, no entanto, observou-se aumento do valor de K_m . O valor de K_m quando a concentração de inibidor é 0, refere-se ao valor da constante de Michaelis-Menten para a reação enzima-substrato pura. Quando há o aumento da concentração de inibidor, observa-se também o aumento dessa constante em um fator α . O aumento de K_m indica que a interação urease-ureia é menos pronunciada quando a reação ocorre na presença do inibidor, o que corrobora o comportamento competitivo do inibidor (Tabela 5).

Esse resultado evidencia que o seleno-monastrol compete com a ureia pelo centro ativo da enzima. Isso reforça a hipótese de que, no caso desse inibidor, o átomo de selênio se complexa aos íons de níquel do sítio ativo mais efetivamente que o oxigênio da ureia, o que indica que a interação Se-Ni é interessante para a inibição da urease.

Tabela 5: Parâmetros cinéticos para a reação enzimática ureia-urease na presença do inibidor ABSe-c

	[I] (μM)	K_m ou αK_m	$V_{\max}$ ou V_{app}	α	α'	K_i	K_i'
ABSe-c	0	1,8956	2,4789	-	-	-	-
	0,8	4,6745	2,4654		-		-
	2,0	3,7623	2,5284	2,2253 $\pm 0,24$	-	1,2883 $\pm 0,74$	-
ABSe-d	0	2,2421	2,3923	-	0		0
	30	4,2399	2,0161	2,2439	1,1866	22,998	145,45 ± 1
	50	5,3215	1,7283	3,2853	1,3842	$\pm 1,11$	5,31

[I]= concentração de inibidor em μM ; K_m = constante de Michaelis-Menten; $V_{\max}$ = velocidade máxima de reação; K_i e K_i' = Constantes de dissociação.

Os experimentos para a determinação dos parâmetros cinéticos do inibidor ABSe-d foram realizados de maneira semelhante. Nesse caso, porém, no gráfico de Lineweaver-Burk as retas se interceptam no segundo quadrante (Figura 26D, pág. 67), o que é característico de inibidores mistos. Isso significa que o composto AbSe-d interage tanto com a enzima livre quanto com o complexo enzima-substrato. Nesse caso, foi definido por meio do tratamento matemático adequado, além dos parâmetros comentados (K_m , $V_{\max}$ e K_i), uma constante de dissociação que considera a interação inibidor-complexo enzima-substado, identificada como K_i' (Equação 6A-B).⁸⁵

$$A) K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} ; B) K'_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad (\text{Equação 6})$$

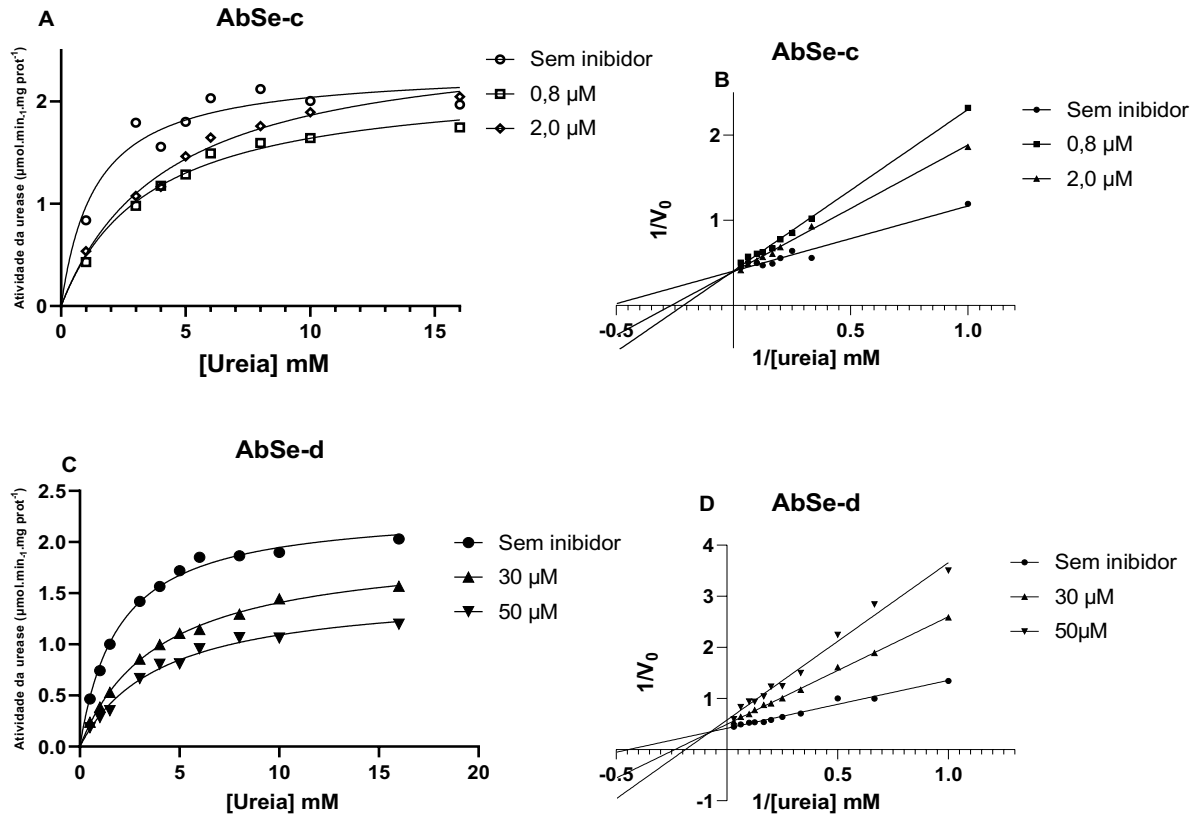


Figura 26: Gráfico de Michaelis-Menten e gráfico de Lineweaver-Burk para a reação enzimática na presença dos inibidores ABSe-c (A e B) e AbSe-d (C e D).

A equação de Michaelis-Menten para inibidores mistos toma a forma da equação 7.

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{max}}, \text{ onde, } \alpha' = \alpha' = \frac{V_{max}}{V_{max app}}. \quad (\text{Equação 7})$$

De modo semelhante ao caso anterior, os parâmetros cinéticos foram definidos para o inibidor AbSe-d e os resultados permitiram observar que valor da constante de Michaelis-Menten aumentou com o aumento da concentração de inibidor ($\alpha K_m > K_m$), enquanto que a velocidade máxima (V_{max}) diminuiu com o aumento da concentração de inibidor, o que corrobora a indicação do mecanismo misto de inibição do composto AbSe-d. Além disso, a definição dos parâmetros cinéticos permitiu ainda visualizar que o valor da constante K'_i é superior ao de K_i , o que indica que o composto em questão apresenta maior afinidade pela enzima livre frente ao complexo urease-ureia.

1.4 Conclusões

Com base no exposto, é possível concluir que este trabalho resultou na síntese bem-sucedida de 16 adutos de Biginelli, classificados em derivados de ureia, derivados de tioureia, isotioureias e adutos de Biginelli contendo selênio, utilizando diferentes metodologias sintéticas. Os adutos derivados de ureia e tioureia foram obtidos por meio de uma metodologia tricomponente sob catálise ácida.

As isotioureias (adutos de Biginelli metilados) foram sintetizadas e análises de RMN confirmaram que a metilação ocorreu exclusivamente no átomo de enxofre, sem afetar as hidroxilas fenólicas. Análises bidimensionais de RMN também corroboraram a posição da ligação dupla C=N formada nesses compostos.

No que se refere aos adutos de Biginelli contendo selênio, uma metodologia de síntese em três etapas mostrou-se eficaz. Apesar do processo mais longo, foi possível isolar o produto final e, ao mesmo tempo, eliminar a necessidade de utilizar selenoureia, um reagente de custo elevado.

A atividade antiureolítica dos compostos sintetizados foi avaliada por meio de ensaios *in vitro* utilizando a urease vegetal *Canavalia ensiformis*. Os resultados indicaram que os adutos de Biginelli contendo selênio são os mais ativos da série, seguidos pelos derivados de tioureia, com os derivados de ureia apresentando a menor atividade. O composto de selênio análogo ao monastrol foi o mais potente, inibindo 90% da enzima a uma concentração de 100 μM , em comparação com 38% de inibição obtida pelo monastrol na mesma concentração. Isso sugere que a presença do selênio contribui positivamente para a inibição da urease.

Os compostos ABSe-c (seleno-monastrol) e ABSe-d foram os mais ativos, 90 e 52% de inibição a 100 μM , e com IC_{50} de $30,11 \pm 5,26 \mu\text{M}$ e $53,65 \pm 9,41 \mu\text{M}$, respectivamente. A investigação do mecanismo de inibição e a definição dos parâmetros cinéticos desses inibidores revelaram que o composto ABSe-c atua por meio de um mecanismo competitivo, competindo com a ureia pelo centro ativo da enzima. Enquanto que o composto ABSe-d interage com a enzima através de um mecanismo misto, podendo se ligar tanto à enzima livre quanto ao complexo urease-ureia, com maior afinidade pela enzima livre, conforme indicado pelas constantes de dissociação.

De modo geral, o trabalho permitiu o desenvolvimento de novos eficientes inibidores que interagem com a urease mesmo por meio de diferentes mecanismos de inibição. Os

resultados são promissores, no entanto, outros ensaios biológicos e modelagem molecular devem ser realizados para aumentar a compreensão sobre a interação enzima-inibidor de forma a auxiliar no desenvolvimento de inibidores ainda mais eficientes.

CAPÍTULO II - Obtenção de Adutos de Biginelli derivados de ácidos borônicos e a influência do grupo no potencial inibitório de ureases

2.1 Introdução

Interesse medicinal em compostos orgânicos derivados de ácido borônico

O boro é um elemento encontrado na natureza em altas concentrações em frutas, vegetais e castanhas. Boranas, ácido bórico e ácidos borônicos (Figura 27) são as formas mais comuns de se encontrar o átomo de boro na natureza. Os compostos orgânicos de boro são as principais fontes de boro que tem suas propriedades medicinais exploradas. No entanto, as atividades biológicas desta classe de compostos só começaram a ser estudadas nos anos 2000, isso porque acreditava-se que o átomo de boro apresentava uma significativa toxicidade para os mamíferos.⁸⁷

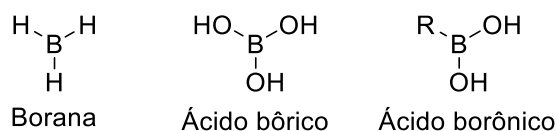
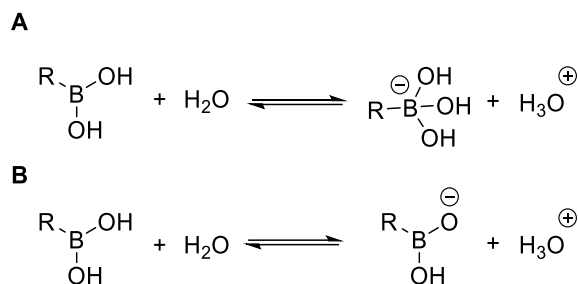


Figura 27: Compostos orgânicos de boro.

Atualmente, a crença sobre a toxicidade do boro foi superada, sabe-se que o boro desempenha importantes funções no desenvolvimento de plantas e é recomendado a ingestão de 1-13 mg de boro para seres humanos, que podem ser atingidos por meio de alimentação balanceada de frutas e verduras.⁸⁸

Quimicamente, os ácidos borônicos são considerados ácidos de Lewis. No pH fisiológico os ácidos borônicos mantém a forma desprotonada trigonal, em soluções aquosas com pH mais alto que o pK_a eles são convertidos para a forma tetraédrica aniônica (Esquema 10, A). Em raras situações, ácidos borônicos podem ser considerados ácidos de Brønsted–Lowry, no entanto, ocorrem quando a formação da forma tetraédrica é desfavorável (Esquema 10, B, pág. 71).⁸⁷



Esquema 10: Equilíbrio iônico de ácidos borônicos em solução aquosa. a) Ácidos borônicos como ácido de Lewis; b) Ácidos borônicos como ácido de Brønsted–Lowry.

O caráter de ácidos de Lewis dos ácidos borônicos conferem a este grupo a capacidade de interagir de maneiras interessantes em ambientes biológicos. Isso porque o orbital *p* vazio de ácidos borônicos pode formar ligações com nucleófilos como, por exemplo, grupos hidroxilados e/ou aminas presentes em resíduos de aminoácidos, carboidratos e ácidos nucleicos.

O bortezomibe (Figura 28, pág.72) tornou-se o primeiro medicamento contendo ácido borônico a ser aprovado tanto pela *Food and Drug Administration* (FDA) quanto pela *European Medicines Agency* (EMA) em 2003. Destinado ao tratamento de mieloma, um tipo de câncer de medula óssea, ele age como inibidor de proteassoma. A aprovação do bortezomibe por parte das agências reguladoras impulsionou outros estudos em Química Medicinal relacionadas aos ácidos borônicos, resultando na regulamentação de outros medicamentos.^{53,54}

O Ixazomibe (Figura 28, pág. 72) foi regulamentado pela FDA em 2015 e também é utilizado no tratamento de mieloma, apresentando um mecanismo de ação semelhante ao do bortezomibe. Outro medicamento, o vaborbactam, foi aprovado pela FDA em 2017. Trata-se de um ácido borônico cíclico que exibe atividade antibiótica por meio da inibição da β -lactamase. O vaborbactam é utilizado em combinação com outros antibióticos para tratar infecções urinárias, abdominais e pulmonares.⁵³

Além disso, os derivados de ácidos borônicos também encontram aplicação no tratamento de doenças tópicas. A oncomicosose, por exemplo, pode ser tratada com o taveborol (Figura 28, pág. 72), enquanto dermatites utópicas respondem ao uso de crisaborol.⁵⁴

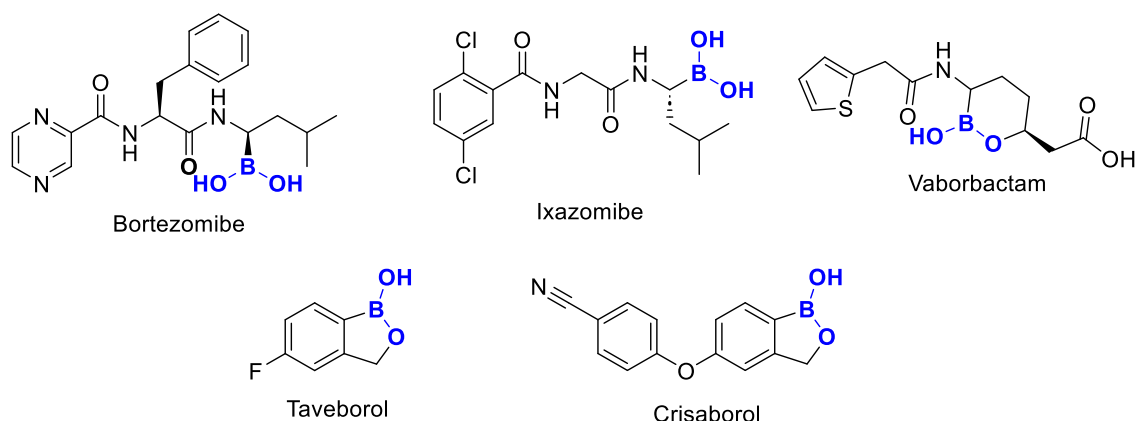


Figura 28: Ácidos borônicos aprovados pelas agências reguladoras para uso medicinal.

Desde a aprovação desses medicamentos, a alteração estrutural de medicamentos conhecidos para incluir o ácido borônico foram descritas⁵³. Isso resultou em diferentes aplicações biológicas atribuídas aos derivados de ácido borônico, incluindo atividade anticâncer, antiviral e antibiótica⁵⁴. Além disso, muitos estudos também descreveram a atividade antiureolítica do ácido bórico e seu mecanismo de ação contra diferentes ureases microbianas^{53,54}.

O fuvestranto (Figura 29) é um fármaco indicado para pacientes com câncer de mama avançado ou metastático, que atua ligando-se competitivamente ao receptor de estrogênio. Em 2016, Liu e colaboradores relataram o design, a síntese e a atividade anticâncer do fuvestranto modificado, que incluía na estrutura química o grupo $-B(OH)_2$ substituindo um grupo hidroxila. Os resultados mostraram que além de apresentar resultados semelhantes do fármaco original, o fuvestranto-borônico (Figura 29) exibiu maior biodisponibilidade. Isso se deve ao fato de que o grupo borônico levou a uma redução substancial do metabolismo de primeira passagem, o que se atribui à capacidade dos ácidos borônicos de se ligarem reversivelmente a 1,2 e 1,3-dióis presentes em moléculas de açúcar e glicoproteínas, deixando-o indisponível para passar pelos processos de metabolismo de primeira passagem.⁸⁹

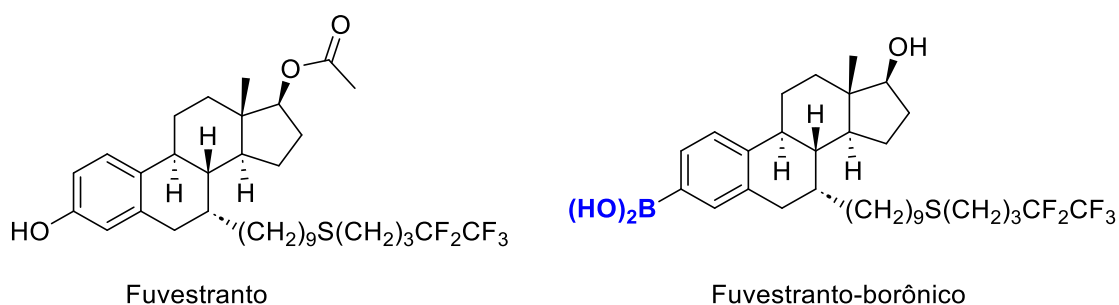
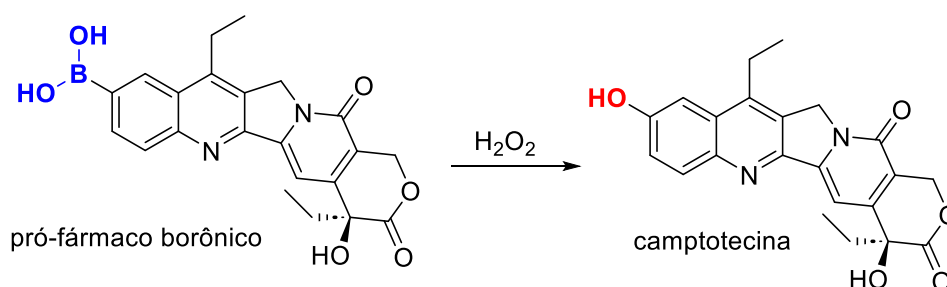


Figura 29: Fuvestranto e fuvestranto modificado incluindo o grupo ácido borônico.

Em outra investigação, Wang, identificou que um composto borônico baseado na camptotecina (Esquema 11), um agente anticâncer que inibe a enzima topoisomerase, lavando à morte celular, poderia atuar como pró-fármaco. Nessa abordagem, o grupo ácido borônico seria facilmente oxidado pelo peróxido de hidrogênio encontrado nas células cancerosas, resultando na formação da camptotecina intracelular. Além disso, o composto borônico pode se ligar aos 1,2 e 1,3-dióis presentes nas células, formando ésteres boronatos, o que aumenta a seletividade do medicamento em direção às células de câncer.⁹⁰



Esquema 11: Reação de oxidação do pró-fármaco que leva à formação da camptotecina.

Derivados de ácidos borônicos também apresentaram atividade antibiótica significativa. O composto 31 (Figura 30, pág 68) é considerado um dos mais eficazes inibidores de β -lactamases ($K_i=22$ nM). Seu design foi proposto com base na estrutura do substrato natural β -lactâmico, visando combinar diferentes grupos químicos e estereoquímica adequada com o ácido borônico. Os estudos de estrutura-atividade indicaram que a inclusão de grupos com carga negativa na cadeia lateral, como o grupo carboxilato, potencializa a penetração celular do composto e que os grupos OH do ácido borônio desempenham um papel importante na interação do inibidor com o nitrogênio de serina residual.⁹¹

O composto 32 (Figura 30, pág. 74) é outro exemplo promissor de ácido borônico com atividade antibiótica. Nesse caso, observou-se que derivados de ácido borônico podem ser eficazes no combate à *Staphylococcus aureus* resistente à metilina, uma bactéria comumente encontrada em ambientes hospitalares e de difícil tratamento. O composto **32** exibiu uma concentração mínima inibitória (CIM) de $7,81\mu\text{g.mL}^{-1}$ e nenhuma toxicidade foi apresentada. Adicionalmente, estudos de *docking* sugerem que a atividade antibiótica do derivado de ácido borônico pode estar relacionada à sua interação com a leucil-tRNA sintetase, uma enzima envolvida na síntese de proteínas bacterianas.⁹²

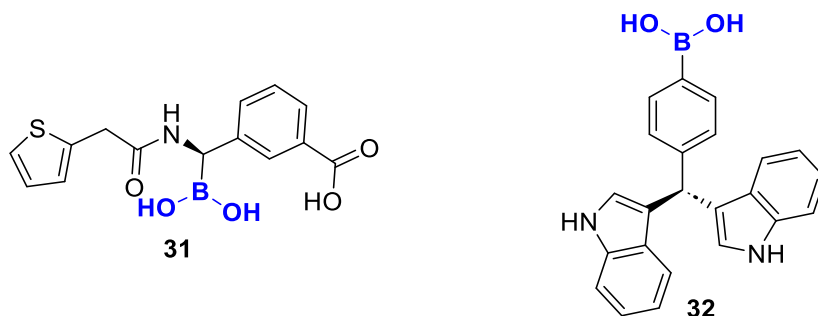


Figura 30: Estrutura química de derivados de ácido borônico com atividade antibiótica.

O ácido bórico e ácidos borônicos exibiram, em diferentes estudos, atividade antiureolítica contra ureases de diferentes fonte: *P. mirabilis*⁹³, *K. aerogenes*⁹⁴, *C. ensiformis*⁹⁵, *C. cajan*⁹⁶ e *G. max*⁹⁷. Todos esses estudos avaliaram a atividade antiureolítica de ácidos borônicos e do ácido bórico, os resultados são exibidos na Tabela 6 (pág. 75).

O mecanismo de ação da inibição dos ácidos borônicos não foi elucidado, no entanto, Hausinger e colaboradores sugeriram que os inibidores podem formar ligações covalentes no centro ativo da enzima.⁹³ Por outro lado, investigações *in silico* revelaram que o ácido bórico trigonal pode inibir a enzima ao formar complexos com o sítio ativo. Benini e colaboradores sugerem que o $B(OH)_3$ pode interagir com os átomos de Ni^{2+} por meio dos átomos de oxigênio, propõe ainda que o ácido bórico inibe a urease por meio de um mecanismo que envolve uma topologia de ligação similar à da ureia, funcionando assim como um análogo do substrato⁹⁸.

Adicionalmente, Leopoldini e colaboradores consideram que além da complexação envolvendo os átomos de oxigênio e níquel, uma ligação covalente entre o oxigênio ponte entre os átomos de níquel da urease e o átomo de boro pode ser formada, e afirmam que este complexo inibidor-enzima é ainda mais estável.⁹⁹

As variadas atividades biológicas demonstradas pelos ácidos borônicos tem estimulado estudos em busca de moléculas bioativas ainda mais eficientes. Especificamente no que diz respeito à inibição de urease, o mecanismo de ação dos ácidos borônicos ainda não é totalmente compreendido e isso motiva instigações experimentais e teóricas mais aprofundadas. Estas buscas podem esclarecer processo de inibição para contribuir com a descoberta de inibidores cada vez mais potentes.

Tabela 6: Resultados de inibição de ureases por ácidos borônicos

Fonte de urease	K _i (mM)				Referência
	Ácido bórico	Ácido butilborônico	Ácido 4-bromofenil borônico	Ácido fenilborônico	
<i>G. max</i>	0,20	1,50	0,22	2,00	63
<i>C. ensiformis</i>	0,23	-	-	-	61
<i>K. aerogenes</i>	0,33	-	0,37	10	60
<i>P. mirabillis</i>	0,099	0,547	0,124	1,26	59
<i>C. cajan</i>	0,35	1,8	0,3	2,5	62

$\text{HO}-\text{B}(\text{OH})_2$
 ácido bórico

$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{B}(\text{OH})_2$
 Ácido butilborônico

$(\text{HO})_2\text{B}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{Br}$
 Ácido 4-bromofenil borônico

$\text{C}_6\text{H}_5\text{B}(\text{OH})_2$
 Ácido fenilborônico

Neste trabalho foram sintetizados adutos de Biginelli, reconhecidos como inibidores de urease, conforme descrito no Capítulo I, e derivados de ácidos borônicos. A atividade antiureolítica destes compostos foi avaliada e, para os mais promissores, foram determinados o IC₅₀. Além disso, por meio de ensaios enzimáticos cinéticos, foram elucidados os mecanismos de inibição e através de testes de fluorescência foram elucidadas as interações inibidor-enzima que ocorrem durante o processo de inibição.

Para compreender o impacto do grupo B(OH)₂ na atividade antiureolítica desses compostos, as taxas de inibição encontradas para esses compostos foram comparadas com aquelas dos adutos de Biginelli que apresentam hidroxila no anel aromático em vez do grupo B(OH)₂. Adicionalmente, foram preparados adutos de Biginelli derivados de ureia e tiourea para investigar a possível melhoria da atividade ao alterar o calcogênio envolvido.

2.2 Objetivos

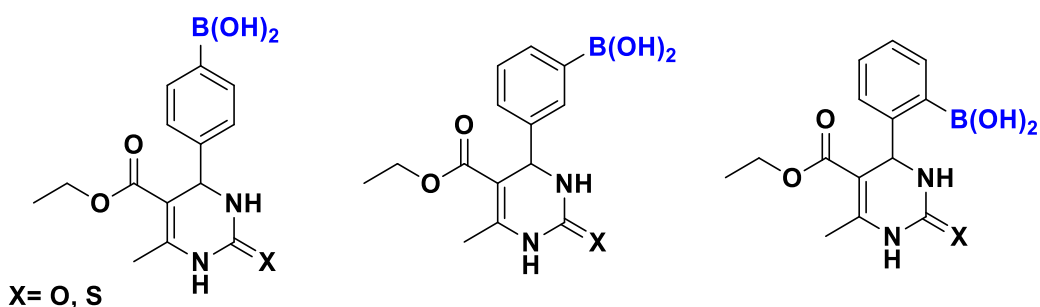
2.2.1 Objetivos gerais

Sintetizar e caracterizar os adutos de Biginelli conjugados com ácidos formilborônicos e derivados da ureia e tioureia, e investigar a atividade inibitória desses compostos contra a enzima urease, de modo a compreender a influência do grupo $B(OH)_2$ na ação inibitória dessa classe de compostos, o mecanismo de inibição e as interações inibidor-enzima.

2.2.2 Objetivos específicos

- Determinar as melhores condições para a síntese de adutos de Biginelli derivados de ácidos formilborônicos
- Realizar a síntese dos adutos de Biginelli conjugados com ácidos formilborônicos derivados de ureia e tioureia;
- Realizar o *screening* para determinar a porcentagem de inibição contra a urease *C. ensiformis* de todos os adutos de Biginelli em uma concentração fixa;
- Determinar o IC_{50} da inibição de urease para os inibidores mais ativos;
- Determinar o mecanismo de inibição e os parâmetros cinéticos para os melhores inibidores;
- Determinar as interações inibidor-urease por meio de testes de fluorescência.

Esquema geral dos adutos de Biginelli planejados



2.3 Resultados e Discussões

2.3.1 Síntese e caracterização dos adutos de Biginelli derivados de ácidos formilborônicos

A síntese dos adutos de Biginelli, derivados de ácidos formilborônicos começou com a definição do escopo de moléculas a serem estudadas. Foi determinado que a influência do grupo borônico na atividade antiureolítica deveria ser examinada em relação à sua posição no anel aromático. Portanto, foram planejados adutos de Biginelli com o grupo $B(OH)_2$ nas posições *orto*, *meta* e *para* do anel aromático.

Além disso, a influência do calcogênio foi mais uma vez considerada. Portanto, foram planejados adutos de Biginelli contendo ácido formilborônico derivados da ureia e da tioureia. Dessa forma, o escopo do estudo foi definido para incluir seis moléculas distintas (Figura 31). A atividade antiureolítica desses compostos foi então comparada com a dos análogos hidroxilados e dos adutos sem substituição no anel aromático (descritos no Capítulo I – ABS-a-d), a fim de compreender a influência do grupo $B(OH)_2$ no processo de inibição.

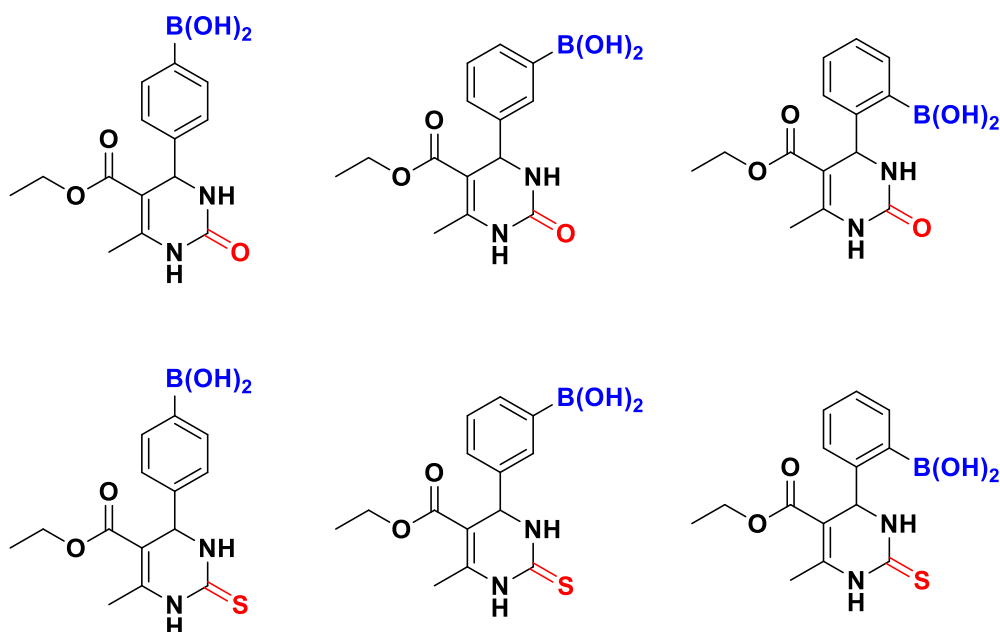


Figura 31: Adutos de Biginelli derivados de ácidos borônicos planejados.

Foi necessária aplicação de reações distintas para obtenção dos seis compostos de interesse: uma permitiu a síntese dos derivados de ureia e a outra os derivados da tioureia. Ambas serão abordadas a seguir, juntamente com os dados de caracterização.

2.3.1.1 Síntese e caracterização dos adutos de Biginelli borônicos derivados da ureia

A síntese de adutos de Biginelli contendo ácidos borônicos derivados da ureia foi relatada por Blacquiere¹⁰⁰. Nela, os compostos são preparados em acetonitrila, sob refluxo e na ausência de ácidos de Lewis como catalisadores. Os autores sugerem que a reação é auto-catalisada por meio do grupo ácido borônico dos aldeídos, que atua para mediar esta reação de uma maneira semelhante à relatada para outras reações de Biginelli catalisadas por ácido de Lewis. No trabalho citado, os compostos foram isolados com rendimentos entre 60 e 72%.

Essa metodologia foi reproduzida para a síntese dos adutos de Biginelli contendo ácido borônico de interesse. No entanto, não foi observada a formação do produto. Foi observado, por meio de cromatografia em cama delgada (CCD), que os reagentes não eram consumidos.

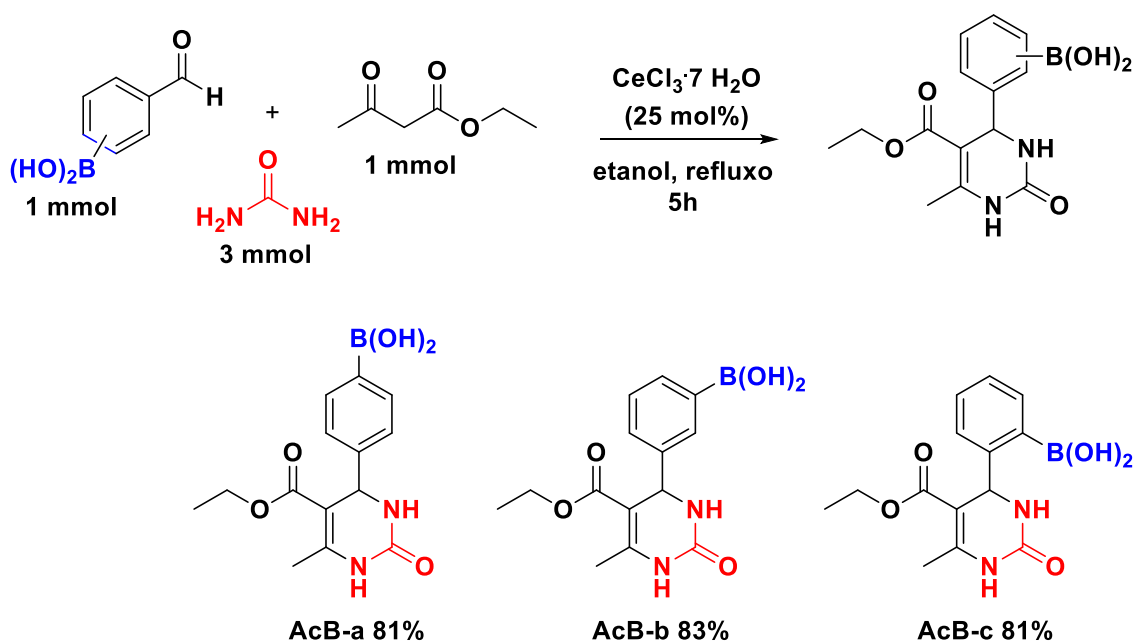
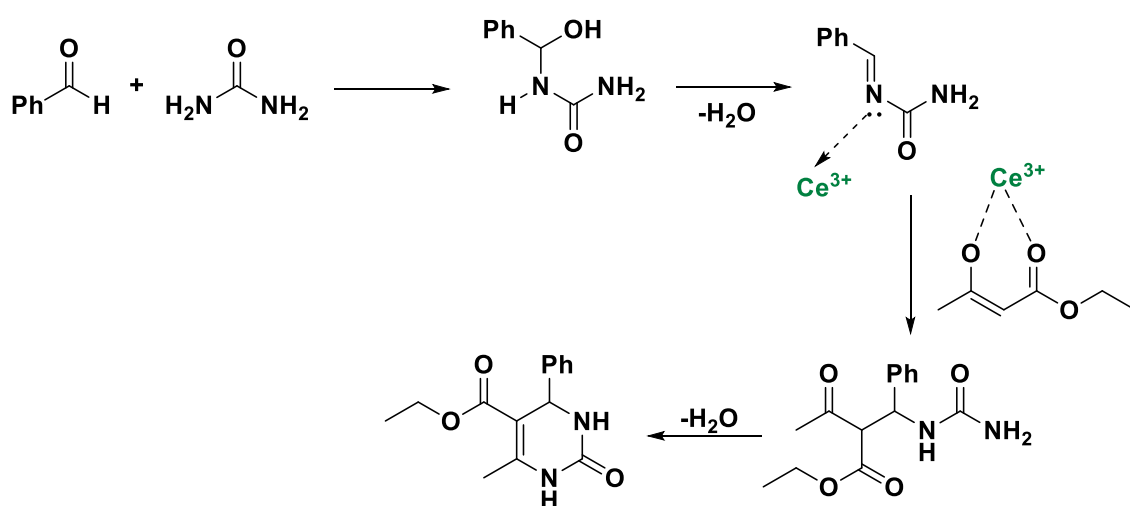


Figura 32: Síntese dos adutos de Biginelli, contendo ácido borônico derivados da ureia, e seus rendimentos.

Dessa maneira, os adutos de Biginelli contendo ácido borônico de interesse foram sintetizados via a reação que envolve catálise de $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, em etanol e sob refluxo por 5 horas. Após a conclusão da reação, o produto foi isolado por meio de precipitação com gotejamento de água gelada. Essa metodologia foi uma adaptação da metodologia relatada por Bose e colaboradores¹⁰¹. O esquema de reação, bem como os rendimentos obtidos para os produtos estão apresentados na figura 32. Todos os compostos são descritos na literatura.

Todos os produtos foram obtidos com rendimentos altos, entre 81 e 83%, não sendo, assim, observada alguma influência da posição do grupo $B(OH)_2$ com os rendimentos observados. No esquema 12 é apresentado o mecanismo proposto por Bose e colaboradores para justificar a formação do produto por meio da catálise com $CeCl_3$.

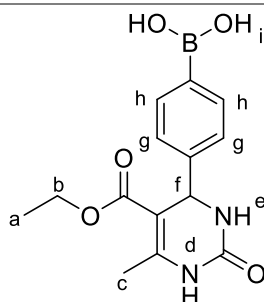
No mecanismo proposto, considera-se que a reação avança por meio da formação do intermediário formado pela reação do aldeído com ureia. Em seguida, ocorre a reação entre o íon imínio e a forma enólica do acetoacetato de etila, coordenado ao cério, gerando um intermediário de cadeia aberta que cicliza posteriormente por meio da condensação intramolecular, resultando na formação da diidropirimidinonas. O cério desempenha ainda o papel de estabilizador do intermediário imínio formado durante a reação. Devido ao orbital vazio 4f no íon cério, um complexo pode ser formado via uma ligação coordenativa com o par de elétrons não ligante do nitrogênio, o que estabiliza o intermediário.



Esquema 12: Mecanismo de formação dos adutos de Biginelli catalisada por $CeCl_3$.

Todos os produtos obtidos foram caracterizados por meio de espectros na região do infravermelho e RMN de 1H e ^{13}C . Os resultados estão em concordância com os dados descritos na literatura. Na Tabela 7 os dados de RMN de 1H do produto AcB-a são comparados aos dados disponíveis na literatura.

Tabela 7: Dados de caracterização do composto **AcB-a** comparados com os descritos na literatura



RMN de ^1H , 400 MHz, DMSO- d_6					RMN de ^1H , 400 MHz, DMSO- d_6^*				
Hidrogênio	δ	M	I	J	Hidrogênio	δ	M	I	J
H _a	1,10	t	3	8,0	H _a	1,09	t	3	7,0
H _b	3,97	q	2	8,0	H _b	3,97	q	2	7,0
H _c	2,24	s	3	-	H _c	2,24	s	3	-
H _d e H _g	7,71	d	3	-	H _d	7,65- 7,96	m	1	-
H _e	9,17	s	1	-	H _e	9,13	s	1	-
H _f	5,13	s	1	-	H _f	5,14	s	1	-
H _g e H _d	7,71	d	3	-	H _g	7,65- 7,96	m	2	-
H _h	7,18	d	2	8,0	H _h	7,16	d	2	7,0
H _i	7,99	s	2	-	H _i	8,02	s	2	-

*Resultados descritos na literatura (Blacquiere, *et al.*, 2005); δ = deslocamento químico (ppm), M = multiplicidade, I = integração, J = acoplamento (Hz), s = simpleto, d = duplete, t = tripleto, q = quarteto.

Como exemplo da caracterização será discutido o composto AcB-a (Figura 32, pág. 78). O espectro de RMN de ^1H de AcB-a (Figura S51, pág. 172) exibe um tripleto com deslocamento em 1,10 ppm integrado para 3 hidrogênios, atribuído aos hidrogênios do CH₃ do grupo etoxila, ainda nesse grupamento, observa-se um quarteto em 3,97 ppm referente ao CH₂. O simpleto exibido em 2,24 ppm foi atribuído à metila que provém do acetoacetato de etila, identificada como c. O simpleto com deslocamento em 9,17 ppm foi atribuído ao hidrogênio ligado ao nitrogênio derivado da ureia identificado como e, enquanto o hidrogênio ligado ao nitrogênio proveniente da ureia identificado como d, atribuiu-se o simpleto em 7,72 ppm. O duplete em 7,18 ppm integrado como 2 hidrogênios foi atribuído aos hidrogênios aromáticos identificados como h. O simpleto em 5,13 ppm é característico do hidrogênio CH do anel pirimídínico,

identificado como f. Por último foram atribuídos os deslocamentos referentes aos hidrogênios do anel aromático identificados como g, sendo um duplete em 7,71 ppm. Além disso, o espectro de infravermelho (Figura S62, pág. 178) está de acordo com o esperado, apresentando estiramentos característicos de grupos hidroxila em 3387 cm^{-1} , estiramento em 1684 cm^{-1} característicos de carbonilas e também o estiramento comum da B-O em 1364 cm^{-1} . Os demais compostos (AcB-b e AcB-c) foram caracterizados de forma análoga.

2.3.1.2 Síntese e caracterização dos adutos de Biginelli borônicos derivados da tioureia

Os adutos contendo ácido borônico derivados da tioureia foram descritos por Duguay e colaboradores¹⁰². Na metodologia apresentada a reação ocorre sob refluxo, em acetonitrila por 75 horas, e sob catálise de LiBr. Os compostos foram isolados com rendimentos entre 39-70%. No entanto, a tentativa de reprodução dessa metodologia não foi efetiva para obtenção dos adutos de Biginelli formilborônicos. O emprego da mesma metodologia utilizada na síntese dos adutos de Biginelli formilborônicos derivados da ureia também não foi eficaz para a síntese dos derivados da tioureia.

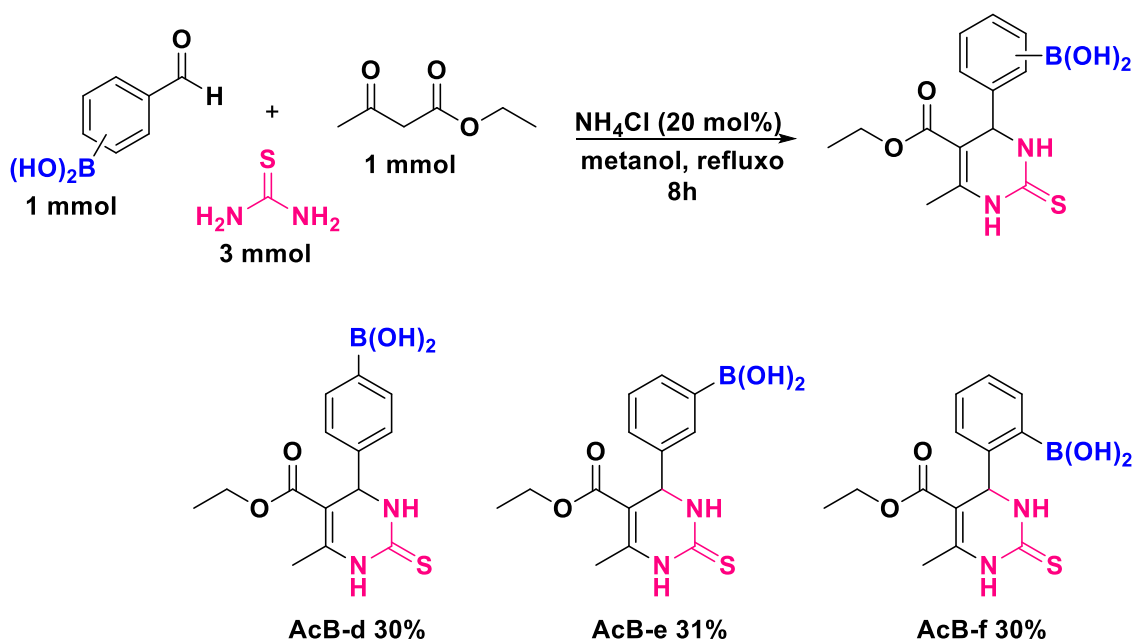


Figura 33: Síntese dos adutos de Biginelli contendo ácido borônico derivados da ureia e seus rendimentos.

Desse modo, foi utilizada a mesma metodologia empregada anteriormente para os adutos de Biginelli derivados do 2 hidroxibenzaldeído (discutidos no Capítulo I), utilizando NH_4Cl (20 mol%) como catalisador, em metanol, sob refluxo por 8 horas.⁸² Dessa vez foi possível obter os produtos com rendimentos apreciáveis. A purificação foi feita via

recristalização com diclorometano. O esquema de reação e os rendimentos dos produtos estão apresentados na figura 33 (pág. 81).

Os produtos finais foram obtidos com rendimentos médios de 30%, não sendo observada, novamente, relação entre a posição do grupo B(OH)₂ e os rendimentos observados. Todos os produtos foram caracterizados por meio de espectros na região do infravermelho, espectrometria de massas de alta resolução (IT-TOF) e RMN de ¹H e ¹³C. Os resultados estão em concordância com os dados descritos na literatura. Na Tabela 8 os dados de RMN de ¹H do produto AcB-d são comparados aos dados descritos por Duguay e colaboradores⁸⁸.

Tabela 8: Dados de caracterização do composto AcB-d comparados com os descritos na literatura

RMN de ¹ H, 400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆					RMN de ¹ H, 200 MHz, acetona- <i>d</i> ₆ *				
Hidrogênio	δ	M	I	J	Hidrogênio	δ	M	I	J
H _a	1,19	t	3	8,0	H _a	1,07	t	3	6,9
H _b	3,98	q	2	8,0	H _b	4,08	q	2	6,9
H _c	2,29	s	3	-	H _c	2,44	s	3	-
H _d	9,62	s	1	-	H _d	8,72	s	1	-
H _e	10,31	s	1	-	H _e	9,25	s	1	-
H _f	5,17	s	1	-	H _f	5,41	s	1	-
H _g	7,75	d	2	8,0	H _g	7,84	d	3	6,9
H _h	7,17	d	2	8,0	H _h	7,33	d	2	3,0
H _i	-	-	-	-	H _i	7,21	s	2	-

*Resultados descritos na literatura (Duguay *et al.*, 2008); δ= deslocamento químico (ppm), M = multiplicidade, I = integração, J = acoplamento (Hz), s = simpleto, d = dupletto, t = tripleto, q = quarteto.

Como exemplo da caracterização será discutido o composto AcB-d (Figura 33, pág. 81). O espectro de RMN de ¹H de AcB-d (Figura S57, pág. 175) exibe um tripleto com deslocamento em 1,19 ppm integrado para 3 hidrogênios, atribuído aos hidrogênios do CH₃ do grupo etoxila, ainda nesse grupamento, observa-se um quarteto em 3,98 ppm referente ao CH₂. O simpleto

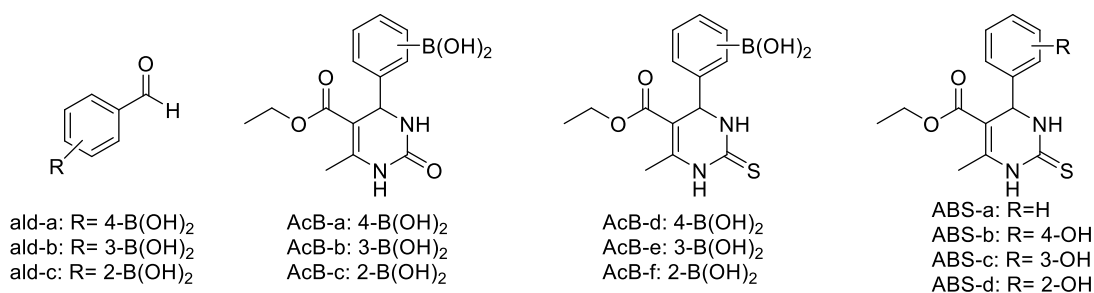
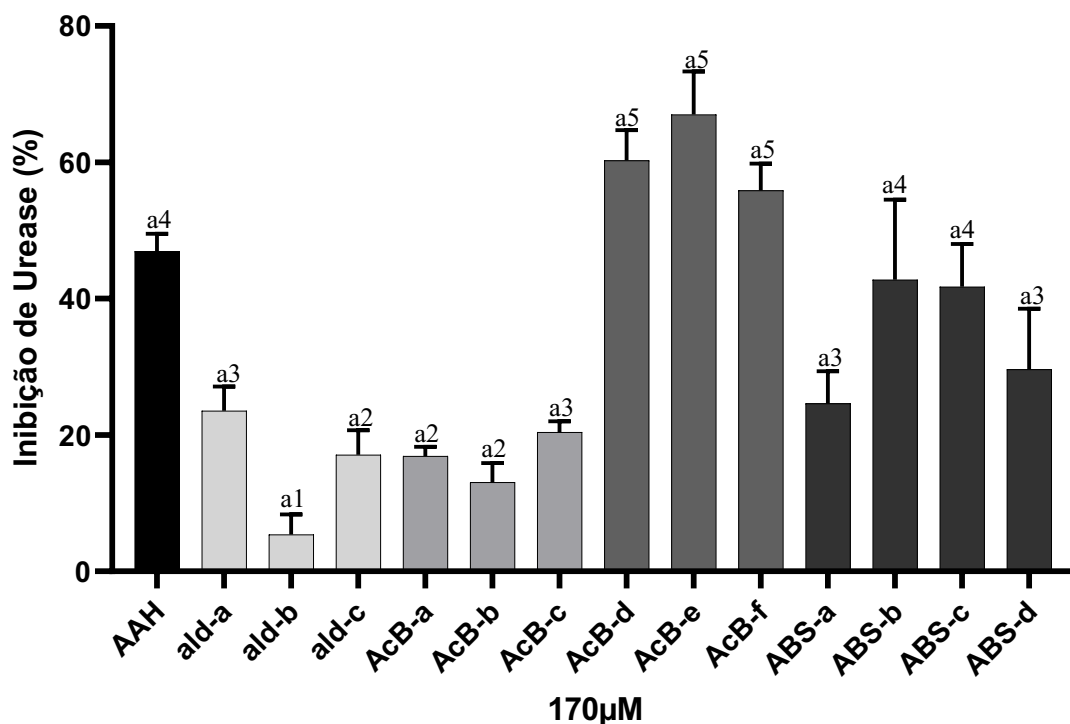
exibido em 2,29 ppm foi atribuído à metila que provém do acetoacetato de etila, identificada como c. O simpleto com deslocamento em 9,62 ppm foi atribuído ao hidrogênio ligado ao nitrogênio derivado da ureia identificado como e. O duplete em 7,17 ppm integrado como 3 hidrogênios foi atribuído aos hidrogênios aromáticos identificados como h. O simpleto em 5,17 ppm é característico do hidrogênio CH do anel pirimidínico, identificado como f. Por último foram atribuídos os deslocamentos referentes aos hidrogênios do anel aromático identificados como g, sendo um duplete em 7,75 ppm. Além disso, o espectro de infravermelho (Figura S65, pág. 176) está de acordo com o esperado, apresentando estiramentos característicos de grupos hidroxila em 3172 cm^{-1} , estiramento em 1685 cm^{-1} característicos de carbonilas e também o estiramento comum da B-O em 1360 cm^{-1} . Os demais compostos (AcB-e e AcB-f) foram caracterizados de forma análoga.

Uma vez que as sínteses dos adutos de Biginelli contendo o grupo borônico foram bem sucedidas e os seis compostos foram isolados, os testes de inibição de urease foram executados e os valores de IC_{50} e os mecanismos de ação dos compostos mais ativos foram estudados.

2.3.2 Testes de inibição de urease por adutos de Biginelli borônicos

Os testes de inibição de urease para os adutos de Biginelli derivados dos ácidos formilborônicos foram realizados por meio do método no indofenol, comentado no Capítulo I, no qual as taxas de inibição são mensuradas a partir a absorbância apresentada pelas micro reações entre ureia e urease na presença dos inibidores.

Gráfico 4: Média de inibição de urease dos adutos de inibidores testado a 170µM



Condições de reação: 12,5 µM de urease, 20 mM de ureia e 100 µM de cada composto testado. As soluções dos adutos de Biginelli foram preparadas dissolvendo os compostos em etanol. A solução de trabalho de urease foi preparada em tampão de fosfato 20 mM (pH 7,4 ± 0,1). Ácido aceto-hidroxiâmico foi utilizado como referência para a inibição da urease. Os índices a1-a6 referem-se ao agrupamento de resultados de mesma significância estatística definida por meio do teste de Scott Knott (significância de 0,05).

Para iniciar as investigações sobre a inibição da urease *C. ensiformis* foi feito um estudo de triagem, em quadruplicata, dos 6 adutos de Biginelli formilborônicos sintetizados, dos

análogos estruturais hidroxilados (ABS-a-d), os quais as sínteses e caracterizações foram descritas no Capítulo I, e dos ácidos formilborônicos puros. A concentração de todos os inibidores foi 170 μM e da urease de 12,5 mM, em tampão fosfato EDTA pH igual a 7, empregando o ácido aceto hidroxâmico (AAH) como padrão de referência. Os dados obtidos foram tratados estatisticamente com o teste de Scott Knott (significância de 0,05). Os compostos foram agrupados de acordo com a significância de atividade inibitória (Gráfico 4, pág. 84).

Este agrupamento é indicado pelos índices a-d apresentados no gráfico 4. Observa-se que os adutos de Biginelli borônicos derivados da tioureia (AcB-d-f) foram os únicos inibidores que apresentaram atividade inibitória significativamente maior ao do padrão de referência (AAH), enquanto que os demais compostos se dividiram entre inibições moderadas e mínimas.

Os adutos de Biginelli borônicos derivados da tioureia (AcB-d-f) apresentaram as maiores médias de inibição (AcB-d: 60%, AcB-e: 67% e AcB-f: 55%), enquanto os derivados de ureia exibiram atividades inibitórias baixas (AcB-a: 17%, AcB-b: 13%, AcB-c: 20%), estas observações estão alinhadas com a literatura que indica que os compostos contendo um núcleo de tioureia são mais eficazes na inibição da urease quando comparados aos análogos que contém o núcleo de ureia.^{36,37} Além disso, os precursores ácidos formilfenil borônicos (ald-a-c) apresentaram inibição mínima de urease (5-23% de inibição) e o ácido aceto hidroxâmico (AAH) exibiu 47% de inibição.

Para avaliar o impacto do grupo ácido borônico na inibição da urease por parte dos adutos de Biginelli derivados da tioureia, os efeitos inibitórios dos compostos AcB-d-f foram comparados com os efeitos inibitórios dos análogos estruturais hidroxilados e do aduto de Biginelli não substituído (ABS-a-d). Os compostos ABS-a-d foram testados na mesma concentração que os compostos borônicos (170 μM). As médias de inibição encontradas foram ABS-b: 42%, ABS-c: 41% e ABS-d: 29%, a análise comparativa revelou que os derivados de ácidos borônicos apresentam maior eficácia na inibição da urease em comparação com os análogos estruturais hidroxilados. A ausência de substituintes no anel aromático diminui ainda mais a inibição da enzima, sendo a inibição encontrada para o composto ABS-a igual a 24%.

Essa observação indica que o grupo $\text{B}(\text{OH})_2$ pode atuar diretamente na inibição da enzima, uma vez que a substituição desse grupo por OH diminui consideravelmente a inibição da urease. Nesse sentido, foi determinada a concentração mínima necessária para inibir a urease em 50% (IC_{50}) dos melhores inibidores de urease (AcB-d-f). Os valores de IC_{50} obtidos para

cada composto foram AcB-d: $168 \pm 12 \mu\text{M}$, AcB-e: $132 \pm 12 \mu\text{M}$ e AcB-f: $158 \pm 8 \mu\text{M}$. Sendo o composto AcB-e, o análogo estrutural do monastrol, o mais ativo da série. Esses compostos foram então avaliados em ensaios enzimáticos cinéticos para definir o mecanismo de inibição pelo qual a inibição ocorre e os seus parâmetros cinéticos (K_{mapp} e V_{maxapp}).

2.3.3 Determinação dos parâmetros cinéticos e do mecanismo de inibição dos adutos de Biginelli borônicos

O mecanismo de inibição do composto mais potentes (AcB-e) foi investigado por meio de ensaios enzimáticos que se utilizaram da reação entre ureia e urease na presença de diferentes concentrações dos inibidores. Nesses testes, a concentração do substrato (ureia) variou entre 0,5 e 32 mM. Como discutido no Capítulo I, a urease obedece à cinética de Michaelis-Menten nas condições empregadas, e o gráfico da velocidade inicial (V_0) versus concentração de ureia (mM) apresenta comportamento hiperbólico.

Para determinação do mecanismo de inibição do aduto de Biginelli borônico foram construídos os gráficos de Michaelis-Menten e os gráficos duplo-recíprocos de Lineweaver-Burk (Figura 34A-B, pág. 87). Esses gráficos também foram utilizados na determinação dos parâmetros cinéticos (K_M e V_{max}) para as reações que ocorreram na ausência e na presença de inibidores.

As intersecções das linhas do segundo quadrante do gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk revelaram que o composto AcB-e é um inibidor do tipo misto. Um inibidor misto pode interagir com a enzima livre (E) e o complexo enzima-substrato (ES). A equação de velocidade que descreve a inibição mista é a equação 6.

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_m + \alpha'[S]} \quad \text{(Equação 6)}$$

Onde, $\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$, $\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_i}$ e $[S]$ é a concentração do substrato, nesse caso, a ureia.

E, portanto, a equação que descreve o gráfico de Lineweaver-Burk para inibidores mistos é o inverso da equação 6, que tem a forma:

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_m}{V_{max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha}{V_{max}} \quad \text{(Equação 7)}$$

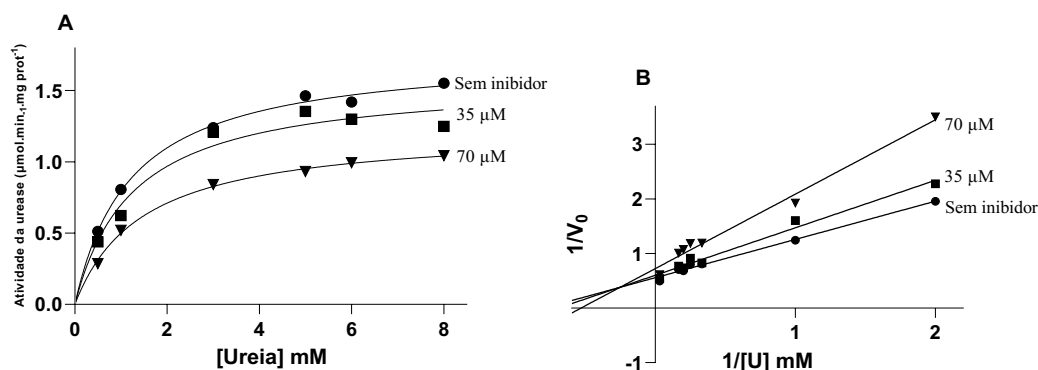


Figura 34: A) Gráfico de Michaelis-Menten (V_0 versus $[U]$) para urease na presença do inibidor AcB-e em reações contendo ureia com concentrações variando entre 0,5 e 32 mmol L⁻¹ e 12,5 mU de urease. **B)** Gráficos de Lineweaver-Burk para urease na presença do inibidor AcB-e.

Como dito anteriormente, inibidores mistos podem interagir com a enzima livre (E) e com o complexo enzima-substrato (ES) e isso interfere em como esses inibidores afetam a constante K_m e a V_{max} . Inibidores mistos diminuem o valor de V_{max} porque o inibidor desativa uma parte das moléculas de enzima presentes, diminuindo a $[E]$ efetiva da qual velocidade máxima depende. A constante K_m pode aumentar ou diminuir, dependendo de qual das formas da enzima, E ou ES, o inibidor liga mais fortemente.

No caso estudado, observa-se que os valores de V_{max} , como esperado, diminuíram com o aumento da concentração dos inibidores, enquanto que os valores de K_m aumentaram com o aumento da concentração dos inibidores, corroborando assim o mecanismo misto do composto AcB-e.

Como inibidores mistos podem interagir com o sítio ativo e com um sítio alostérico da enzima, duas constantes de dissociação podem ser definidas para esse tipo de inibidor. K_i e K'_i . A constante de dissociação K_i se refere à dissociação em relação ao sítio ativo da urease, e K'_i se refere à dissociação em relação ao sítio alostérico da enzima. Por meio das equações 8a e 8b é possível interpretar matematicamente que quando $K_i < K'_i$ a afinidade do inibidor pelo sítio ativo da enzima é superior à afinidade pelo complexo enzima-substrato, assim como quando $K'_i < K_i$ a afinidade do inibidor pelo complexo enzima-substrato é superior à afinidade com a enzima livre.

$$A) K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} ; B) K'_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad \text{(Equações 8a e 8b)}$$

As constantes de dissociação K_i e K'_i , bem como a constante K_m e V_{max} , foram calculadas para estes inibidores e seus valores são mostrados na Tabela 9. Os valores observados de K_i são menores que os valores de K'_i indicando que existe, para esses inibidores, uma maior afinidade com a enzima livre do que com o complexo enzima-inibidor.

Tabela 9: IC_{50} e constantes cinéticas determinados para os Adutos de Biginelli borônicos

AcB	IC_{50} (μM)	K_M (mM)	V_{max} ($\mu mol NH_4^+ min^{-1} mg^{-1}$)	K_i (mM)	K'_i (mM)
Sem inibidor	-	$1,25 \pm 0,52$	$2,65 \pm 0,32$	-	-
AcB-e	132 ± 12	$1,5 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,2$	112 ± 20	247 ± 68

IC_{50} : Concentração do inibidor na qual a inibição da enzima é de 50%. **K_{Mapp} :** Constante de Michaelis-Menten na presença de um inibidor. **V_{maxapp} :** velocidade máxima da urease na presença de inibidor. **K_i :** constante de dissociação de equilíbrio para o complexo urease-inibidor; **K'_i :** constante de dissociação de equilíbrio para o complexo urease-ureia-inibidor; os valores são a média $\pm$ desvio padrão de determinações em quadruplicata de um experimento representativo.

Para definir o modo de interação do inibidor com a enzima, os parâmetros termodinâmicos e as possíveis alterações conformacionais na enzima provocadas pelo inibidor, estudos biofísicos foram executados e serão abordados a seguir.

2.3.4 Estudos biofísicos da interação entre os adutos de Biginelli borônicos e a urease *Canavalia ensiformis*

2.3.4.1 Estudos de interação e parâmetros termodinâmicos

Estudos biofísicos da interação entre os adutos de Biginelli AcB-d, AcB-e, AcB-f, ABS-a e ABS-c (monastrol) e a urease de *Canavalia ensiformis* foram realizados para avaliar o mecanismo de ação desses compostos no processo de inibição enzimática. O processo de interação entre os adutos de Biginelli e a urease foi avaliado usando titulações espectrofluorimétricas em estado estacionário. Esse estudo se dá por meio da análise da fluorescência, que pode ser usada tanto seguindo o sinal do medicamento alvo ou da proteína¹⁰³. A emissão de fluorescência da urease é fornecida pela presença dos aminoácidos triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe). No entanto, o resíduo Phe possui baixo rendimento quântico de fluorescência ($\Phi = 0,04$) e, portanto, apresenta pouca contribuição¹⁰⁴.

Considerando que a urease possui resíduos de Trp e Tyr, a intensidade de fluorescência da urease na ausência e presença de adutos de Biginelli (AcB-d, AcB-e, AcB-f, ABS-a e ABS-c) foi medida a $\lambda = 333$ nm. Na Figura 35A (pág. 85) é representada a titulação da urease na presença de AcB-e. A adição de quantidades crescentes de inibidores levou à supressão da intensidade de fluorescência e a uma mudança na emissão. No caso do inibidor mais potente,

AcB-e, foi observado uma mudança na emissão máxima de λ_{max} de 333 para 345 nm, $\Delta\lambda = 12$ nm, o que é uma indicação de interação, e uma possível mudança conformacional na enzima.

A força da interação entre os inibidores e a urease foi avaliada a partir do cálculo da constante de dissociação (K_d). Essa constante foi calculada utilizando um modelo de equação não linear (equação 9), em seguida, foi calculada a constante de ligação (K_b) (equação 10):

$$\frac{F_0 - F}{F_0 - F_c} = \frac{[P]_t + [L]_a + K_d - \sqrt{([P]_t + [L]_a + K_d)^2 - 4 \times [P]_t \times [L]_a}}{2 \times [P]_t} \quad \text{(Equação 9)}$$

$$K_b = \frac{1}{K_d} \quad \text{(Equação 10)}$$

Onde, F_0 e F correspondem à intensidade de fluorescência na ausência e presença do inibidor, respectivamente, enquanto F_c é a intensidade de fluorescência da proteína totalmente complexada; $[P]_t$ é a concentração total de proteína e $[L]_a$ é a concentração adicionada do ligante^{105,106}.

A constante K_d está relacionada à afinidade do inibidor com a enzima, quanto menor o valor de K_d maior a afinidade entre as espécies envolvidas. Para avaliar a afinidade dos adutos de Biginelli com a urease, os valores de K_d foram comparados (Figura 35B, pág. 91), essa análise mostrou que a interação destes compostos com a enzima pode ser influenciada por dois fatores principais: a natureza e a posição do grupo substituinte.

Os compostos AcB-e, ABS-a e ABS-c possuem, respectivamente, grupos $B(OH)_2$, OH e H na posição *meta* do anel aromático. O aduto de Biginelli borônico, AcB-e, apresentou maior afinidade com a urease em comparação com outros compostos com diferentes substituintes na mesma posição. Esta observação pode ser atribuída à interação do grupo borônico com os átomos de Ni^{2+} presentes no sítio ativo da urease, semelhante ao observado para o ácido bórico¹⁰⁷.

Além disso, os valores de K_d também indicaram que, entre os análogos contendo o grupo $B(OH)_2$ (*orto* = AcB-f, *meta* = AcB-e e *para* = AcB-d), o composto AcB-e apresentou maior afinidade pela urease. Portanto, para avaliar de forma abrangente o processo de inibição da urease, o mecanismo de extinção preferencial e outros parâmetros biofísicos foram avaliados para o aduto AcB-e de Biginelli, que apresentou alta capacidade de inibição e afinidade com a enzima.

Dessa forma, foi então calculada a constante de Stern-Volmer (K_{SV}) do composto AcB-e. Esse parâmetro está relacionado ao processo de supressão de fluorescência, para interpretá-lo deve-se compreender que o fenômeno de luminescência se refere à emissão de luz pelas substâncias em temperaturas relativamente baixas. A luz emitida é característica da amostra, porque dependente da existência de estados eletrônicos característicos das moléculas que envolvidas. Os fenômenos que ocorrem na luminescência podem ser resumidos por três etapas⁹⁴:

- a) Absorção de um fóton de luz ($h\nu$) pelas moléculas M luminescentes, para atingir o estado eletrônico excitado M^* ;
- b) A molécula no estado excitado, M^* , pode retornar ao estado eletrônico fundamental por meio de emissão radioativa de um fóton de luz ou por meio de processos não radioativos;
- c) A molécula no estado excitado M^* pode também voltar ao estado eletrônico fundamental por meio de processos intermoleculares, por meio da ação de moléculas supressoras de luminescência, Q . Neste caso, o Modelo de Stern-Volmer descreve o processo de supressão dinâmica de luminescência. No modelo cinético de Stern-Volmer, a supressão da luminescência depende da colisão mútua entre a molécula excitada M^* e a espécie supressora Q , com constante de velocidade de supressão bimolecular k_q . Observam-se dois efeitos da supressão de luminescência: a redução da intensidade de emissão luminescente I , em relação à intensidade I_0 observada na ausência de supressor e a redução do tempo de vida τ do estado eletronicamente excitado M^* , relativamente ao tempo de vida observado na ausência de supressor, τ_0 .

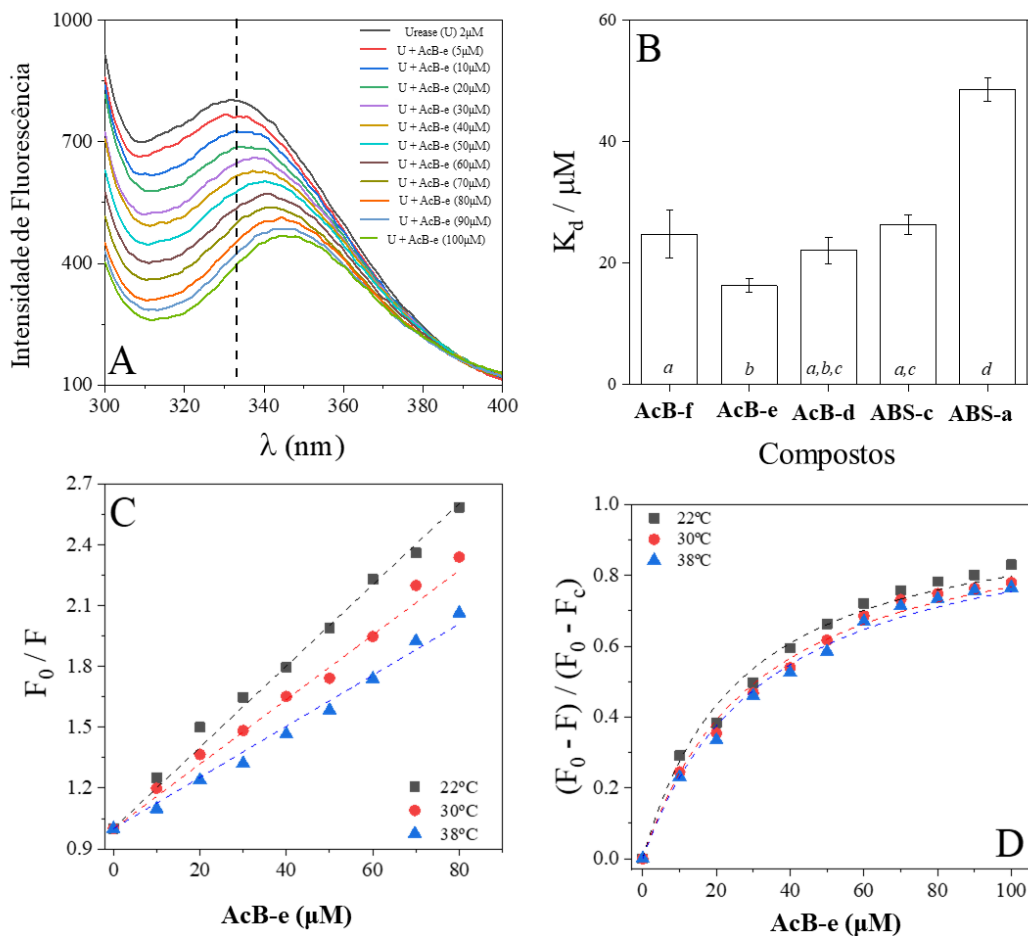


Figura 35: Interação da urease com os adutos de Biginelli. A) Titulação fluorimétrica da urease com AcB-e (a linha pontilhada corresponde ao comprimento de onda de emissão máxima de urease livre); B) Constante de dissociação (K_d) dos derivados AcB-d, AcB-e, AcB-f, ABS-c e ABS-a com urease. C) Linearização da equação de Stern-Volmer e D) equação de Scatchard (equação não linear) para o sistema urease-AcB-e em diferentes temperaturas. Os índices a - d nas colunas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Condições: tampão fosfato de sódio pH 7,4 (20 mM).

A constante de Ster-Volmer para o aduto de Biginelli borônico AcB-e foi calculada pela equação 11 expressada abaixo.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q] = 1 K_q \tau_0 [Q] \quad (\text{Equação 11})$$

Onde, k_q é a constante da taxa de extinção biomolecular, τ_0 é o tempo de vida médio do fluoróforo ($\tau_0 = 10^{-8}$ s) e $[Q]$ é a concentração do inibidor (quencher). A constante K_{SV} é o produto $K_q \tau_0$, e foi calculada por meio da linearização da equação 11 (Figura 35C)¹⁰⁸.

Além disso, foram calculadas as constantes K_d (Figura 35D) e K_b com variação de temperatura (22, 30 e 38°C) (Tabela 10, pág. 92). A extinção estática pode ser caracterizada pela formação de complexos inibidores de proteína no estado fundamental; assim, o aumento da temperatura causa uma redução nos valores de K_{SV} devido à desestabilização do complexo supramolecular¹⁰⁹.

Tabela 10: Parâmetros de ligação entre o aduto de Biginelli AcB-e com urease. Condições: tampão fosfato de sódio pH 7,4 (20 mM).

Inibidor	T (°C)	Parâmetros de ligação			
		K_{SV} ($10^4 M^{-1}$)	k_q ($10^{12} M^{-1} s^{-1}$)	K_d (mM)	K_b ($10^4 M^{-1}$)
AcB-e	22	$2,00 \pm 0,03$	2,00	$14,94 \pm 1,06$	$6,69 \pm 0,10$
	30	$1,59 \pm 0,02$	1,59	$19,78 \pm 1,03$	$5,06 \pm 0,08$
	38	$1,26 \pm 0,03$	1,26	$22,02 \pm 1,10$	$4,54 \pm 0,17$

Os resultados obtidos demonstram que o aumento da temperatura para o composto AcB-e diminuiu o K_{SV} , indicando o *quenching* estático como a dominante no complexo formado. Além disso, os valores de $k_q > 2.0 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$ confirmam o *quenching* estático como um processo preferencial.^{95,110} A magnitude do processo de interação entre AcB-e e a urease foi avaliada com base nos valores de K_b , que variaram de 4,54 a $6,69 \times 10^4 M^{-1}$, indicando uma força de ligação intermediária entre o inibidor e a enzima (Tabela 10).

Adicionalmente, as interações preferenciais que estabilizam os sistemas urease-AcB-e foram avaliadas por meio do cálculo dos parâmetros termodinâmicos (ΔG , ΔH e ΔS) calculados a partir da linearização do Van't Hoff (Equação 12):

$$\ln(K_b) = -\frac{\Delta H}{R} \left[\frac{1}{T} \right] + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{(Equação 12)}$$

Onde, T é a temperatura em Kelvin (K) e R é a constante do gás ideal. A energia livre de Gibbs foi calculada a partir da equação 13. Os valores obtidos para os parâmetros termodinâmicos são apresentados na tabela 11 (pág. 93).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{(Equação 13)}$$

Os valores negativos encontrados para ΔG (Tabela 11), permitem inferir que a formação do sistema urease-AcB-e ocorre de forma espontânea ($\Delta G < 0$). As variações de entalpia e entropia permitem concluir sobre as forças envolvidas no processo de interação da seguinte forma: $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$ forças hidrofóbicas; $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$ forças eletrostáticas; e $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$ ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals⁴¹.

No caso do sistema urease-AcB-e, as interações preferenciais no sistema foram as interações eletrostáticas, uma vez que $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$ (Tabela 11, pág. 93), possivelmente

indicando interação com íons Ni^{2+} no sítio ativo ou resíduos de aminoácidos carregados na cadeia lateral.

Tabela 11: Parâmetros termodinâmicos do sistema urease-AcB-e.

Condições: tampão fosfato de sódio pH 7,4 (20 mM).

Inibidor	Parâmetros Termodinâmicos			
	T (°C)	ΔG (KJ mol ⁻¹)	ΔH (KJ mol ⁻¹)	ΔS (J K ⁻¹ mol ⁻¹)
AcB-e	22	- 9,98		
	30	- 9,75	- 18,6	+ 29,2
	38	- 9,51		

2.3.4.2 Avaliação das mudanças conformacionais na urease

A interação de um inibidor pode causar mudanças conformacionais na enzima. Para avaliar as alterações conformacionais que o inibidor AcB-e pode causar na estrutura da urease, por meio dos resíduos de aminoácidos, experimentos de fluorescência tridimensional (3D) foram realizados, uma vez que os resíduos de triptofano (Trp), tirosina (Tyr) apresentam fluorescência conhecida. Nesses experimentos são adquiridos espectros de fluorescência 3D da enzima livre e da enzima na presença do inibidor, as diferenças observadas nos picos de cada espectro indicam o tipo de interação que ocorre no sistema urease-inibidor.

Nos espectros de fluorescência 3D (Figura 36, pág. 94) podem ser avaliados três picos de emissão: (i) pico 1, que corresponde ao efeito de espalhamento Rayleigh, caracterizado pela reemissão de radiação ($\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$) da água (solvente); (ii) pico 2, que corresponde à emissão de resíduos excitados de Trp e Tyr a 280 nm; (iii) e pico 3, que corresponde à excitação de estados eletrônicos mais excitados dos resíduos aromáticos presentes na proteína.

Avaliando quantitativamente os picos 2 e 3 (Figura 36 e Tabela 12, pág 88), percebe-se que as intensidades de fluorescência (IF) dessas regiões foram reduzidas em 43% quando o inibidor AcB-e foi adicionado (Figura 36B, pág. 94). Adicionalmente, há uma variação nos valores do desvio de Stokes (diferença de comprimento de onda entre as posições no espectro dos pontos máximos das bandas de absorção e emissão de fluorescência para a mesma transição eletrônica) quando se compara a urease livre e a urease na presença de inibidores. Estes resultados indicam que podem estar ocorrendo alterações na estrutura nativa da urease, especialmente no microambiente próximo aos resíduos de aminoácidos Trp e Tyr.

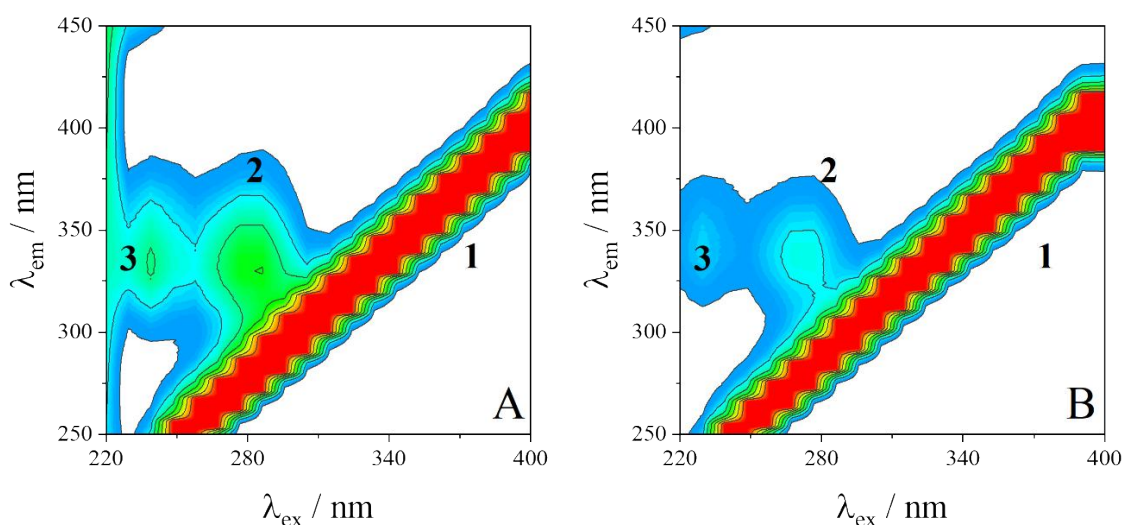


Figura 36: Espectros de fluorescência tridimensionais (3D) para A) urease (2 μ M) e B) urease + AcB-e (40 μ M). Condições: tampão de fosfato de sódio 20mM, pH 7,4, 25°C

Tabela 12: Parâmetros associados com os espectros de fluorescência tridimensional (3D) para a interação entre a urease e o inibidor AcB-e.

Condições: urease (2 μ M), AcB-e (40 μ M), tampão de fosfato de sódio 20mM, pH 7,4, 25°C.

Pico	Urease livre			Urease + AcB-e		
	Posição ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$)	Desvio de Stokes ¹ ($\Delta\lambda$, nm)	I_F^2	Posição ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$)	Desvio de Stokes ¹ ($\Delta\lambda$, nm)	I_F^2
1	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	> 1000	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	> 1000
2	277 / 330	53	504 (100%)	280 / 336	56	287 (57%)
3	239 / 335	96	400 (100%)	230 / 341	111	229 (57%)

¹Desvio de Stokes ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$) / ² I_F = intensidade de fluorescência

Estudos de fluorescência sincronizada também foram utilizados para avaliar as mudanças conformacionais no microambiente dos resíduos de aminoácidos fluorogênicos da urease (Tyr e Trp) contra o aduto de Biginelli borônico AcB-e. A espectroscopia de fluorescência síncrona se distingue das fluorescências de excitação e emissão devido a varredura simultânea de excitação e emissão, o que leva a algumas vantagens, como simplificação espectral, estreitamento da largura de banda e resolução melhorada¹¹¹. Na figura 37 (pág. 95) é ilustrado graficamente a diferença entre os espectros de excitação, emissão e fluorescência síncrona.

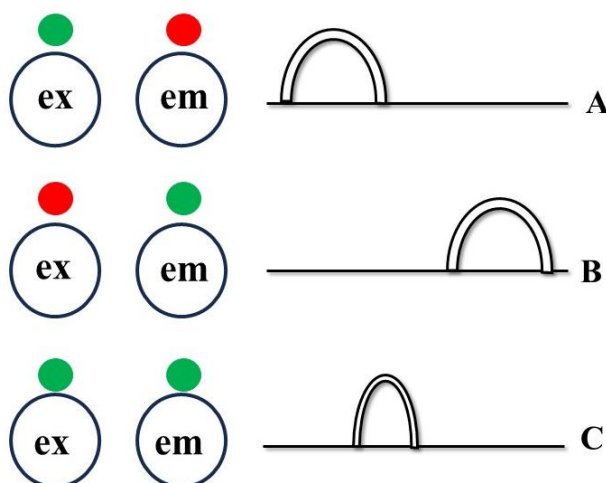


Figura 37: Diferentes espectros de fluorescência hipotéticos: (A) espectro de fluorescência de excitação (ex); (2) espectro de fluorescência de emissão (em); e (3) espectro de fluorescência síncrona. As esferas verdes e vermelhas representam o status do monocromador sendo “scanning” ou fixo, respectivamente.

Para investigar as mudanças conformacionais nos microambientes dos aminoácidos, foram empregados comprimentos de onda específicos: $\Delta\lambda = 15$ nm (Tyr) e $\Delta\lambda = 60$ nm (Trp). Observou-se que o composto AcB-e levou a uma redução na polaridade no microambiente Tyr, evidenciada pela diminuição do valor de λ_{max} . Em contrapartida, para o microambiente Trp, observou-se um aumento na polaridade, refletido por um deslocamento positivo de λ_{max} . Esses resultados sugerem alterações conformacionais nos resíduos de aminoácidos (Tyr e Trp) e, conseqüentemente, na estrutura da enzima. Os espectros de fluorescência síncrona são apresentados na figura 38A e C (pág. 96).

Por fim, considerando que os resíduos Tyr (410 e 544) da urease estão próximos ao sítio ativo, diferente dos resíduos de Trp que estão distantes do local catalítico da enzima³⁷, e que os resíduos de Tyr tiveram seu microambiente alterado de forma mais significativa do que os de Trp, é possível inferir que o inibidor AcB-e (inibidor misto) interage no sítio catalítico. Os estudos cinéticos, obtidos a partir da linearização de Stern-Volmer corroboram essa hipótese, $K_{\text{SV}(\text{Tyr})} > K_{\text{SV}(\text{Trp})}$ (Tabela 13).

Tabela 13: Parâmetros de ligação para titulação por fluorescência síncrona entre urease com o inibidor AcB-e. Condições: tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7.4, 25°C

Inhibitor	$\Delta\lambda$ (nm)	Stern-Volmer parameters		λ_{max} emission shift (nm)
		K_{SV} (10^4 M^{-1})	r^2	
4e	15	$1,94 \pm 0,16$	0,9875	- 11
	60	$0,74 \pm 0,02$	0,9970	+ 4

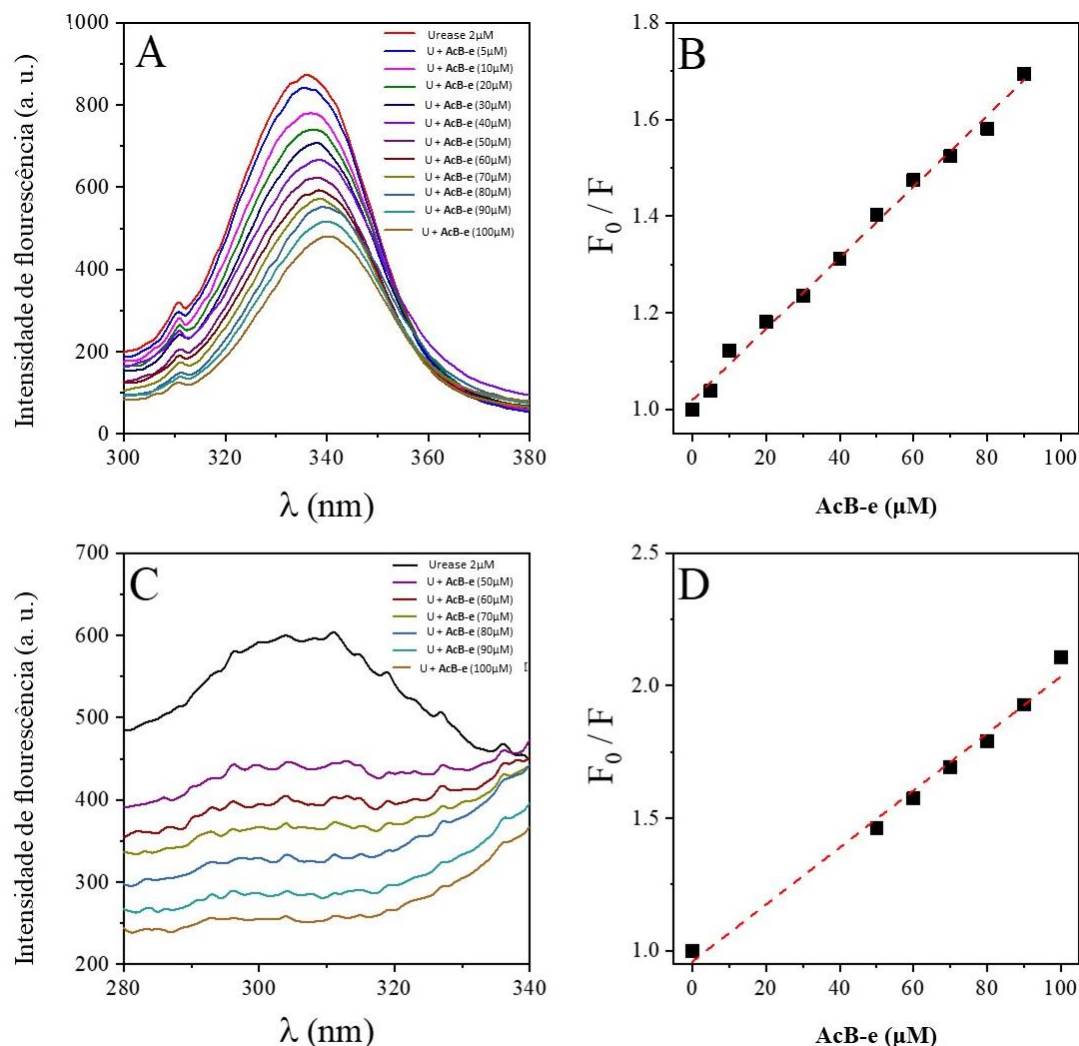


Figura 38: Avaliação da interação entre a urease e o aduto de Biginelli 4e por meio de fluorescência síncrona. Titulação fluorimétrica da urease com o aduto de Biginelli AcB-e utilizando (A) $\Delta\lambda = 15$ nm e (C) $\Delta\lambda = 60$ nm. Linearização da equação de Stern-Volmer da titulação empregando (B) $\Delta\lambda = 15$ nm e (D) $\Delta\lambda = 60$ nm. **Condições:** tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, 25°C.

2.3.4.3 Avaliação da formação do complexo enzima-inibidor por meio de espectroscopia UV-vis

A espectrometria de absorção UV-vis foi empregada para avaliar a formação do complexo urease-AcB-e. Esta técnica permite monitorar a formação de complexos supramoleculares e possíveis alterações estruturais na macromolécula com base nas alterações espectrais^{112,113}. Desta maneira, os espectros do AcB-e livre, da urease livre e do sistema AcB-e + urease foram adquiridos (Figura 39, pág. 97).

A subtração do espectro da enzima livre com o espectro do sistema AcB-e + urease não apresentou sobreposição (efeito aditivo da lei de Beer) com o espectro de absorbância da AcB-

e livre, o que se caracteriza como um indício de que se formou um complexo entre urease e o inibidor AcB-e¹¹⁴, corroborando com estudos de fluorescência molecular.

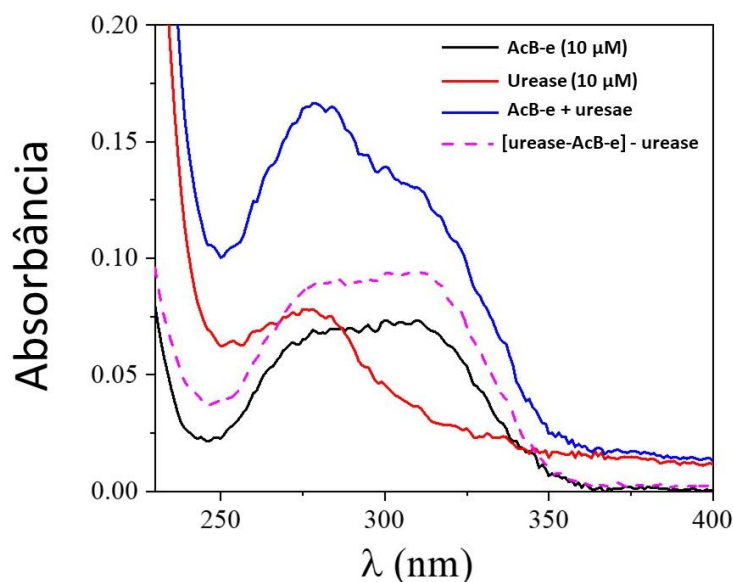


Figura 39: Espectros de absorção molecular UV-vis para os sistemas avaliados: AcB-e (10 μ M), urease (10 μ M), e urease + AcB-e. Condições: tampão de fosfato de sódio 20 mM, pH 7.4, 25°C.

2.3.4.4 Avaliação da interação do inibidor AcB-e com o sítio ativo da urease

Para avaliar o possível mecanismo de interação entre o aduto de Biginelli borônico AcB-e, e os prováveis locais da enzima onde o ligante interage, foram realizados dois experimentos de absorbância de UV-vis diferentes: (i) ensaio de interação entre ligante e íons Ni^{2+} , que estão presentes no sítio catalítico da urease e (ii) ensaios de competição com inibidores competitivos clássicos, por meio de titulações espectrofluorimétricas.

A tendência do AcB-e de complexar com íons Ni^{2+} foi avaliada usando três sistemas: AcB-e livre (10 μ M), Ni^{2+} (10 μ M) e AcB-e + Ni^{2+} (Figura 40, pág 98). Houve maior variação no espectro do sistema complexo AcB-e- Ni^{2+} em comparação ao ligante livre, uma vez que a absorção de íons Ni^{2+} hidratados é praticamente insignificante. Desse modo, a formação do complexo AcB-e- Ni^{2+} pode ser confirmada devido à presença de centros de coordenação no ligante relacionados aos átomos de oxigênio (O), enxofre (S) e nitrogênio (N) ou ao grupo borônico ($\text{B}(\text{OH})_2$), que, assim como o ácido bórico, pode complexar a átomos metálicos e, portanto, inibem a enzima.^{79,84,85,115}

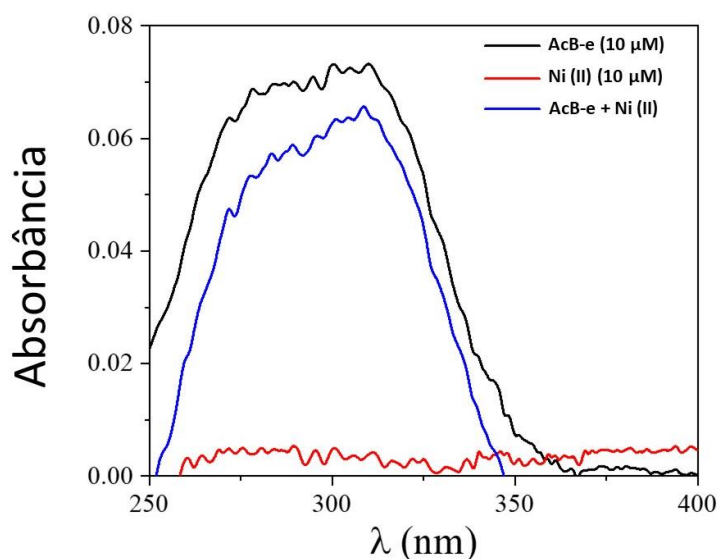


Figura 40: Espectro de absorção UV-vis para avaliar a complexação de derivados AcB-e com íons Ni^{2+} em solução. Condições: tampão de fosfato de sódio 20 mM, pH 7.4, 25°C.

Os inibidores clássicos da urease têm um modo de inibição bem definido, como o ácido aceto hidroxâmico (AHA), a hidroxíureia (HU), a tioureia (TIO) e a triamida *N*-(*n*-butil)tiofosfórica (NBPT), que são descritos como inibidores competitivos¹¹⁶. Foram realizados estudos de competição entre o inibidor AcB-e na ausência e na presença destes inibidores clássicos AHA, HU, TIO e NBPT, de modo que AcB-e pudesse concorrer com os inibidores clássicos pelo sítio ativo da urease.

Para cada sistema foram calculadas as constantes de ligação de AcB-e com urease, K_b e K_b' que são, respectivamente, a constante de ligação na ausência e presença do inibidor clássico. A razão dessas constantes (K_b'/K_b) foi utilizada como critério de avaliação, onde a relação $K_b'/K_b < 1$ indica interação com o sítio ativo da enzima por parte dos dois inibidores presentes. Os valores obtidos de K_b'/K_b para os quatro sistemas avaliados estão apresentados na Tabela 14, observa-se que os valores obtidos para a razão $K_b'/K_b < 1$, o que permite concluir que o inibidor AcB-e interage com a enzima por meio de complexação com os íons Ni^{2+} do sítio ativo da urease.

Tabela 14: A razão entre a constante de ligação com a urease com o aduto de Biginelli AcB-e na ausência (K_b) e na presença de inibidores competitivos clássicos (K_b')

Inibidor classico (concorrente)	K_b'/K_b
AHA	$0,026 \pm 0,002$
HU	$0,643 \pm 0,011$
TIO	$0,273 \pm 0,010$
NBPT	$0,457 \pm 0,012$

Na figura 41 é ilustrado uma proposta de interação do aduto de Biginelli borônico AcB-e no sítio ativo da urease, onde os átomos de Ni^{2+} são coordenados ao grupo derivado do ácido borônico, semelhante ao que ocorre na inibição dessa enzima por parte do ácido borônico.

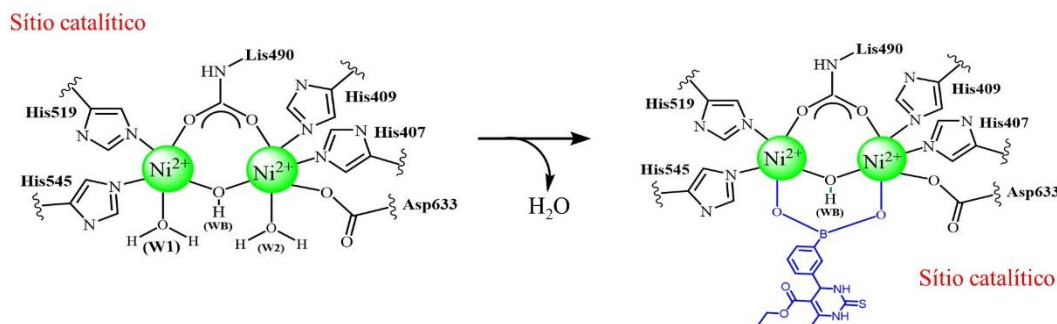


Figura 41: Proposta mecanística para interação do inibidor AcB-e com os íons de Ni^{2+} no sítio ativo da urease.

2.3.4.5 Transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET)

Estudos de FRET foram realizados com o aduto de Biginelli borônico para avaliar a distância entre o derivado receptor (AcB-e) e os resíduos de aminoácidos fluorogênicos (doadores) da urease no processo de transferência de energia. A transferência de energia de ressonância Foster (FRET) é uma técnica molecular amplamente utilizada para medir distâncias dentro e entre moléculas. A técnica é baseada em transferência não radiativa de energia entre uma molécula doadora excitada e uma molécula receptora. Forster desenvolveu a teoria para transferência não radiativa baseada em interações dipolo-dipolo¹¹⁷.

A eficiência da análise FRET está associada a três fatores: (i) a sobreposição entre o espectro de emissão de fluorescência da espécie doadora (urease) e o espectro de absorção do receptor (AcB-e); (ii) a orientação relativa dos dipolos doador e receptor; (iii) a distância (r_0) entre as espécies doadoras e as espécies receptoras de energia (2-8 nm). A distância (r_0) entre a urease e AcB-e e as energias transferidas do doador para o receptor (E), foram calculadas a partir da equação 14:

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_0^6} \quad \text{(Equação 14)}$$

Onde, R_0 é a distância crítica de Förster quando 50% da energia de emissão do doador é transferida para o receptor. A equação para a distância crítica R_0 é descrita como:

$$R_0 = \frac{8,8 \times 10^{-25} K^2 \times \Phi \times J}{N^4}$$

K^2 é o fator de orientação que está diretamente relacionado à geometria do dipolo entre a urease e o inibidor AcB-e, sendo igual a $2/3$ para orientação aleatória em solução; N é o índice de refração médio do meio no comprimento de onda onde ocorre a sobreposição do espectro é significativo ($N = 1,36$); Φ é o rendimento quântico do doador ($\Phi = 0,15$); J é a área de sobreposição do espectro de emissão de fluorescência normalizado da enzima em relação ao espectro de absorção dos inibidores e é expressado matematicamente como:

$$J = \frac{\int_0^\infty F(\lambda)\varepsilon(\lambda)\lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F(\lambda)dy}$$

A distância crítica de Förster (R_0) e a distância entre os resíduos fluorogênicos (r_0) da urease e o inibidor AcB-e obtidas aparecem entre 2,08 - 2,91 nm (Tabela 15), o que indica alta eficiência na transferência de energia entre as espécies. Esses estudos mostraram que o aduto de Biginelli borônico AcB-e apresentou pequenas distâncias entre os resíduos de aminoácidos fluorogênicos da urease.

Tabela 15: Parâmetros de FRET para a interação entre o inibidor AcB-e e a urease na proporção 1:1 e 1:2 (enzima: inibidor)

Inibidor	Concentração (μM)	J ($10^{-15} \text{ cm}^3 \text{ L mol}^{-1}$)	R_0 (nm)	E (%)	r_0 (nm)
AcB-e	10	2,59	2,08	18,5	2,91
	20	1,29	2,28	28,5	2,48

2.4 Conclusões

Este trabalho resultou na síntese bem-sucedida de seis adutos borônicos de Biginelli, divididos entre derivados de ureia e tioureia, utilizando uma metodologia tricomponente que proporcionou bons rendimentos.

Os testes *in vitro* de inibição da urease *Canavalia ensiformis* revelaram que os adutos borônicos de Biginelli derivados de tioureia são mais ativos do que aqueles derivados de ureia. Além disso, também foram mais ativos que os adutos de Biginelli derivados de hidroxibenzaldeídos. Entre os compostos avaliados, o análogo estrutural do monastrol, AcB-e, destacou-se como o inibidor mais potente da série, apresentando um IC_{50} de $132 \pm 12 \mu\text{M}$ na inibição da urease.

A investigação do mecanismo de inibição do composto AcB-e indicou que este inibidor atua por meio de um mecanismo misto, podendo interagir tanto com a enzima livre, seja no centro ativo ou no centro alostérico, quanto com o complexo urease-ureia.

Estudos adicionais de interação ligante-enzima foram conduzidos, incluindo ensaios biofísicos, experimentos de absorção UV-vis, e estudos sobre a energia de ressonância de Förster, todos corroborando a eficácia dos adutos borônicos de Biginelli na inibição da urease.

Os ensaios biofísicos, por meio de parâmetros termodinâmicos, sugeriram que o composto AcB-e possui alta afinidade pela urease. Além disso, experimentos de fluorescência 3D demonstraram que a interação entre o inibidor e a enzima provoca mudanças conformacionais nos resíduos de tirosina e triptofano da urease, o que, por sua vez, resulta em alterações na conformação geral da enzima.

Os experimentos de absorção UV-vis evidenciaram a formação do complexo urease-AcB-e durante o processo de inibição. Estudos adicionais, nos quais o aduto AcB-e foi adicionado à enzima na presença de inibidores competitivos clássicos, mostraram que os íons Ni^{2+} do sítio ativo da urease são complexados pelo grupamento B(OH)_2 .

Finalmente, os resultados dos estudos sobre a transferência de energia de ressonância de Förster indicaram que, durante o processo de inibição, o composto AcB-e se encontra a uma distância muito próxima dos resíduos de aminoácidos fluorogênicos (tirosina e triptofano), sugerindo alta eficiência na transferência de energia entre as espécies.

Em suma, este trabalho contribuiu para o desenvolvimento de novos inibidores de urease, oferecendo um conhecimento aprofundado das interações inibidor-enzima. Os ensaios biológicos destacaram o potencial do grupamento B(OH)_2 em complexar-se com íons Ni^{2+} , tornando-o uma característica promissora para o desenvolvimento de inibidores de urease mais eficazes.

CAPÍTULO III - Compostos orgânicos de selênio na inibição da urease fúngica de *Cryptococcus neoformans*

3.1 Introdução

3.1.1 Compostos orgânicos de selênio como alternativas terapêuticas para tratamento de infecções fúngicas

Os fungos estão amplamente presentes em plantas e animais, geralmente estabelecem relações simbióticas com os hospedeiros. No entanto, alguns fungos podem ser patogênicos, causando infecções graves que podem levar a morte do hospedeiro, como é o caso da tuberculose, malária e meningite, por exemplo.

Infecções fúngicas podem ser tratadas com agentes antifúngicos, mas resistência a esses medicamentos tem aumentado. Em resposta a isso, Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2021, divulgou a primeira lista de patógenos fúngicos prioritários, destacando aqueles de maior importância para a saúde pública, com a intenção de estabelecer medidas de proteção sanitária para pacientes expostos e incentivar a busca por novos medicamentos antifúngicos¹¹⁸.

A busca por novos agentes antifúngicos auxiliou na descoberta de novos compostos orgânicos antifúngicos, dentre eles, os compostos orgânicos contendo selênio são descritos na literatura como agentes antifúngicos altamente eficientes. Musthafa e colaboradores demonstraram que derivados de selenoureias apresentam alta atividade antifúngica nos de testes *in vitro* contra *Curvularia lunata*, *Penicillium notatum* e *Aspergillus niger*. Os compostos 1-3, ilustrados na Figura 42, foram os compostos em estudos e apresentaram valores de MIC abaixo dos padrões de referência utilizados (Streptomicina e Nistatina). O composto 3 foi o mais ativo da série, exibindo MIC igual a 19,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra *A. niger* e 11,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 24,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra *P. notatum* and *C. lunata* respectivamente. Os compostos 2 e 3 inibiram o crescimento do fungo de forma moderada, exibindo valores de MIC entre 25,3 e 63,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ¹¹⁹.

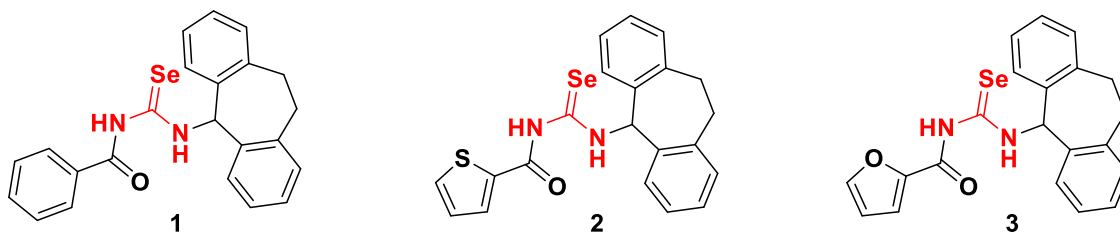


Figura 42: Derivados de Selenoureias com atividade antifúngica pronunciada.

Angeli e colaboradores, investigaram a atividade antifúngica de diferentes derivados de selenoureia. Os resultados relatados indicam que os esqueletos orgânicos contendo selênio

mostraram ação antifúngica comparável em relação aos medicamentos padrões, essa atividade foi suprimida quando o calcogênio foi substituído por seus elementos isostéricos, enxofre e oxigênio¹¹⁸. Alguns compostos apresentaram excelente seletividade contra *Malassezia pachydermatis* em relação às cepas do gênero *Malassezia furfur* e *Malassezia globosa* (Figura 43) e não apresentaram, nas concentrações nas quais foram testadas, citotoxicidade contra células humanas saudáveis, o que permite elencar esses derivados como novos antifúngicos promissores. Os autores depositaram uma patente dessa inovação em 2023¹²⁰.

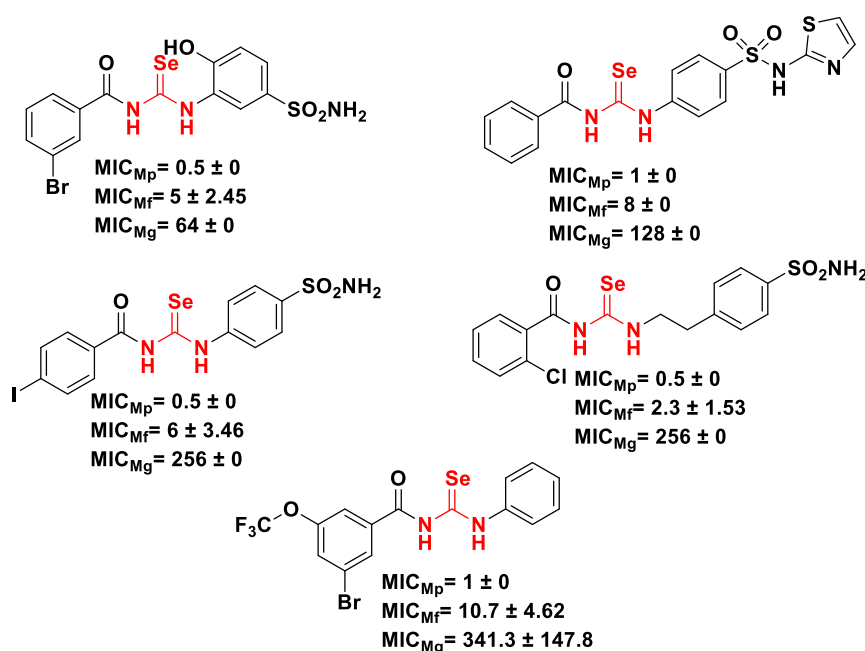


Figura 43: Derivados de selenourea com alta seletividade e atividade antifúngica. Os valores de MIC são expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e correspondem às cepas *M. pachydermatis* (Mp), *M. furfur* (Mf) e *M. globosa* (Mg), respectivamente.

Em outro estudo, Pietka-Ottlik e colaboradores, exploraram a atividade antifúngica de análogos do *ebsele*n (Figura 44, pág. 104) contendo grupos alquila na posição 2 ou contendo funções oxo-alquil ou aza-alquil. Todos os compostos sintetizados foram testados *in vitro* contra a cepa de levedura *C. albicans* e *A. niger*. Foi observado que os derivados contendo grupos alquila de cadeias curtas (até seis carbonos) na posição 2 do *ebsele*n apresentaram alta atividade fungicida contra a cepa *C. albicans*, com valores de MIC entre 1,0 e 3,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os mesmos compostos exibiram atividade antifúngica moderada contra o fungo *A. niger*, apresentando valores de MIC entre 8,0 e 28,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os compostos contendo funções oxo-alquil, ou aza-alquil, ou cadeias alquílicas longas (com 12 e 18 carbonos) na posição 2 não apresentaram atividade fungicida apreciável, o que sugere que apenas a presença do selênio não é determinante na atividade antifúngica desses compostos¹²¹ (Figura 44).

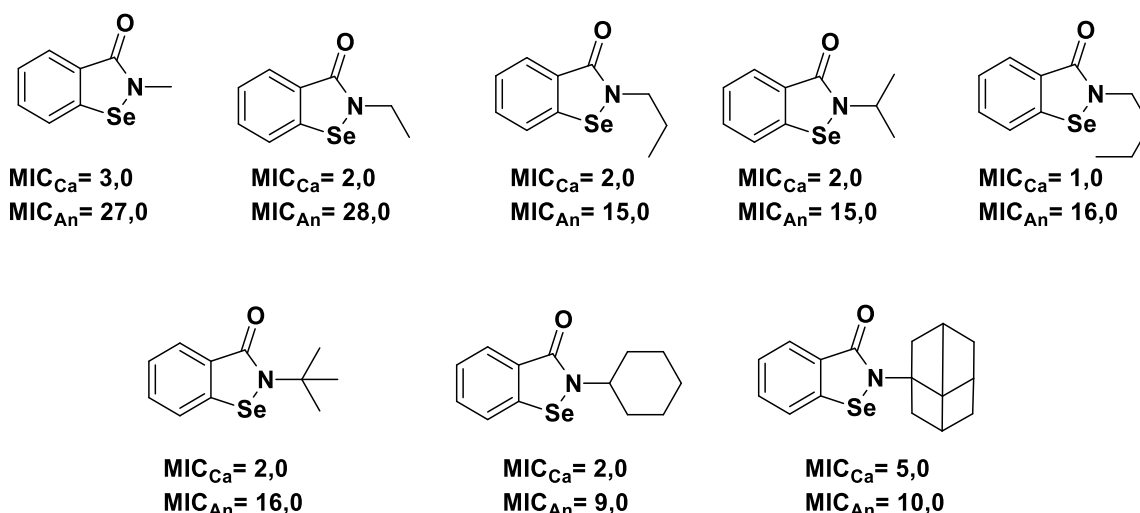


Figura 44: Derivados de *ebsele* com alta atividade fungicida. MIC em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e correspondem as cepas *C. albicans* (Ca) e *A. niger* (An), respectivamente.

3.1.2 *Cryptococcus neoformans*: alternativas no tratamento de um fungo ureolítico

O *Cryptococcus neoformans* é um patógeno fúngico que causa a meningite criptocócica (MC)¹²², uma infecção invasiva disseminada mundialmente e é responsável por uma alta taxa de mortalidade. Indivíduos imunocomprometidos, especialmente aqueles portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), são particularmente suscetíveis à meningite, com cerca de 152.000 casos por ano e mais de 74% de mortalidade^{123,124}.

A infecção pelo *C. neoformans* ocorre pela inalação de esporos presentes no ambiente, causando uma infecção pulmonar, mas a doença, embora possa parecer localizada, pode ser disseminada e afetar qualquer órgão¹²⁴ e está associada a diversos fatores de virulência fúngica. Entre eles, destacam-se os componentes da parede celular e da cápsula polissacarídica, a produção de melanina e enzimas e a capacidade de aderir e formar biofilmes. Esses fatores contribuem para a infecção cerebral e a disseminação dos fungos¹²².

Uma das enzimas expressada pelo *C. neoformans* é a urease,¹²⁵ enzima que catalisa a hidrólise da ureia em amônia. A liberação de amônia ocasionada pela ação dessa enzima enfraquece a parede endotelial da barreira hematoencefálica (BHE), facilitando a entrada do patógeno no sistema nervoso central (SNC)¹²⁶. Além disso, a hidrólise da ureia é importante para a sobrevivência dos fungos dentro dos macrófagos porque leva ao aumento do pH dentro do fagolisossomo. Portanto, a urease é uma enzima essencial para a sobrevivência do fungo dentro do hospedeiro e para a penetração da BHE^{127,128}.

Atualmente, a Organização Mundial da Saúde recomenda o tratamento da criptococose com a administração de três medicamentos, utilizados individualmente ou em combinação: anfotericina B, fluconazol e flucitosina. No entanto, apesar das opções terapêuticas disponíveis, as opções farmacológicas são limitadas e observa-se um aumento na resistência do fungo *Cryptococcus spp.* ao fluconazol.¹²⁹ A resistência gera preocupações e incentiva a busca por novos tratamentos.

Assim como apresentado para outros fungos, compostos orgânicos contendo calcogênios também exibem atividade fungicida contra o *C. neoformans*. De Jesus e colaboradores mostraram que compostos orgânicos contendo selênio podem ser promissores agentes fungicidas por meio de testes envolvendo um derivado quinolínico (Figura 45, A). O composto inibiu fatores de virulência envolvidos de *C. neoformans*, como a melanização fúngica inibindo a atividade da lacase, inibiu células dispersas de biofilme, e interferiu na produção de melanina, via inibição da lacase, na formação da cápsula polissacarídica¹³⁰.

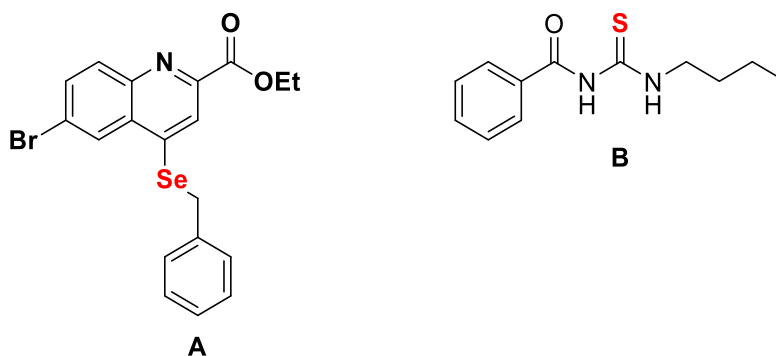


Figura 45: Derivado quinolínico contendo selênio com alta atividade fungicida e benzoiltioureia combinada com anfotericina B.

Mais recentemente, Andriani e colaboradores demonstraram que a associação de uma benzoiltioureia (BTU) (Figura 45, B) com anfotericina B apresenta alta eficiência na inibição fúngica de *C. neoformans* envolvendo a urease, um dos fatores de virulência do fungo. Os autores relataram que o composto BTU-01 sozinho exibiu atividade fungicida e causou uma atividade inibitória dependente da concentração na urease criptocócica. O estudo teórico de ancoragem molecular foi realizado na urease de *Canavalia ensiformis*, e o composto BTU apresentou interações relevantes com a enzima¹³¹.

Ainda de acordo com os autores, a associação de BTU e Anfotericina B (AmB) exibiu atividade fungicida sinérgica contra células planctônicas e sessis de *C. neoformans*. A análise microscópica de *C. neoformans* tratada com a benzoiltioureia, sozinho ou combinado com AmB, revelou uma redução nos tamanhos das células e cápsulas, mudanças na morfologia das

células planctônicas, além da diminuição significativa no número de células dentro do biofilme¹³¹.

As conclusões alcançadas nesse estudo permitem inferir que a atividade fungicida da BTU envolve a inibição da urease de *C. neoformans*, que como dito anteriormente, é um fator de virulência importante da instalação de infecções como a meningite.

Essa não foi a primeira vez que a atividade antiureolítica de benzoiltioureas foi descrita na literatura. Brito e colaboradores investigaram o potencial de inibição de urease de 65 benzoiltioureas. Ensaio *in vitro* contra a urease de *C. ensiformis* revelaram que oito compostos foram mais ativos, com percentual de inibição entre 51 a 74% quando testados a uma concentração de 0,5 mM. Ensaio cinéticos revelaram ainda que as BTUs são capazes de se ligar aos sítios catalíticos e alostéricos da urease, agindo, portanto, como inibidores do tipo misto. Adicionalmente, testes em solo demonstraram que determinadas BTUs são mais ativas que o NBPT na inibição da urease⁴³.

Os resultados do potencial antiureolítico apresentado por Brito, aliados ao histórico positivo da maximização de atividades biológicas de compostos orgânicos contendo calcogênios, especialmente quando enxofre e oxigênio são substituídos por selênio, nos motivaram a propor a síntese de benzoilselenoureas (BSU), análogas às BTU mais ativas na inibição da urease relatadas por Brito. Posteriormente, foram realizados testes *in vitro* das BSUs e BTUs contra o fungo *C. neoformans*.

Além disso, também foram avaliadas a atividade antifúngica dos adutos de Biginelli que foram discutidos no Capítulo I. Uma vez que se provaram eficientes inibidores de urease, essa característica pode influenciar em uma eficiente atividade fungicida sob um fungo que tem a urease como fator de virulência. Assim, foi investigada a ação antifúngica dos adutos de Biginelli derivados de ureia, tiourea, as isotiourea e, por fim, os adutos de Biginelli contendo selênio, visando compreender como a presença de cada calcogênio interfere na atividade biológica dos adutos de Biginelli envolvidos.

Como a síntese e a caracterização dos adutos de Biginelli foram discutidas no Capítulo I, nesse Capítulo serão descritas e discutidas a síntese e caracterização apenas das benzoilselenourea.

3.2 Objetivos

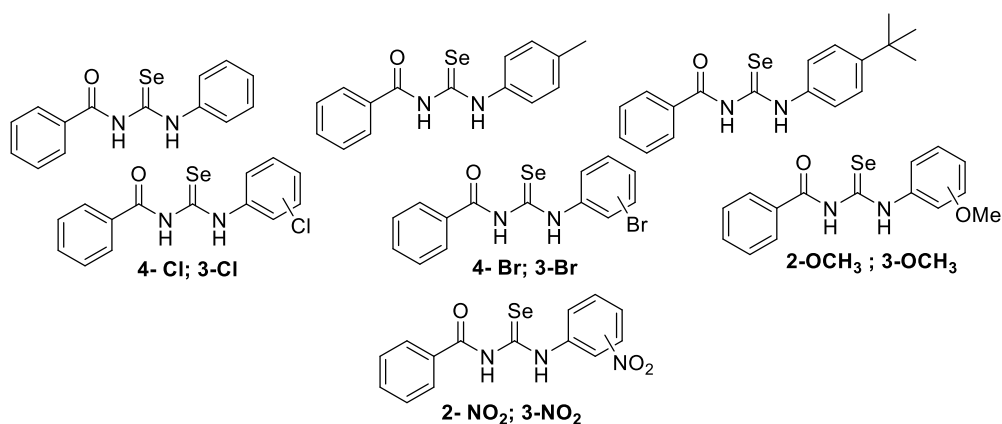
3.2.1 Objetivos gerais

Sintetizar e caracterizar benzoilselenoureias análogas às benzoiltioureias, descritas por Brito, com maior atividade antiureolítica, e investigar a atividade fungicida dessas duas classes de compostos contra o fungo *C. neoformans*, de modo a avaliar como a presença do átomo de selênio influencia na atividade biológica desses derivados. Além disso, avaliar a atividade antifúngica dos adutos de Biginelli descritos no Capítulo I contra *C. neoformans* para avaliar como a ação fungicida pode ser influenciada pelo átomo de calcogênio presente.

3.2.1 Objetivos específicos

- Sintetizar as benzoilselenoureias, análogas às benzoiltioureias, descritas por Brito, mais ativas contra a urease;
- Realizar os testes biológicos para avaliar como os derivados de interesse atuam na inibição das células e da atividade da urease sobre *Cryptococcus neoformans*;
- Realizar os testes biológicos para avaliar como os derivados de interesse atuam na inibição da atividade da urease do extrato protéico de *Cryptococcus neoformans*;
- Inferir como a alteração dos átomos de calcogênio interferem no potencial de inibição da urease fúngica.

Esquema geral das benzoilselenoureias planejadas



3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Síntese e caracterização das benzoilselenoureias

A síntese das benzoilselenoureias (BSU) iniciou-se pela definição do escopo das moléculas que seriam sintetizadas. Para isso, selecionou-se as benzoiltioureias (BTU), descritas por Brito⁴³, que apresentaram maior inibição da urease. A partir dessa análise definiu-se que os derivados de selenoureias a serem sintetizados levariam em consideração, além dos resultados de Brito, a posição dos grupos substituintes do anel aromático, considerando abranger também fatores eletrônicos, dos grupos doadores e retiradores, na influência da inibição da urease fúngica. As estruturas químicas das BSUs e BTUs incluídas no escopo do trabalho estão apresentadas na figura 46.

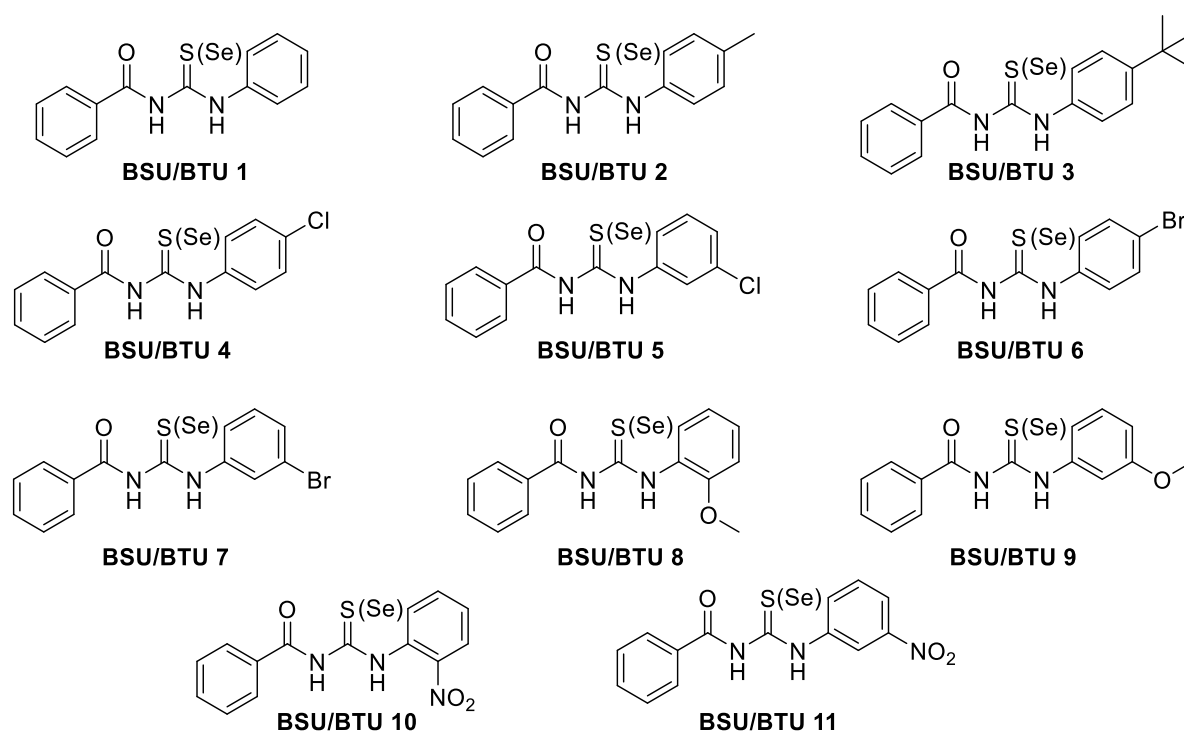


Figura 46: Estruturas químicas das benzoilselenoureias incluídas no escopo do trabalho.

Síntese e caracterização das BSU selecionadas

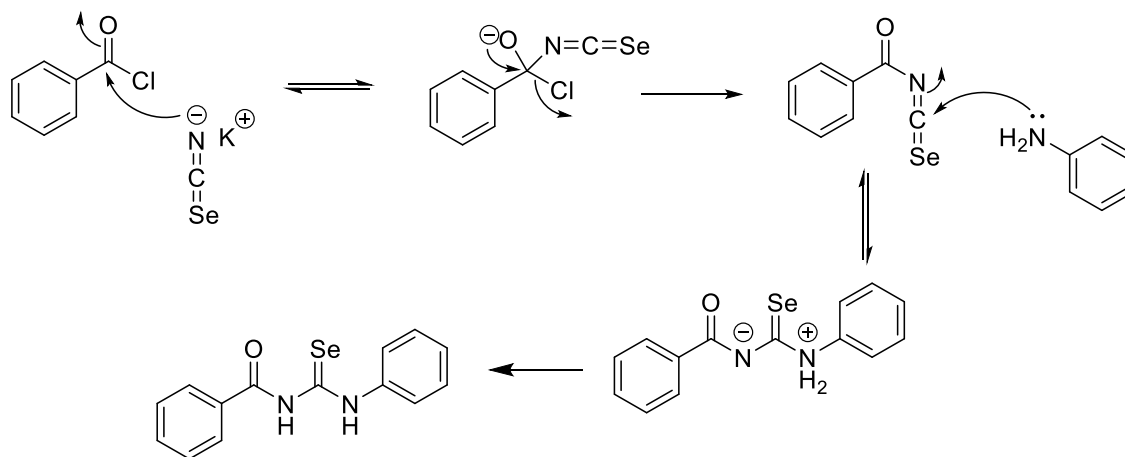
Síntese das BSUs

As benzoilselenoureias (BSU 1-11) foram sintetizadas conforme protocolo descrito anteriormente por Hua e colaboradores¹³² com modificações. Trata-se de uma metodologia *one-*

pot onde, na primeira etapa, cloreto de benzoíla foi adicionado ao selenocianato de potássio em um balão coberto por papel alumínio, sob atmosfera de argônio e sem solvente.

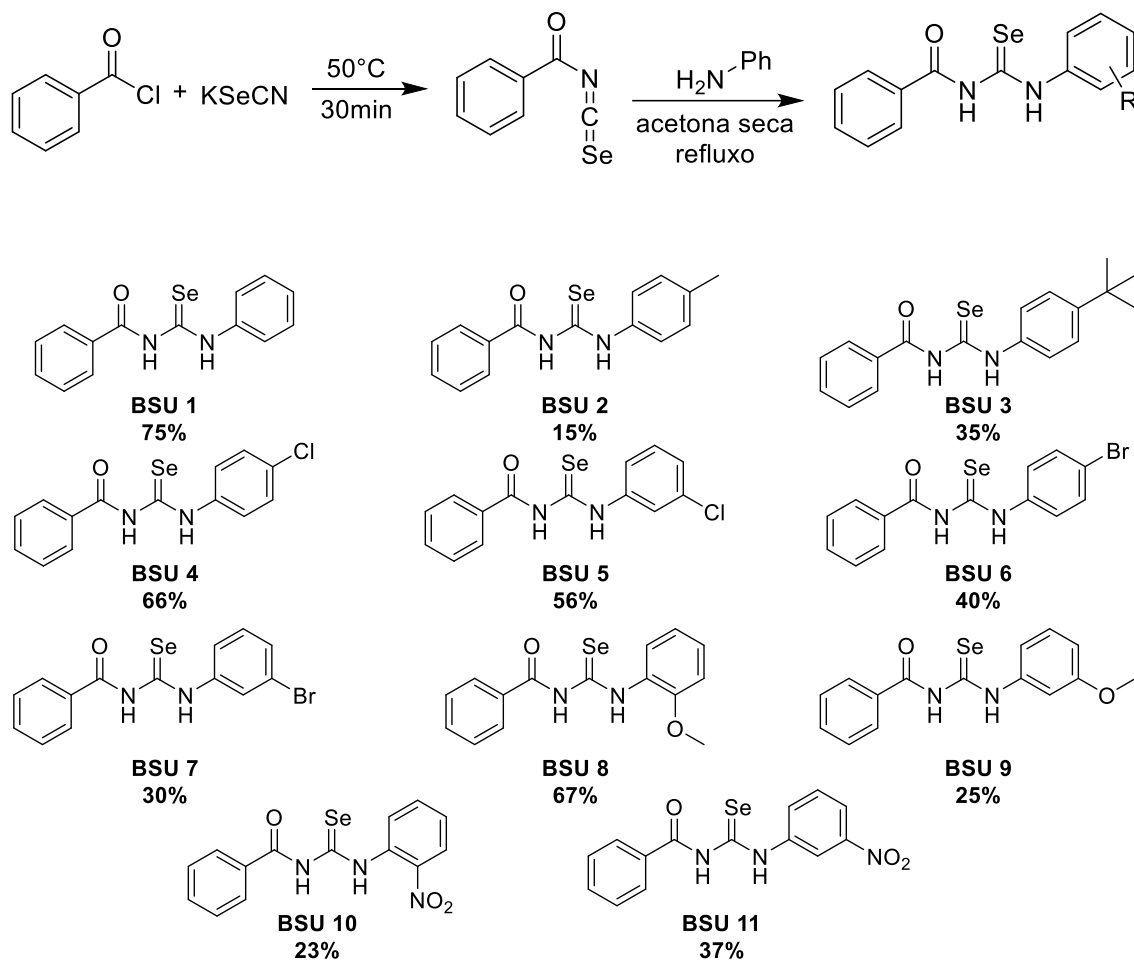
A mistura reacional foi aquecida a 50°C durante 30 minutos e depois arrefecida até a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se a esta mistura uma solução de acetona anidra da amina aromática adequada. A reação ocorreu sob refluxo e agitação magnética durante 5 horas. A mistura reacional foi então concentrada sob pressão reduzida e o produto puro foi purificado através de coluna cromatográfica com diclorometano.

A formação das benzoilselenoureias ocorre por meio do mecanismo ilustrado no esquema 13. Na primeira etapa ocorre uma adição nucleofílica à carbonila que envolve o cloreto de benzoíla e o selenocianato de potássio, que leva a formação de um intermediário tetraédrico. Esse intermediário evolui com a eliminação de cloreto levando a formação de um segundo intermediário, benzoilisoselenocianato. Na segunda etapa, a presença da amina permite uma segunda adição nucleofílica que envolve o segundo intermediário e o grupamento NH_2 da amina. Assim o produto final é formado após uma etapa de prototopismo.



Esquema 13: Mecanismo de síntese das benzoilselenoureias.

Os produtos finais foram obtidos com rendimentos entre de 15-75%. Todos os produtos foram caracterizados por meio de espectroscopia na região do infravermelho e RMN de ^1H e ^{13}C . Os resultados estão em concordância com os dados descritos na literatura. Como exemplo de caracterização será discutido o composto BSU-6. Na Tabela 16 os dados de RMN de ^1H do produto BSU-6 são comparados aos dados descritos por Hua e colaboradores¹³².



Esquema 14: Esquema reacional da síntese das BSUs e os produtos obtidos com seus rendimentos.

Tabela 16: Dados de caracterização do composto BSU-6 comparados com os descritos na literatura

RMN de ^1H , 400 MHz, CDCl_3					RMN de ^1H , 400 MHz, CDCl_3				
Hidrogênio	δ	M	I	J	Hidrogênio	δ	M	I	J
H _a e H _b	7,63- 7,70	m	3	-	H _a	6,80	d	2	8,9
H _b e H _a	7,63- 7,70	m	3	-	H _b	7,36	d	2	8,9
H _c	7,91	d	2	8,0	H _c	7,92	d	2	7,2

H _d	13,03	s	1	-	H _d	9,51	s	1	-
H _e	9,46	s	1	-	H _e	-	-	-	-
H _f e H _g	7,54- 7,59	m	4	-	H _f	7,55- 7,55	m	4	-
H _g e H _f	7,54- 7,59	m	4	-	H _g	7,55- 7,55	m	4	-
RMN ⁷⁷Se, 51,5 MHz, CDCl₃					RMN ⁷⁷Se, 51,5 MHz, CDCl₃*				
400,0					419,7				

*Resultados descritos na literatura (Hua, *et. al.*, 2019); δ = deslocamento químico (ppm), M = multiplicidade, I = integração, J = acoplamento (Hz), s = simpleto, d = duplete, t = tripleto, q = quarteto.

O espectro de RMN de ¹H de BSU-6 (Figura S83, pág. 189) exibe um multiplete com deslocamento em 7,63-7,70 ppm integrado para 3 hidrogênios que foi associado aos hidrogênios a e b; um duplete é observado em 7,90 ppm, este foi atribuído aos hidrogênios aromáticos c. O multiplete com deslocamento em 7,54-7,59 ppm, que tem integração igual a 4, foi atribuído aos hidrogênios aromáticos f e g. Os hidrogênios ligados aos átomos de nitrogênio, H_d e H_e, foram atribuídos aos simpletos com deslocamentos de 13,03 e 9,46 ppm, respectivamente.

No espectro na região do infravermelho (Figura S105, pág. 200) observa-se uma banda características de estiramento NH em 3012 cm⁻¹, em 1657 cm⁻¹ observa-se o estiramento atribuído à carbonila proveniente do cloreto de benzoíla. Ainda é possível observar as bandas características de estiramentos da ligação C=Se 1486 e 706 cm⁻¹. Essas informações permitem confirmar a estrutura proposta para o produto BSU 6. Os demais compostos (BSU 1-5 e BSU 7-11) foram caracterizados de forma análoga.

Uma vez que as sínteses das BSUs foram bem sucedidas e os onze compostos definidos no escopo inicial foram isolados puros, os testes de inibição de urease fúngica foram realizados. Vale ressaltar aqui que o teste de inibição de urease *in vitro* com a urease de *Canavalia ensiformis*, que foi feito para as classes de moléculas exploradas nos Capítulos I e II, não foi feito para as BSUs devido à baixa solubilidade dessas moléculas em etanol, o solvente utilizado nos testes *in vitro*. Outro solvente orgânico, como DMSO, não pode ser usado nos ensaios porque o próprio solvente pode interferir na formação do indofenol, produto que dá a cor azul aos ensaios, levando a erros experimentais na quantificação da ureia.

A inibição da urease de *Cryptococcus neoformans* foi avaliada nas BSUs e das BTUs análogas, permitindo a comparação da magnitude da inibição entre moléculas contendo átomos de enxofre e de selênio.

3.3.2 Sessão A: Testes biológicos das BSUs e BTUs envolvendo o fungo ureolítico *C. neoformans*

*3.3.2.1 Atividade antifúngica de BSU e BTU em *Cryptococcus neoformans**

A cepa padrão H99 de *Cryptococcus neoformans* foi utilizada na triagem de atividade antifúngica dos compostos BSUs e BTUs pelo método de microdiluição em caldo como descrito no documento M27-A4¹³³ com adaptações no meio de cultura. Foram utilizados 3 meios de cultura: RPMI 1640 tamponado com 0,165 MOPS (=RMPI), caldo Christensen contendo Peptona (PEP+) e caldo Christensen sem peptona (PEP-), para a determinação visual da concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% e 90% do crescimento fúngico (IC₅₀ e IC₉₀, respectivamente), e da concentração inibitória mínima da atividade da urease (IC_{URE}) definida como a menor concentração capaz de manter a coloração semelhante ao controle negativo (apenas meio, cor laranja rosado) nos meios PEP+ e PEP-.

Após as determinações dos IC₅₀ e IC₉₀, avaliou-se a concentração fungicida mínima (CFM) pelo subcultivo de todas as amostras em que houve inibição de crescimento fúngico a 35 °C por 48 h e, então, definida como a menor concentração do composto capaz reduzir ≥ 99 % da viabilidade do inóculo fúngico inicial¹³⁴.

*3.3.2.2 Inibição da atividade da urease do extrato protéico de *Cryptococcus neoformans**

As leveduras de *Cryptococcus neoformans* H99 foram cultivadas em 100 mL de caldo de Christensen por 72 h a 35 °C, com agitação a 200 rpm, para obtenção de urease conforme descrito previamente¹³⁵.

As leveduras foram rompidas utilizando um tampão de lise (40 mM Tris-HCl, 20 mM ditiotreitol, 4% Triton X-100, 1 mM ácido etilenodiamino tetra-acético, 2 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil, coquetel de inibidores de protease) e um sonificador ultrassônico. Após centrifugação, a fração solúvel foi dialisada em uma membrana de diálise submersa em tampão de fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0; a amostra foi liofilizada e armazenada a -20°C. Antes do ensaio, a amostra foi ressuspensa em 1 mL de tampão de fosfato (10 mM, pH 7,0) e a proteína total foi quantificada pelo método de Bradford¹³⁶.

A atividade da urease foi determinada pelo método do indofenol¹³⁷. Em uma microplaca de 96 poços, 10 µL de ureia 100 mM foi adicionada a 45 µL de proteína total e 45 µL de BSU

(concentrações de 0,06-1000 ng.mL⁻¹) em tampão de fosfato. A reação foi mantida por 10 min sob agitação a 600 rpm, à temperatura ambiente. Em seguida, 45 µL da solução A (1% fenol; 0,005% nitroprussiato de sódio) e 70 µL da solução B (0,5% hidróxido de sódio; 0,1% hipoclorito de sódio) foram imediatamente adicionados aos poços no escuro e incubados por 5 min a 50 °C sob agitação a 600 rpm. A atividade da urease foi quantificada medindo a absorbância a 670 nm. A concentração inibitória capaz de inibir 50% da atividade da urease (ureIC₅₀) foi determinada por cálculo de regressão não linear.

Os resultados obtidos para a mínima concentração inibitória para inibir 50% do crescimento do fungo nos meios de cultura de ureia e RPMI (MIC), a mínima concentração inibitória para inibir 100% da atividade da urease no meio de ureia (MIC ure), a mínima concentração fungicida determinada no meio RPMI (MFC) e a concentração inibitória para inibir 50% da atividade da urease no extrato protéico do fungo (ureIC₅₀), para as BSUs e BTUs estão na Tabela 17 (pág. 114).

Tabela 17: Atividade antifúngica de Benzoltioureias (BTU) e Benzolselenioureias (BSU) contra o crescimento de *Cryptococcus neoformans* H99 e ação inibitória sobre a atividade da urease fúngica.

BSU	R	Meio	MIC (mg/L)	MICure (mg/L)	MFC (mg/L)	ureIC ₅₀ (nM / ng/mL)	BTU	MIC (mg/L)	MICure (mg/L)	MFC (mg/L)
1	H	RPMI	2	ND	2	4,88 / 1,48	1	>128	ND	>128
		ureia	0,06	0,06	0,12			32	32	128
2	4-CH ₃	RPMI	16	ND	16	1,07 / 0,34	2	>128	ND	>128
		ureia	0,5	0,5	1			32	≤0.25	>128
3	4- <i>tert</i> -Butil	RPMI	>16	ND	>16	0,95 / 0,34	3	8	ND	>128
		ureia	16	16	>16			1	0.5	128
4	4-Cl	RPMI	16	ND	16	3,02 / 1,02	4	>128	ND	>128
		ureia	0,5	0,25	0,5			1	≤0.25	>128
5	3-Cl	RPMI	8	ND	16	7,59 / 2,56	5	>128	ND	>128
		ureia	0,25	0,12	0,25			4	≤0.25	>128
6	4-Br	RPMI	>16	ND	>16	4,04 / 1,54	6	>128	ND	>128
		ureia	8	8	16			32	≤0.25	128
7	3-Br	RPMI	4	ND	4	2,31 / 0,88	7	>128	ND	>128
		ureia	0,12	0,06	0,25			32	2	64
8	2-OCH ₃	RPMI	8	ND	8	2,33 / 0,78	8	>128	ND	>128
		ureia	0,5	0,5	0,5			64	32	>128
9	3-OCH ₃	RPMI	1	ND	1	13,95 / 4,65	9	32	ND	>128
		ureia	0,12	0,12	0,5			4	4	32
10	2-NO ₂	RPMI	8	ND	16	8,68 / 3,02	10	>128	ND	>128
		ureia	1	1	2			>128	>128	>128
11	3-NO ₂	RPMI	16	ND	>16	7,91 / 2,76	11	>128	ND	>128
		ureia	1	1	1			>128	>128	>128

Mínima concentração inibitória (MIC) para inibir 50% do crescimento do fungo nos meios de cultura de ureia e RPMI. Mínima concentração inibitória (MICure) para inibir 100% da atividade da urease no meio de ureia. Mínima concentração fungicida (MFC) determinada no meio RPMI. Concentração inibitória (ureIC₅₀) para inibir 50% da atividade da urease no extrato proteico do fungo.

Os resultados deste estudo demonstram que as BSUs possuem alto efeito inibitório contra o crescimento de *C. neoformans* com valores de MIC variando de 1 a 16 mg.L⁻¹ em meio padrão RPMI, enquanto que as BTUs apresentaram valores de MIC, no mesmo meio de cultura, maiores em todos os casos. Além disso, os compostos de selênio, com exceção dos derivados BSU 3 e BSU 6 que não inibiram o fungo na maior concentração testada, foram considerados fungicidas (MFC, 0,12-16 mg.L⁻¹).

A inibição da atividade da urease das leveduras foi determinada usando meio de cultura de ureia. Novamente, observaram-se menores valores de MIC_{URE} (0,06 - 1 mg.L⁻¹) para as BSUs, o que revela a maior potência na inibição da atividade da urease para esses compostos quando comparados aos seus análogos de enxofre, que não apresentaram inibição da urease fúngica (Tabela 17, pág. 114). Novamente, os derivados BSU 3 e BSU 6 (MIC_{URE} = 16 e 8 mg.L⁻¹, respectivamente) que não apresentaram alta inibição da urease.

Em contrapartida ao que se observou anteriormente, em relação às BTUs, apenas BTU 3 e BTU9 exibiram atividade antifúngica contra *C. neoformans* a 8 e 32 µg.mL⁻¹, respectivamente, usando o meio padrão RPMI. A atividade antifúngica demonstrada pelo derivado BTU 3 vai de encontro ao que foi observado para as BSUs (o análogo BSU 3 não apresentou atividade). Esse resultado sugere que, para esse esqueleto orgânico específico a presença do selênio não foi importante para a atividade antifúngica, pelo contrário, a presença do selênio diminuiu a atividade antifúngica.

Ainda sobre as BTUs, os derivados BTU 3, 4, 5 e 9 apresentaram os menores valores de MIC_{URE} (1-4 mg.L⁻¹). No entanto, em ambos os meios de cultura, os valores de MIC das BSUs foram significativamente menores, confirmando que a presença do selênio nesses casos aumenta a atividade inibitória da urease fúngica.

Considerando o alto potencial das BSUs para a inibição fúngica, foi realizado um rastreamento da inibição da atividade da urease usando um extrato bruto de proteína fúngica. Foram obtidos valores na grandeza nanomolar de ureIC₅₀ (Tabela 17, pág. 114) para todas as BSUs na inibição da urease de *C. neoformans* (0,95 – 13,95 nM).

De modo geral, resultados mostram que as BSUs são mais potentes na inibição da urease e na atividade antifúngica em comparação com seus análogos BTUs. A atividade antiureolítica de BTU usando urease de extrato de proteína de *C. neoformans* foi explorada anteriormente, Andriani descreveu que o valor mais alto de ureIC₅₀ foi de 53,3

mg.L⁻¹, relatado para uma benzoiltiourea derivada de anima alifática¹³¹. Em comparação com esse trabalho as BSUs também apresentaram ser mais ativas contra a urease fúngica.

É possível assim afirmar que moléculas contendo selênio exibem excelente potencial de inibição da atividade da urease tanto em células fúngicas quanto diretamente em extratos de proteína total, sugerindo que a presença do átomo de selênio é importante para a inibição da enzima.

Ainda que seja possível sugerir que o selênio é um átomo com caráter de base macia de Lewis que poderia se coordenar aos íons de Ni²⁺ do centro ativo da urease de forma mais eficiente do que o enxofre, o mecanismo de inibição para esses compostos ainda não é elucidado, estudos teóricos ainda devem ser feitos para a maior compreensão sobre como o selênio atua no processo de inibição da urease fúngica.

3.3.3 Sessão B: Testes biológicos dos adutos de Biginelli envolvendo o fungo ureolítico *C. neoformans*

3.3.3.1 Atividade antifúngica de Adutos de Biginelli em *Cryptococcus neoformans*

Os testes de atividade antifúngica dos adutos de Biginelli foram realizados seguindo os mesmos padrões experimentais descritos na sessão anterior. Assim, serão mostrados e discutidos nessa sessão os resultados obtidos para as atividades antifúngica e antiureolítica dos adutos de Biginelli, os quais foram discutidos no Capítulo I. As estruturas químicas desses compostos são ilustradas na figura 47 e os resultados obtidos na tabela 18 (pág. 117).

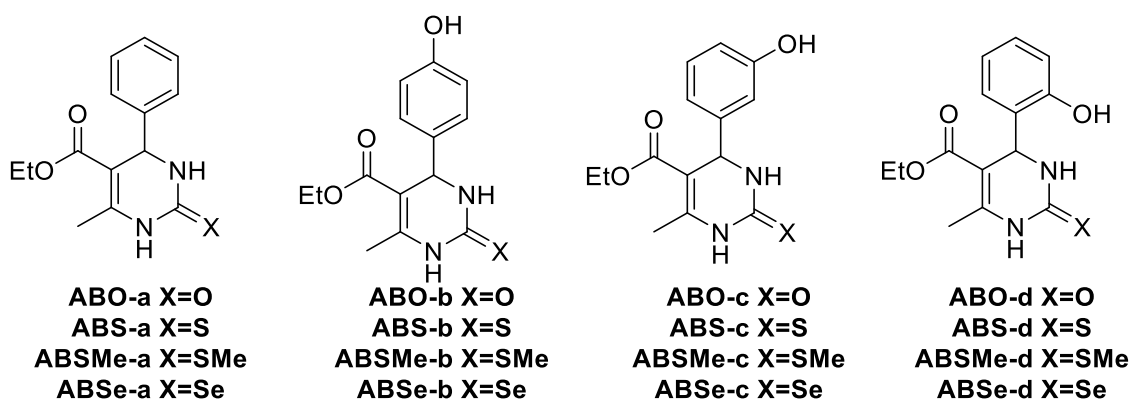


Figura 47: Estruturas químicas dos adutos de Biginelli avaliados quanto à inibição fúngica.

Tabela 18: Atividade antifúngica de Adutos de Biginelli contra o crescimento de *Cryptococcus neoformans* H99 e ação inibitória sobre a atividade da urease fúngica

AB	Meio	MIC (mg.L ⁻¹)	MICure (mg.L ⁻¹)	MFC (mg.L ⁻¹)	AB	MIC (mg.L ⁻¹)	MICure (mg.L ⁻¹)	MFC (mg.L ⁻¹)	ureIC ₅₀ (ng.mL ⁻¹)
ABO-a	RPMI	>128	>128	>128	ABSMe-a	>128	>128	>128	-
	ureia	>128	>128	>128		>128	>128	>128	
ABO-b	RPMI	>128	>128	>128	ABSMe-b	>128	>128	>128	-
	ureia	>128	>128	>128		>128	>128	>128	
ABO-c	RPMI	>128	>128	>128	ABSMe-c	>128	>128	>128	-
	ureia	>128	>128	>128		>128	>128	>128	
ABO-d	RPMI	>128	>128	>128	ABSMe-d	>128	>128	>128	-
	ureia	>128	>128	>128		>128	>128	>128	
ABS-a	RPMI	>128	>128	>128	ABSe-a	4	ND	4	0,5993
	ureia	>128	>128	>128		0,25	0,25	0,25	
ABS-b	RPMI	>128	>128	>128	ABSe-b	8	ND	16	5,020
	ureia	>128	>128	>128		1	1	1	
ABS-c	RPMI	>128	>128	>128	ABSe-c	2	ND	16	31,03
	ureia	>128	>128	>128		0,25	1	1	
ABS-d	RPMI	>128	>128	>128	ABSe-d	4	ND	4	6,8993
	ureia	>128	>128	>128		0,25	0,25	0,25	

Mínima concentração inibitória (MIC) para inibir 50% do crescimento do fungo nos meios de cultura de ureia e RPMI.

Mínima concentração inibitória (MICure) para inibir 100% da atividade da urease no meio de ureia.

Mínima concentração fungicida (MFC) determinada no meio RPMI.

Concentração inibitória (ureIC₅₀) para inibir 50% da atividade da urease no extrato proteico do fungo.

Os resultados mostraram que os adutos de Biginelli derivados da ureia (ABO-a-d), da tioureia (ABS-a-d) e os adutos de Biginelli metilado (isotiuoreias, ABSMe-a-d) (Figura 47, pág. 116) não apresentaram atividade biológica em nenhum dos testes realizados. Estes compostos não apresentaram atividade antifúngica contra o crescimento de *Cryptococcus neoformans* H99 e nem contra a ação da atividade da urease fúngica.

Em contrapartida, os adutos de Biginelli contendo selênio (ABSe-a-d; Fig. 47, pág. 116) exibiram excelentes resultados tanto na inibição do crescimento do fungo quanto na inibição da urease fúngica. A mínima concentração inibitória (MIC) para inibir 50% do crescimento do fungo nos meios de cultura de ureia e RPMI variou entre 0,25 e 8 mg.L⁻¹, enquanto que mínima concentração inibitória (MIC_{URE}) para inibir 100% da atividade da urease no meio de ureia variou entre 0,25 e 1 mg.L⁻¹ para esses compostos.

Adicionalmente, a mínima concentração fungicida (MFC) determinada para esses adutos também foram muito baixas, variando entre 0,25 a 16 mg.L⁻¹, o que caracteriza essas moléculas como potentes fungicidas.

Considerando o alto potencial dos adutos de Biginelli contendo selênio na inibição fúngica, foi realizado um rastreamento da inibição da atividade da urease usando um extrato bruto de proteína fúngica. Os valores de ureIC₅₀ variaram entre 0,5993 a 31,03 ng.mL⁻¹ (Tabela 18, pág. 117). Esses resultados confirmam que os adutos de Biginelli de selênio inibem a urease fúngica, o que pode ser o motivo pelo qual esses compostos também inibem o crescimento do fungo.

O aduto ABSe-a é o produto de toda a série que melhor inibe a urease fúngica. Os demais derivados, que possuem hidroxila no anel aromático (ABSe-b-d), apesar de apresentarem alta inibição da urease fúngica, exibiram os valores maiores de ureIC₅₀. Essa observação sugere que a presença da hidroxila interfere negativamente na interação inibidor-enzima, principalmente quando a substituição está na posição *meta* do anel aromático, ou seja, o seleno-monastrol é o derivado menos ativo na inibição da enzima.

O fato de que, no caso da inibição da urease fúngica, o seleno-monastrol foi o derivado menos ativo contrasta com os resultados discutidos no Capítulo I, onde, contra a urease *Canavalia ensiformis* este composto foi o mais ativo da série. Esta observação confirma que mesmo se tratando da mesma enzima, a fonte de urease interfere na ação de inibidores. Isso pode ser explicado pelo que se conhece sobre as ureases, enzimas de diferentes fontes apresentam um sítio ativo muito similar, no entanto os sítios alostéricos

apresentam diferenças consideráveis e isso interfere de modo direto no mecanismo de ação de inibidores¹².

Adicionalmente, o fato de que os demais adutos de Biginelli não apresentaram nenhuma atividade sob o crescimento do fungo e na atividade da urease fúngica também contrasta com os resultados discutidos no Capítulo I, onde mesmo menos ativos esses derivados apresentaram alguma atividade antiureolítica contra a urease de *C. ensiformis*, sugerindo mais uma vez que o mecanismo de ação dos adutos de Biginelli na inibição da urease fúngica deve ser diferente do mecanismo observado na inibição da urease vegetal.

O mecanismo de inibição dos adutos de Biginelli contendo selênio contra a urease de *C. ensiformis*, no entanto, necessita de experimentos mais aprofundados e modelagens moleculares para ser devidamente elucidado.

3.4 Conclusões

Este trabalho permitiu o isolamento de benzoilselenoureias (BSUs) com rendimentos que variaram de moderados a bons, a partir de uma síntese racionalizada com base nos resultados de inibição de urease previamente obtidos para as benzoiltioureias (BTUs).

Os testes *in vitro* de inibição da urease de *Cryptococcus neoformans* revelaram que as BSUs são potentes agentes antifúngicos e inibidores eficazes da urease fúngica, apresentando valores de ureIC₅₀ entre 0,95 – 13,95 nM.

A maior eficácia das BSUs em comparação com as BTUs na inibição de urease destacou a importância do selênio para a atividade biológica, com exceção do derivado BTU 3, que exibiu uma atividade antifúngica e antiureolítica mais pronunciada que seu análogo de selênio, o BSU 3.

Embora o mecanismo de inibição precise de experimentos adicionais para ser completamente elucidado, os resultados sugerem que a presença do selênio pode estar relacionada ao aumento da atividade biológica.

Nos testes de atividade biológica envolvendo os adutos de Biginelli, observou-se que, tanto na inibição do crescimento fúngico quanto na inibição da urease fúngica, apenas os adutos contendo selênio mostraram resultados promissores, sublinhando a relevância do selênio para a atividade biológica dessa classe de compostos.

Em relação aos adutos de Biginelli, a atividade antiureolítica foi menor na presença de uma hidroxila no anel aromático, com o aduto menos ativo sendo o selenomonastrol, que possui o grupo OH na posição meta. A menor atividade do selenomonastrol, juntamente com a ausência de inibição da urease fúngica pelos demais adutos (derivados de ureia, tioureia e isotioureia), contrasta com os resultados observados na inibição da urease vegetal, sugerindo que os mecanismos de inibição podem diferir entre enzimas de diferentes origens.

Por fim, este estudo descreveu pela primeira vez a atividade antiureolítica das benzoilselenoureias e demonstrou a eficácia dos adutos de Biginelli contendo selênio na inibição da urease fúngica. Os compostos orgânicos de selênio demonstraram ser potentes inibidores da urease fúngica e eficazes na inibição do crescimento de fungos,

posicionando-os como promissores candidatos para o tratamento de infecções por *Cryptococcus neoformans*.

4. Conclusões gerais

Este trabalho possibilitou o desenvolvimento de novos inibidores de urease e a avaliação do impacto da presença do átomo de selênio e o grupamento ácido borônico $B(OH)_2$ no potencial antiureolítico de compostos orgânicos. Conclui-se que a presença de selênio e do grupo $B(OH)_2$, de forma individualizada, nos adutos de Biginelli foram importantes para otimizar a inibição da enzima em ensaios *in vitro*.

No primeiro capítulo, foi racionalizada a síntese de 16 adutos de Biginelli, abrangendo derivados de ureia, de tiourea, isotioureas e adutos de Biginelli contendo selênio, utilizando diferentes metodologias sintéticas. Esses compostos apresentaram rendimentos que variaram de moderados a bons. Em termos de atividade biológica, observou-se um aumento significativo da atividade antiureolítica nos adutos contendo selênio.

O análogo estrutural do monastrol (ABSe-c) foi o mais ativo, inibindo 90% da enzima a uma concentração de 100 μM e apresentando IC_{50} igual a $30,11 \pm 5,26 \mu M$. Ensaios enzimáticos cinéticos indicaram que o ABSe-c atua como inibidor competitivo, competindo diretamente com a ureia pelo sítio ativo da enzima.

No segundo capítulo, observou-se que os adutos de Biginelli derivados dos ácidos formilfenilborônicos, que contém o grupamento $B(OH)_2$, também demonstraram maior inibição da urease quando comparados aos adutos derivados de hidroxibenzaldeídos e benzaldeído. O composto mais ativo dessa série, o análogo estrutural do monastrol (AcB-e), destacou-se como o inibidor mais potente, apresentando um IC_{50} de $132 \pm 12 \mu M$.

A investigação do mecanismo de inibição do composto AcB-e indicou que ele atua por um mecanismo misto, interagindo tanto com a enzima livre, seja no centro ativo ou no centro alostérico, quanto com o complexo urease-ureia. Testes biofísicos mostraram que o grupamento $B(OH)_2$ se complexa com os íons de níquel presentes no sítio ativo da enzima por meio dos átomos de oxigênio das hidroxilas.

No último capítulo foi descrita a síntese *one-pot* de benzoilselenoureas (BSU) que apresentaram rendimentos que variaram de moderados a bons (15-75%). Ensaios *in vitro* de inibição da urease fúngica de *Cryptococcus neoformans* revelaram que as BSUs são potentes inibidores da urease fúngica e agentes antifúngicos mais eficazes que os análogos de enxofre (benzoiltioureas – BTUs), apresentando valores de $ureIC_{50}$ entre 0,95 – 13,95 nM. Além disso, para adutos de Biginelli, observou-se que, tanto na inibição

do crescimento fúngico quanto na inibição da urease fúngica, apenas os adutos contendo selênio mostraram resultados promissores.

Embora estudos adicionais sejam necessários para elucidar o mecanismo de inibição, os resultados sugerem que o átomo de selênio desempenha um papel crucial na elevada atividade biológica das BSUs e dos adutos de Biginelli.

De modo geral, o presente estudo permitiu o desenvolvimento de novos inibidores de ureases por meio de diversas metodologias sintéticas, a caracterização de três classes de compostos e a identificação do potencial de inibição de urease (vegetal e fúngica) de adutos de Biginelli e benzoilselenoureias. Esse trabalho também reforça a literatura ao demonstrar que a presença do átomo de selênio potencializa a atividade biológica de determinados compostos orgânicos.

5. Experimental

5.1 Técnicas Espectroscópicas e Espectrométricas

5.1.1 Espectroscopia no Infravermelho

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

5.1.2 Faixas de fusão

Os compostos sólidos foram caracterizados também pelos seus pontos de fusão medidos em equipamento Gehaka PF1500 Farma. 4.1.5.

5.1.3 Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HR-MS)

Os compostos caracterizados por espectrometria de massas de alta resolução (HR-MS) foram analisados em espectrômetro IT-TOF Shimadzu utilizando ionização por eletrospray (ESI).

5.1.4 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C e ^{77}Se espectrômetro Bruker Avance-III 400 com sonda DUL ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) de 5mm ou no espectrômetro Bruker Avance Neo 600 com sonda BBO 600S3 ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) de 5mm, equipada com bobina para emprego de pulsos de gradiente de campo, do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os deslocamentos químicos dos sinais foram calibrados a partir do sinal do solvente deuterado apropriado. A multiplicidade dos sinais nos espectros de RMN de ^1H foi indicada conforme a seguinte convenção: s (simpleto), d (duplete), t (triplete) q (quarteto), p (quinteto) – e suas combinações – m (multiplete), sl (sinal largo). Todas as constantes de acoplamento escalar são dadas em módulo, $|^xJ|$.

5.1.5 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 $\text{M}\Omega\text{ cm}$) produzida pelo sistema Master MS2000 Gehaka.

5.2 Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes foram utilizados como adquiridos das fontes comerciais, com exceção dos solventes acetato de etila e hexano que foram destilados antes do uso. A enzima urease utilizada nos testes *in vitro* é do tipo III proveniente da espécie *Canavalia ensiformis* (jack bean urease).

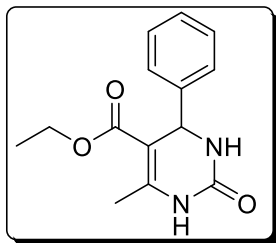
5.3 Análise estatística dos resultados de atividade anti-ureolítica in-vitro

Os dados obtidos nos testes de inibição enzimática foram avaliados quanto à normalidade e homocedasticidade por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Cochran, respectivamente. Para identificar e remover valores atípicos (outliers), foi utilizado o teste de Grubbs. As médias de inibição na concentração definida dos inibidores foram comparadas por ANOVA de uma via (One-way ANOVA), seguida do pós-teste de Scott-Knott. A determinação dos valores de CI50 foi realizada pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários, com verificação da significância dos coeficientes pelo teste F. Todas as análises estatísticas foram realizadas com intervalo de confiança de 95% utilizando os softwares Microsoft Office Excel (versão 2019), GraphPad Prism (versão 9.5.0) e Sisvar (versão 5.8, desenvolvido pelo Prof. Dr. Daniel Furtado Ferreira da Universidade Federal de Lavras).

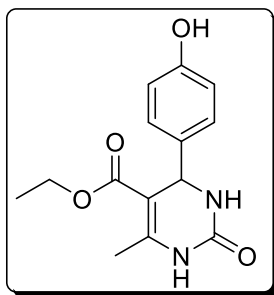
5.4 Síntese e caracterização

5.4.1 Capítulo I – Adutos de Biginelli derivados da ureia e tioureia (ABO-a-c / ABS-a-c)

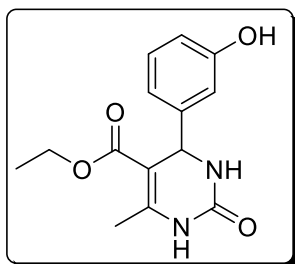
Os adutos de Biginelli derivados da ureia foram obtidos por meio de uma reação de condensação tricomponente. Em um balão de fundo redondo foram adicionados acetoacetato de etila (1,5 mmol), o aldeído apropriado (1,0 mmol), a ureia (1,05 mmol), o ácido *para*-toluenossulfônico em quantidade catalítica (0,3 mmol, 20 mol%) e 5 mL de etanol. A reação ocorreu sob refluxo e agitação magnética por 8 horas. Os produtos foram isolados através de precipitação com adição lenta de água gelada. Ao final da precipitação o produto foi filtrado à pressão reduzida e lavado com água.



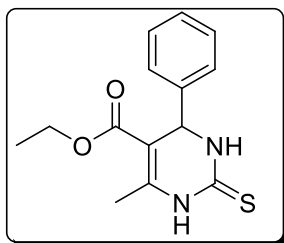
Etil 6-metil-2-oxo-4-fenil-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (ABO-a): Sólido branco, 84%, P.F: 205-207°C (Literatura: 205,3-207,3°C³⁷). IV (ATR, cm⁻¹) $\bar{\nu}$: 3237, 3111, 2979, 1722, 1698, 1645, 1457, 1420, 1313, 1290, 1218, 1086, 1028, 879, 756, 697, 661, 607, 566. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1,08 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz), 2,25 (s, 3H), 3,97 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz), 5,15 (d, 1H, *J* = 3,2 Hz), 7,21-7,33 (m, 5H), 7,73 (s, 1H), 9,19 (s, 1H) ppm. RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆): 14,1 (CH₃), 17,8 (CH₃), 54,0 (CH), 59,2 (CH₂), 99,3 (C), 126,2 (CH), 127,3 (CH), 128,4 (CH), 144,8 (C), 148,3 (C), 152,2 (C=O), 165,3 (C=O) ppm.



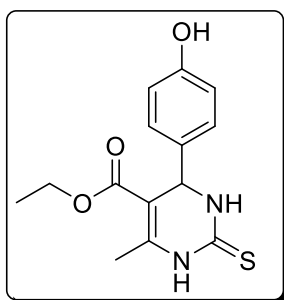
Etil 4-(4-hidroxifenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (ABO-b): Sólido branco, 67%, P.F: 138-140°C (Literatura: 231,9-234,8 °C³⁷). IV (ATR, cm⁻¹) $\bar{\nu}$: 3502, 3269, 3111, 1678, 1640, 1600, 1518, 1461, 1295, 1228, 1171, 1088, 824, 763, 751, 650, 633, 588. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1,09 (t, 3H, *J* = 8 Hz), 2,22 (s, 3H), 3,97 (q, 2H, *J* = 8 Hz), 5,03 (s, 1H), 6,66 (d, 2H, *J* = 8 Hz), 7,02 (d, 2H, *J* = 8 Hz), 7,60 (s, 1H), 9,09 (s, 1H), 9,31 (s, 1H) ppm. RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆): 14,1 (CH₃), 17,7 (CH₃), 53,4 (CH), 59,1 (CH₂), 99,7 (C), 114,9 (CH), 127,4 (CH), 135,4 (C), 147,7 (C), 152,1 (C=O), 156,5 (C-OH), 165,4 (C=O) ppm.



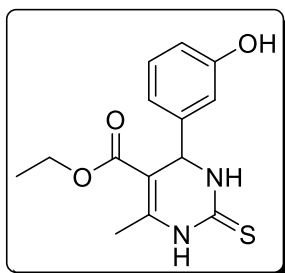
Etil 4-(3-hidroxifenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (ABO-c): Sólido branco, 36%, P.F: 186-189°C (Literatura: 183,7-185,0 °C³⁷). IV (ATR, cm⁻¹) $\bar{\nu}$: 3514, 3344, 3239, 3118, 2980, 1723, 1675, 1634, 1600, 1452, 1315, 1295, 1218, 1088, 1026, 872, 775, 703, 615, 581. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1,11 (t, 3H, *J* = 8 Hz), 2,23 (s, 3H), 3,99 (q, 2H, *J* = 8 Hz), 5,06 (s, 1H), 6,61-6,68 (m, 3H), 7,07-7,11 (t, 1H, *J* = 8 Hz), 7,68 (s, 1H), 9,15 (s, 1H), 9,36 (s, 1H) ppm. RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆): 14,1 (CH₃), 17,8 (CH₃), 53,8 (CH), 59,2 (CH₂), 99,4 (C), 113,1 (CH), 114,2 (CH), 116,9 (CH), 129,3 (CH), 146,3 (C), 148,1 (C), 152,3 (C=O), 157,4 (C-OH), 165,4 (C=O) ppm.



Etil 6-metil-4-fenil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (ABS-a): Sólido branco, 78%, P.F: 207-210°C (Literatura: 205,5-207,3°C³⁷). IV (ATR, cm⁻¹) $\bar{\nu}$: 3325, 3170, 3104, 2981, 1750, 1667, 1573, 1464, 1371, 1327, 1283, 1193, 1175, 1117, 1028, 1002, 822, 758, 692, 651, 597, 569. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1,09 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz), 2,28 (s, 3H), 4,00 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz), 5,15 (s, 1H), 7,21 (d, 2H, *J* = 7,0 Hz), 7,26 (t, 1H, *J* = 7,0 Hz), 7,34 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz), 9,64 (s, 1H), 10,31 (s, 1H) ppm. RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆): 14,0 (CH₃), 17,2 (CH₃), 54,0 (CH), 59,2 (CH₂), 100,7 (C), 126,4 (CH), 127,7 (CH), 128,6 (CH), 143,5 (C), 165,1 (C), 174,2 (C=O), 183,8 (C=S) ppm.



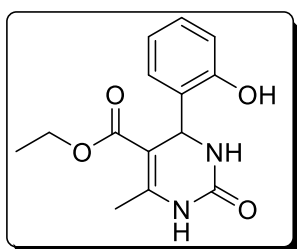
Etil 4-(4-hidroxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (ABS-b): Sólido branco, 30%, P.F: 204-207°C (Literatura: 202,7-205,7 °C³⁷). IV (ATR, cm⁻¹) $\bar{\nu}$: 3488, 3247, 3179, 3015, 1742, 1683, 1600, 1578, 1482, 1468, 1369, 1313, 1241, 1202, 1191, 1125, 1098, 1089, 863, 805, 771, 738, 642, 586, 579. RMN de ¹H (400 MHz, acetona-*d*₆): 1,16 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz), 2,42 (s, 3H), 4,04-4,10 (m, 2H), 5,32 (s, 1H), 6,78 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz), 7,15 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz), 8,41 (s, 1H), 8,61 (s, 1H), 9,16 (s, 1H) ppm. RMN de ¹³C (100 MHz, acetona-*d*₆): 14,4 (CH₃), 17,7 (CH₃), 55,6 (CH), 60,4 (CH₂), 103,2 (C), 116,0 (CH), 128,8 (CH), 135,7 (C), 144,6 (C-OH), 157,9 (C), 166,1 (C=O), 176,0 (C=S) ppm.



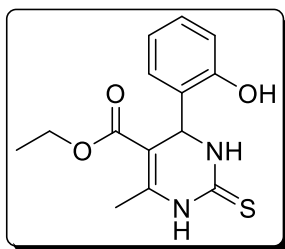
Etil 4-(3-hidroxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (ABS-c): Sólido branco, 45%, P.F: 183-185°C (Literatura: 183,4-185,1°C³⁷). IV (ATR, cm^{-1}) $\bar{\nu}$: 3305, 3181, 3117, 2985, 1664, 1590, 1574, 1474, 1446, 1370, 1339, 1281, 1190, 1114, 1024, 987, 958, 788, 763, 753, 742, 701, 616, 586, 567. RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6): 1,18 (t, 3H, $J = 8,0$ Hz), 2,43 (s, 3H), 4,06-4,13 (m, 2H), 5,35 (s, 1H), 6,75-6,83 (m, 3H), 7,15 (t, 3H, $J = 8,0$ Hz), 8,39 (s, 1H), 8,62 (s, 1H), 9,17 (s, 1H) ppm. RMN de ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6): 14,4 (CH_3), 17,8 (CH_3), 55,9 (CH), 60,5 (CH_2), 102,8 (C), 114,3 (CH), 115,5 (CH), 118,6 (CH), 130,4 (CH), 145,0 (C), 146,1 (C-OH), 158,4 (C), 166,1 (C=O), 176,4 (C=S) ppm.

Capítulo I – Adutos de Biginelli derivados da ureia e tiourea e do salicialdeído (ABO-d / ABS-d)

Em um balão de fundo redondo foram adicionados o acetoacetato de etila (1,5 mmol), o aldeído apropriado (1,0 mmol), a ureia (1,5 mmol), o NH_4Cl em quantidade catalítica (0,3 mmol, 20 mol%) e 5 mL de metanol. A reação ocorreu sob em refluxo e agitação magnética por 8 horas. A purificação dos produtos foi feita por meio de recristalização com acetato de etila.



Etil 4-(2-hidroxifenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (ABO-d): Sólido branco, 43%, P.F: 203-205°C. IV (ATR, cm^{-1}) $\bar{\nu}$: 3205, 3071, 2941, 1746, 1679, 1611, 1587, 1508, 1460, 1372, 1349, 1246, 1185, 1087, 1029, 941, 903, 797, 747, 705, 612, 566. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 1,23 (t, 3H, $J = 8$ Hz), 1,74 (s, 3H), 4,12-4,21 (m, 2H), 4,47 (s, 1H), 6,77 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 6,90 (t, 1H, $J = 8$ Hz), 7,17-7,24 (m, 3H), 7,59 (s, 1H) ppm. RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 14,0 (CH_3), 23,9 (CH_3), 43,8 (C), 47,7 (CH_2), 60,5 (C), 83,1 (CH), 116,5 (CH), 120,4 (C), 125,4 (CH), 128,6 (CH), 129,3 (C), 150,6 (C=O), 154,5 (C-OH), 168,4 (C=O) ppm.

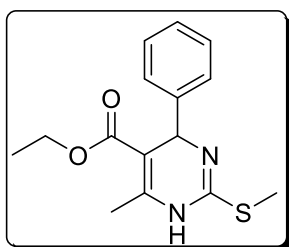


Etil 4-(2-hidroxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (ABS-d): Sólido branco, 28%, P.F: 203-205°C. IV (ATR, cm^{-1}) $\bar{\nu}$: 3362, 3162, 3087, 3000, 2949, 1727, 1590, 1562, 1490, 1371, 1323, 1214, 1180, 1150, 1088, 1022, 902, 844, 758, 707, 647, 604, 552. RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6): 1,28 (t, 3H, $J = 8,0$ Hz), 1,95 (s, 3H), 4,20-4,26 (m, 2H), 4,85 (s, 1H), 6,84 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 6,95 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,21-7,27 (m, 2H), 8,20 (s, 1H), 8,36 (s, 1H), ppm. RMN de ^{13}C (100

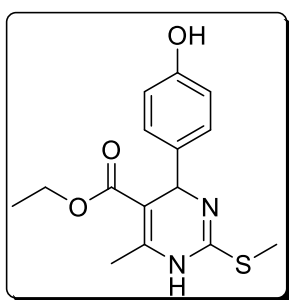
MHz, acetona- d_6): 14,4 (CH₃), 24,2 (CH₃), 49,9 (CH), 61,73 (CH₂), 82,6 (C), 117,5 (CH), 121,9 (CH), 124,6 (C), 129,4 (CH), 130,6 (C-OH), 151,8 (C), 168,6 (C=O), 179,0 (C=S) ppm.

Capítulo I – Adutos de Biginelli metilados (ABSMe-a-d)

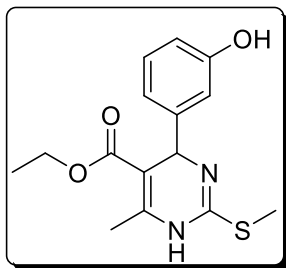
Em um balão adicionaram-se os adutos de Biginelli derivados da tioureia adequada (1,0 mmol) e o iodeto de metila (1,8 mmol), os reagentes foram dissolvidos em 5 mL de etanol. A reação ocorreu sob refluxo e agitação magnética por 1h. Após este período foram adicionados à mistura reacional 10 ml de solução saturada de NaHCO₃ e a solução foi extraída com acetato de etila (3x 10 mL) e água. A fase orgânica foi lavada com solução de NaCl saturada (10 mL) e seca com MgSO₄ anidro. O solvente foi destilado e o produto obtido puro. Quando necessário, o produto foi recristalizado em acetato de etila.



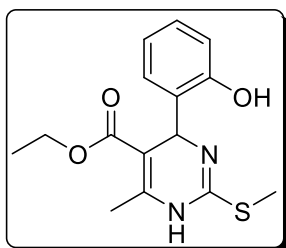
Etil 6-metil-2-(metiltio)-4-fenyl-1,4-di-hidropirimidina-5-carboxilato (ABSMe-a): Sólido branco, 65%, P.F: 172-174°C (Literatura: 172-174 °C⁷⁴). IV (ATR, cm⁻¹) $\bar{\nu}$: 3319, 2988, 1648, 1471, 1372, 1312, 1281, 1154, 1107, 1023, 905, 871, 781, 766, 702, 617, 560. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO- d_6): 1,12 (t, 3H, J = 8,0 Hz), 2,22 (s, 3H), 2,28 (s, 3H), 3,97-4,03 (m, 2H), 5,52 (s, 1H), 7,18-7,32 (m, 5H), 9,60 (s, 1H), ppm. RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO- d_6): 12,56 (CH₃), 14,1 (CH₃), 17,5 (CH₃), 53,0 (CH), 59,0 (CH₂), 98,2 (C), 126,1 (CH), 126,5 (CH), 128,1 (CH), 145,6 (C), 145,9 (C), 150,4 (C=O), 166,2 (C-S) ppm.



Etil 4-(4-hidroxifenil)-6-metil-2-(metiltio)-1,4-di-hidropirimidina-5-carboxilato (ABSMe-b): Sólido branco, 57%, P.F: 220-222°C (Literatura: 193-195°C⁷⁴). IV (ATR, cm⁻¹) $\bar{\nu}$: 3309, 3004, 2933, 2672, 1654, 1608, 1511, 1472, 1373, 1290, 1260, 1196, 1165, 1108, 1021, 967, 918, 834, 771, 723, 626, 578, 560. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO- d_6): 1,12 (t, 3H, J = 8,0 Hz), 2,21 (s, 3H), 2,26 (s, 3H), 3,98 (q, 2H, J = 8,0 Hz), 5,39 (s, 1H), 6,66 (d, 2H, J = 8,0 Hz), 6,99 (d, 2H, J = 8,0 Hz), 9,21 (s, 1H), 9,50 (s, 1H) ppm. RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO- d_6): 12,56 (CH₃), 14,1 (CH₃), 17,5 (CH₃), 58,2 (CH), 58,9 (CH₂), 98,6 (C), 115,0 (CH), 127,4 (CH), 136,4 (C), 145,5 (C-OH), 149,8 (C), 156,1 (C=O), 166,3 (C-S) ppm.



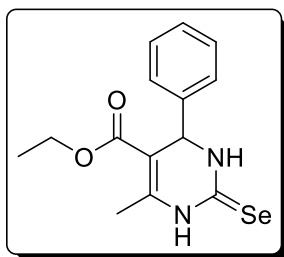
Etil 4-(3-hidroxifenil)-6-metil-2-(metiltio)-1,4-di-hidropirimidina-5-carboxilato (ABSMe-c): Sólido branco, 32%, P.F: 185-187°C (Literatura: 201-204°C⁷⁴). IV (ATR, cm⁻¹) $\bar{\nu}$: 3311, 2935, 1651, 1591, 1480, 1451, 1370, 1272, 1182, 1109, 1019, 999, 921, 861, 788, 728, 698, 649, 614, 562. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1,10-1,17 (m, 3H), 2,20 (s, 3H), 2,29 (s, 3H), 4,00 (q, 2H, *J* = 8 Hz), 5,43 (s, 1H), 6,56-6,65 (m, 4H), 7,04(t, 1H, *J* = 8,0 Hz), 9,24 (s, 1H), 9,56 (s, 1H) ppm. RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆): 12,61 (CH₃), 14,1 (CH₃), 17,5 (CH₃), 58,7 (CH), 59,0 (CH₂), 98,3 (C), 113,5 (CH), 117,2 (CH), 129,0 (CH), 145,7 (CH), 147,0 (C), 150,4 (C-O), 157,2 (C), 166,1 (C-S), 166,3 (C=O) ppm.



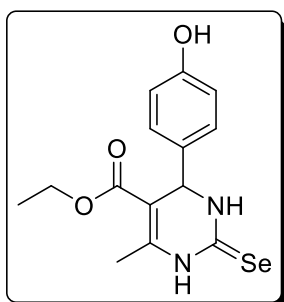
Etil 4-(2-hidroxifenil)-6-metil-2-(metiltio)-1,4-di-hidropirimidina-5-carboxilato (ABSMe-d): Sólido branco, 67%, P.F: 206-208°C. IV (ATR, cm⁻¹) $\bar{\nu}$: 3324, 3191, 2976, 1720, 1611, 1563, 1507, 1460, 1380, 1332, 1252, 1203, 1178, 1087, 1028, 910, 838, 776, 758, 722, 659, 630, 563. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1,20 (t, 3H, *J* = 8,0 Hz), 1,72 (s, 3H), 2,14 (s, 3H), 4,09 (q, 2H, *J* = 8 Hz), 4,89 (s, 1H), 6,77 (d, 2H, *J* = 8 Hz), 6,86 (t, 2H, *J* = 8,0 Hz), 7,11-7,24 (m, 2H), 8,30 (s, 1H) ppm. RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆): 12,3 (CH₃), 13,9 (CH₃), 23,0 (CH₃), 53,2 (CH), 60,2 (CH₂), 81,2 (C), 116,2 (CH), 120,3 (CH), 125,1 (C), 128,4 (CH), 129,1 (C-OH), 150,7 (C), 155,4 (C=O), 168,7 (C-S) ppm.

Capítulo I – Adutos de Biginelli derivados da selenoureia (ABSe-a-c)

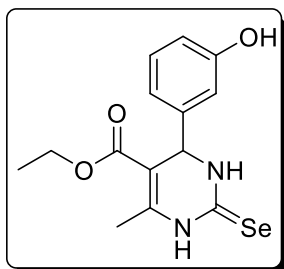
Em um balão de 2 vias foram adicionados Selênio elementar (2,5 mmol) e 10 mL de etanol seco sob atmosfera inerte (argônio). A mistura foi deixada sob agitação magnética e em seguida adicionou-se o NaBH₄ (5,0 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética até que perdesse totalmente a cor (cinza para incolor), aproximadamente 15 minutos. Após este período o aduto de Biginelli metilado apropriado foi adicionado à mistura reacional. A reação então se deu sob atmosfera de argônio e a temperatura de refluxo (78°C) por 15 horas. Após este período adicionaram-se 20 mL de solução saturada de NaHCO₃ à reação e prosseguiu-se com extração com acetato de etila (3x 10mL). A fase orgânica foi lavada com solução de NaCl saturada (1x 10 mL) e seca com MgSO₄ anidro e o solvente foi destilado à pressão reduzida. Um sólido de coloração amarelo pálido foi isolado sem necessidade de purificação.



Etil 6-metil-4-fenil-2-selenoxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (ABSe-a): Sólido branco, 17%, P.F: 197-199°C (Literatura: 191-193°C⁷⁴). IV (ATR, cm⁻¹) $\bar{\nu}$: 3327, 3151, 3092, 2979, 1668, 1573, 1466, 1389, 1327, 1283, 1263, 1191, 1171, 1119, 1110, 1018, 863, 780, 758, 693, 638, 586, 558. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1,10 (t, 3H, *J* = 8,0 Hz), 2,30 (s, 3H), 3,98-4,04 (m, 2H), 5,18 (s, 1H), 7,21-7,38 (m, 5H), 10,18 (s, 1H), 10,64 (s, 1H) ppm. RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆): 13,9 (CH₃), 16,9 (CH₃), 54,2 (CH), 59,7 (CH₂), 101,2 (C), 126,4 (CH), 127,8 (CH), 128,6 (CH), 143,0 (C), 144,0 (C), 165,2 (C=O), 170,4 (C=Se), ⁷⁷Se (76 MHz, DMSO-*d*₆): 260,6 ppm.



Etil 4-(4-hidroxifenil)-6-metil-2-selenoxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (ABSe-b): Sólido branco, 28%, P.F: 200-203°C (Literatura: 159-161°C⁷⁴). IV (ATR, cm⁻¹) $\bar{\nu}$: 3534, 3344, 2918, 1687, 1656, 1560, 1425, 1338, 1254, 1128, 992, 933, 819, 707, 591, 576, 555. RMN de ¹H (400 MHz, metanol-*d*₄): 1,16 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz), 2,33 (s, 3H), 4,05-4,11 (m, 2H), 5,22 (s, 1H), 6,72 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz), 7,09 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz) ppm. RMN de ¹³C (100 MHz, metanol-*d*₄): 4,9 (CH₃), 7,9 (CH₃), 46,6 (CH), 51,8 (CH₂), 94,6 (C), 106,8 (CH), 119,7 (CH), 125,9 (C), 134,8 (C-OH), 149,0 (C), 157,9 (C=O), 162,1 (C=S) ppm.

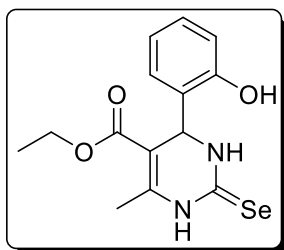


Etil 4-(3-hidroxifenil)-6-metil-2-selenoxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (ABSe-c): Sólido branco, 25%, P.F: 197-199°C (Literatura: 193-195°C⁷⁴). IV (ATR, cm⁻¹) $\bar{\nu}$: 3286, 3162, 2983, 1664, 1589, 1572, 1473, 1445, 1370, 1338, 1281, 1183, 1112, 1012, 999, 983, 955, 788, 763, 753, 700, 646, 572. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1,12 (t, 3H, *J* = 8,0 Hz), 2,29 (s, 3H), 3,99-4,05 (m, 2H), 5,10 (s, 1H), 6,63-6,66 (m, 3H), 7,13 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz), 9,46 (s, 1H), 10,12 (s, 1H), 10,60 (s, 1H) ppm. RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆): 14,0 (CH₃), 16,9 (CH₃), 54,1 (CH), 59,7 (CH₂), 101,3 (C), 113,3 (CH), 114,7 (CH), 117,0 (CH), 129,5 (CH), 143,8 (C), 144,3 (C-OH), 157,5 (C), 165,2 (C=O), 170,2 (C=S) ppm. ⁷⁷Se (76 MHz, DMSO-*d*₆): 259,0 ppm.

Capítulo I – Adutos de Biginelli derivados da selenoureia (ABSe-d)

Em um balão de 2 vias foram adicionados selênio elementar (2,5 mmol) e 10 mL de THF seco sob atmosfera inerte (argônio). A mistura foi deixada sob agitação magnética e em seguida adicionou-se o NaBH₄ (5,0 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética até que perdesse totalmente a cor (cinza para incolor), aproximadamente 30

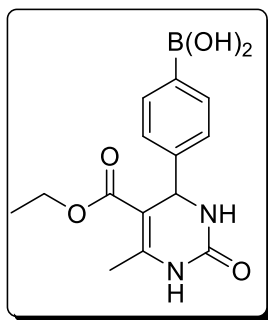
minutos. Após este período o aduto de Biginelli metilado apropriado e o LiCl (1,0 mmol) foram adicionados à mistura reacional. A reação então se deu sob atmosfera de argônio e a temperatura de refluxo por 15 horas. Após este período procedeu-se uma extração com diclorometano (3x 10mL) e água. A fase orgânica foi lavada com solução de NaCl saturada (1x 10mL) e seca com MgSO₄ anidro e o solvente foi destilado à pressão reduzida. Um óleo amarelado foi obtido purificado via recristalização com acetato de etila. Um sólido amarelo pálido foi obtido, quantificado e caracterizado.



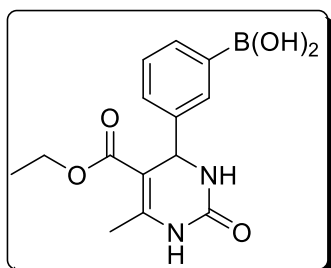
Etil 4-(2-hidroxifenil)-6-metil-2-selenoxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (ABSe-d): Sólido branco, 23%, P.F: 177-179°C. IV (ATR, cm⁻¹) $\bar{\nu}$: 3172, 2981, 1652, 1564, 1457, 1320, 1279, 1170, 1099, 1022, 852, 750, 636, 598, 559. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1,04-1,23 (m, 3H), 2,27 (s, 3H), 3,96 (q, 2H, *J* = 8 Hz), 5,46 (s, 1H), 6,74-6,81 (m, 2H), 6,96 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz), 6,98-7,09 (m, 1H), 9,62 (s, 1H), 10,46 (s, 1H), ppm. RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆): 13,9 (CH₃), 16,8 (CH₃), 50,0 (CH), 59,4 (CH₂), 100,2 (C), 115,6 (CH), 118,7 (CH), 128,1 (C), 128,4 (CH), 128,7 (C-OH), 143,8 (C), 154,8 (C), 165,3 (C=O), 170,1 (C=S) ppm. ⁷⁷Se (76 MHz, DMSO-*d*₆): 255,4 ppm.

5.3.2 Capítulo II – Adutos de Biginelli derivados de ácidos borônicos (AcB-a-f)

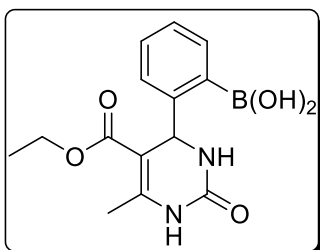
Os adutos de Biginelli borônicos derivados de ureia (AcB-a-c) foram obtidos por condensação em uma reação de três componentes entre ureia (3,0 mmol), acetoacetato de etila (1,0 mmol) e o ácido formilfenil-borônico apropriado (1,0 mmol) na presença de CeCl₃·7H₂O (2,5 mmol). A reação ocorreu em etanol sob refluxo por 4 horas. Os produtos foram isolados puros por precipitação com gotejamento de água gelada e filtrados à pressão reduzida. Os derivados de tioureia (AcB-d-f) foram preparados de maneira similar, no entanto na presença do catalisador de NH₄Cl (25 mol%) e em metanol. A reação ocorreu sob refluxo por 12 horas. Subsequentemente, a mistura reacional foi extraída com acetato de etila e água (3 vezes, 20 mL), e a fase orgânica foi lavada com uma solução saturada de NaCl e concentrada. O produto foi isolado e recristalizado em diclorometano.



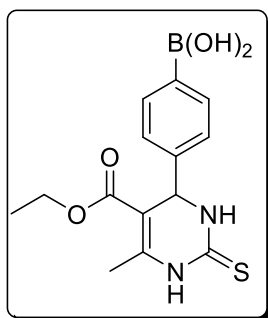
Ácido 4-(5-(etoxicarbonil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidin-4-il)fenilborônico (AcB-a): Sólido branco, 81%, P.F: 215-218°C (Literatura: 214–218 °C⁹³). IV (ATR, cm⁻¹) $\bar{\nu}$: 3387, 3253, 3165, 2982, 1684, 1648, 1606, 1563, 1443, 1364, 1325, 1295, 142, 1204, 1123, 1084, 1049, 1020, 869, 821, 756, 713, 654, 630, 616. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1,09 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz), 2,24 (s, 3H), 3,99 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz), 5,1 (s, 1H), 7,19 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz), 7,71 (d, 3H, *J* = 8,0 Hz), 7,98 (s, 2H), 9,16 (s, 1H). RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆): 14,1 (CH₃), 17,7 (CH₃), 53,9 (CH), 59,2 (CH₂), 99,2 (C), 125,3 (CH), 134,2 (CH), 146,5 (C), 148,3 (C), 152,1 (C=O), 165,3 (C=O).



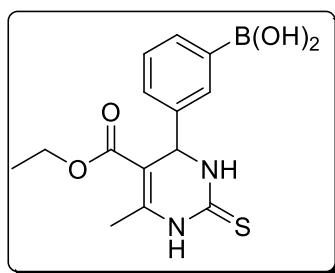
Ácido 3-(5-(etoxicarbonil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidin-4-il)fenilborônico (AcB-b): Sólido branco, 83%, P.F: 198-200°C (Literatura: 198–202 °C⁹³). IV (ATR, cm⁻¹) $\bar{\nu}$: 3533, 3348, 3228, 3116, 2981, 1695, 1674, 1645, 1465, 1365, 1324, 1296, 1228, 1172, 1115, 1100, 1041, 1019, 964, 921, 874, 780, 710, 651, 633, 577. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1,34 (t, 3H, *J* = 8,0 Hz), 2,50 (s, 3H), 4,23 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz), 5,39 (s, 1H), 7,52 (s, 2H), 7,93 (d, 3H, *J* = 8,0 Hz), 8,25 (s, 2H), 9,39 (s, 1H). RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆): 14,07 (CH₃), 17,8 (CH₃), 54,4 (CH), 59,1 (CH₂), 99,4 (C), 127,3 (CH), 128,2 (CH), 132,4 (CH), 133,0 (CH), 143,9 (C), 148,1 (C), 152,0 (C=O), 165,3 (C=O).



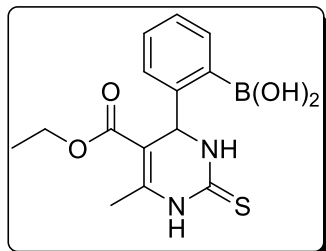
Ácido 2-(5-(etoxicarbonil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidin-4-il)fenilborônico (AcB-c): Sólido branco, 81%, P.F: 191-192°C (Literatura: 192-193 °C⁹³). IV (ATR, cm⁻¹) $\bar{\nu}$: 3398, 3321, 1687, 1645, 1443, 1369, 1338, 1313, 1295, 1229, 1196, 1105, 1088, 1029, 786, 763, 752, 740, 693, 650. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1,02 (t, 3H, *J* = 7,1 Hz), 2,28 (s, 3H), 3,84-3,98 (m, 2H), 5,48 (s, 1H), 7,04 (s, 1H), 7,19-7,24 (m, 3H), 7,45 (t, 1H, *J* = 7,1 Hz), 8,21 (s, 2H), 9,19 (s, 1H). RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆): 14,1 (CH₃), 17,7 (CH₃), 53,8 (CH), 59,1 (CH₂), 99,5 (C), 125,6 (CH), 126,4 (CH), 129,7 (CH), 133,3 (CH), 148,2 (C), 151,4 (C=O), 165,4 (C=O). HRMS[M+H]⁺ calc. 305,1311 m/z; exp. 355,1355 m/z.



Ácido 4-(5-(etoxicarbonil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidin-4-il)fenilborônico (AcB-d): Sólido branco, 30%, P.F: 179-181°C (Literatura: 176–178°C⁹⁵). IR (ATR, cm⁻¹) $\bar{\nu}$: 3306, 3241, 3177, 1703, 1664, 1647, 1564, 1463, 1332, 1281, 1193, 1182, 1123, 1087, 1067, 779, 737, 708, 643, 624, 603, 591. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1,10 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz), 2,28 (s, 3H), 4,00 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz), 5,16 (s, 1H), 7,17 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz), 7,73 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz), 8,02 (s, 2H), 9,62 (s, 1H), 10,31 (s, 1H). RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆): 14,0 (CH₃), 17,1 (CH₃), 54,0 (CH), 59,6 (CH₂), 100,6 (C), 125,4 (CH), 134,3 (CH), 145,0 (CH), 145,1 (C), 165,1 (C=O), 174,3 (C=S).



Ácido 3-(5-(etoxicarbonil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidin-4-il)fenilborônico (AcB-e): Sólido amarelo pálido, 35%, P.F: 178-180°C (Literatura: 170–172°C⁹⁵). IR (ATR, cm⁻¹) $\bar{\nu}$: 3172, 3014, 2989, 1700, 1685, 1637, 1569, 1476, 1430, 1360, 1312, 1269, 1182, 1126, 1101, 1012, 907, 833, 804, 779, 705, 653, 604, 589. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1,09 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz), 2,29 (s, 3H), 3,98 (q, 2H, *J* = 8,0 Hz), 5,15 (s, 1H), 7,24-7,30 (m, 2H, *J* = 8,0 Hz), 7,68 (t, 2H, *J* = 8,0 Hz), 8,02 (s, 2H), 9,60 (s, 1H), 10,27 (s, 1H). RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆): 13,9 (CH₃), 17,1 (CH₃), 54,4 (CH), 59,5 (CH₂), 100,7 (C), 127,4 (CH), 128,2 (CH), 132,5 (C), 133,4 (C), 144,5 (CH), 144,9 (C), 165,1 (C=O), 173,9 (C=S).



Ácido 2-(5-(etoxicarbonil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidin-4-il)fenilborônico (AcB-f): Sólido branco, 32% yield, P.F: 169-170°C (Literatura: 168–170°C⁹⁵). IR (ATR, cm⁻¹) $\bar{\nu}$: 3329, 3191, 1703, 1648, 1581, 1479, 1447, 1364, 1337, 1328, 1310, 1192, 1185, 1129, 1089, 1068, 1040, 966, 866, 778, 765, 740, 709, 624, 603. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1,02 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz), 2,31 (s, 3H), 3,85-4,02 (m, 2H), 5,4 (s, 1H), 7,22 (q, 2H, *J* = 8,0 Hz), 7,37 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz), 7,47 (d, 1H, *J* = 6,0 Hz), 8,27 (s, 2H), 8,97 (s, 1H), 10,32 (s, 1H). RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆): 13,9 (CH₃), 17,1 (CH₃), 54,0 (CH), 59,4 (CH₂), 101,2 (C), 126,1 (CH), 136,8 (CH), 129,8 (C), 133,3 (C), 144,6 (CH), 146,9 (C), 165,1 (C=O), 173,3 (C=S).

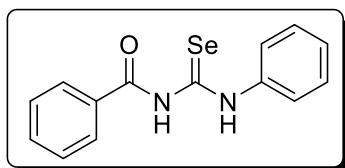
5.3.3 Capítulo III – Síntese do selenocianato de potássio

Para a síntese do KSeCN, em um balão de 250 mL adicionaram-se 2,01 g de KCN (30 mmol) e 2,61 g de selênio elementar (33 mmol). A reação ocorreu sob aquecimento até que a mistura se fundisse (~130-150°C) e o sistema permaneceu em aquecimento por 2 horas sob agitação magnética constante. Após esse período, a temperatura foi diminuída até que a temperatura ambiente (T.A) fosse atingida. À T.A foram adicionados 20 mL de

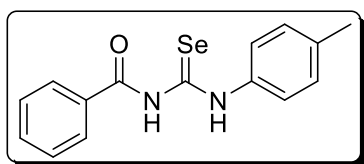
etanol anidro e a mistura foi agitada até a completa solubilização do produto. No final, a mistura foi filtrada para remover o excesso reagentes. O produto foi isolado após destilação do solvente e purificado por meio de recristalização em éter etílico. O produto foi obtido com 70% de rendimento.

Capítulo III – Síntese de benzoilselenoureias (BSU1-11)

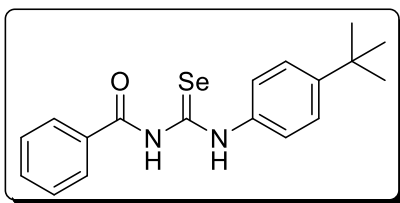
Em um balão de fundo redondo, adicionaram-se cloreto de benzoíla (1 mmol) e selenocianato de potássio (1 mmol) no escuro. A reação ocorreu em condições isentas de solventes, sob atmosfera de argônio agitação magnética. A mistura reacional foi aquecida a 50°C durante 30 minutos e depois arrefecida até à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se a esta mistura uma solução da amina aromática adequada (1mmol) em acetona seca (5 mL). A reação ocorreu sob refluxo e agitação magnética durante 5 horas. A mistura reacional foi então concentrada sob pressão reduzida e o produto puro foi obtido através de coluna cromatográfica com diclorometano.



N-(Fenilcarbosenoi)benzamida (BSU 1): Sólido amarelo, 75%, P.F.: 137-139°C; IV (ATR, cm^{-1}): 3246, 2966, 2920, 1671, 1607, 1597, 1560, 1519, 1485, 1447, 1357, 1300, 1260, 1151, 1131, 1079, 1062, 1025, 999, 982, 905, 838, 794, 754, 693, 680, 634, 601, 572; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): 7,25 (s, 1H), 7,35 (s, 2H), 7,45 (s, 2H), 7,56 (s, 2H), 7,66-7,74 (m, 2H), 9,45 (s, 1H), 13,01 (s, 1H) ppm; RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 180,2, 167,0, 138,58, 134,1, 131,4, 129,4, 129,1, 127,8, 127,7, 124,8 ppm; RMN de ^{77}Se (51,5 MHz, CDCl_3 ,) 385,5 ppm.



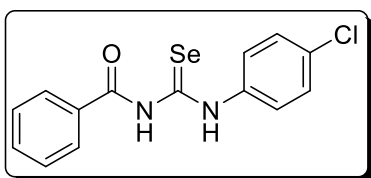
N-(p-Tolilcarbamoselenoi)benzamida (BSU 2): Sólido amarelo, 15%, P.F: 127-128°C, IV (ATR, cm^{-1}): 3229, 2961, 1667, 1593, 1553, 1516, 1507, 1488, 1352, 1296, 1257, 1154, 1132, 1079, 1065, 999, 938, 832, 815, 698, 653, 620, 596, 574; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): 2,40 (s, 3H), 7,26-7,29 (m, 2H), 7,56-7,60 (m, 4H), 7,68-7,72 (m, 1H), 7,92-7,95 (m, 2H), 9,43 (s, 1H), 12,94 (s, 1H) ppm; RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 180,1, 167,0, 137,7, 136,0, 134,0, 131,4, 129,7, 129,4, 127,7, 124,7, 21,3 ppm; RMN de ^{77}Se (51,5 MHz, CDCl_3 ,) 377,9 ppm.



***N*-((4-(*Tert*-butil)fenil)carbamoseleoil)benzamida**

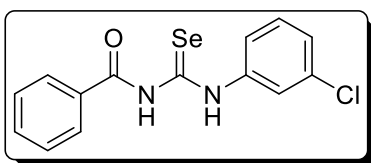
(BSU 3): Sólido amarelo, 35%, P.F: 210-212°C, IV (ATR, cm^{-1}): 2959, 1670, 1599, 1539, 1511, 1488, 1342, 1262, 1131, 1081, 841, 704, 615, 576; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): 1,34 (s, 9H), 7,46 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 7,55 (t, 2H, $J = 8$ Hz), 7,66 (d, 3H, $J = 8$ Hz), 7,91 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 9,44 (s, 1H), 12,98 (s, 1H) ppm;

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 179,6, 167,0, 150,79, 135,8, 134,0, 131,4, 129,4, 127,7, 126,0, 124,1, 34,8, 31,4 ppm; RMN de ^{77}Se (51,5 MHz, CDCl_3 ,) 377,8 ppm.



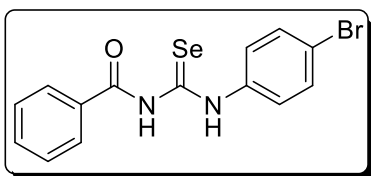
***N*-((4-Clorofenil)carbamoseleoil)benzamida**

(BSU 4): Sólido amarelo, 66%, P.F: 125-126°C, IV (ATR, cm^{-1}): 3196, 3007, 1657, 1587, 1516, 1262, 1138, 1089, 849, 824, 734, 705, 690, 610, 566; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): 7,40 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 7,56 (t, 2H, $J = 8$ Hz), 7,66-7,70 (m, 3H), 7,90 (d, 2H, $J = 12$ Hz), 9,48 (s, 1H), 13,03 (s, 1H) ppm; RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 180,5, 167,1, 137,0, 134,2, 133,1, 131,2, 129,4, 129,3, 127,7, 126,0 ppm; RMN de ^{77}Se (51,5 MHz, CDCl_3 ,) 397,4 ppm.



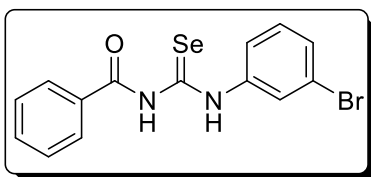
***N*-((3-Clorofenil)carbamoseleoil)benzamida**

(BSU 5): Sólido amarelo, 56%, P.F: 121-123°C, IV (ATR, cm^{-1}): 3284, 2922, 1665, 1586, 1548, 1519, 1471, 1429, 1342, 1254, 1129, 1077, 1024, 871, 792, 708, 689, 623, 570; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): 7,32 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 7,37 (t, 1H, $J = 8$ Hz), 7,56 (t, 2H, $J = 8$ Hz), 7,62 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 7,68 (t, 1H, $J = 8$ Hz), 7,84 (s, 1H), 7,91 (d, 2H, $J = 8$ Hz) ppm; RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 180,5, 167,1, 139,6, 134,7, 134,2, 131,2, 130,1, 129,4, 127,7, 124,8, 122,9 ppm; RMN de ^{77}Se (51,5 MHz, CDCl_3 ,) 406,8 ppm.



***N*-((4-Bromofenil)carbamoseleoil)benzamida**

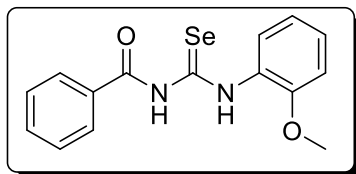
(BSU 6): Sólido amarelo, 40% , P.F: 129-132°C, IV (ATR, cm^{-1}): 3002, 1657, 1578, 1516, 1486, 1398, 13130, 1258, 1137, 1068, 1008, 820, 735, 706, 690, 640, 606, 554; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): 7,57 (t, 4H, $J = 8$ Hz), 7,63-7,70 (m, 2H), 7,90 (t, 2H, $J = 8$ Hz), 9,46 (s, 1H), 13,03 (s, 1H) ppm; RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 180,3, 167,1, 137,5, 134,2, 132,3, 131,2, 129,4, 127,7, 126,3, 121,0 ppm; RMN de ^{77}Se (51,5 MHz, CDCl_3 ,) 400,0 ppm.



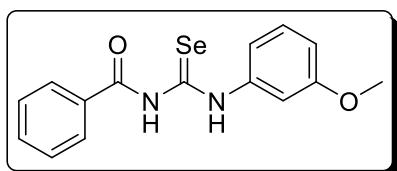
***N*-((3-Bromofenil)carbamoseleoil)benzamida**

(BSU 7): Sólido amarelo, 30% , P.F: 120-122°C, IV (ATR, cm^{-1}): 3330, 2926, 1664, 1574, 1519, 1477, 1334, 1254, 1132, 1073, 1024, 867, 771, 702, 684, 671, 615, 552; RMN de ^1H (400 MHz, Acetonitrila- d_3): 7,36 (t, 1H, $J = 8$ Hz), 7,50-7,58 (m, 4H), 7,70(t, 1H, $J = 8$ Hz), 7,93 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 8,0 (s, 1H), 9,92

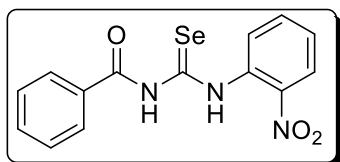
(s, 1H), 12,97 (s, 1H) ppm; RMN de ^{13}C (100 MHz, Acetonitrile- d_3): 182,6, 169,7, 141,5, 134,7, 132,5, 131,4, 131,1, 129,8, 129,2, 125,4, 122,2 ppm; RMN de ^{77}Se (51,5 MHz, CDCl_3 ,) 407,6 ppm.



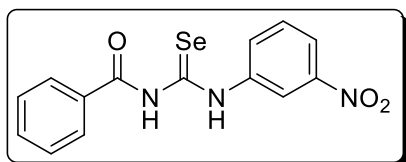
***N*-((2-Metoxifenil)carbamoselenoil)benzamida (BSU 8):** Sólido amarelo, 67%, P.F: 150-152°C, IV (ATR, cm^{-1}): 3361, 1682, 1602, 1588, 1496, 1456, 1431, 1339, 1277, 1147, 1069, 1029, 861, 782, 741, 695, 611, 552; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): 3,95 (s, 3H), 6,99 (s, 1H), 7,04 (s, 1H), 7,54 (s, 2H), 7,65 (s, 1H), 7,91 (s, 2H), 8,79 (s, 1H), 9,40 (s, 1H), 13,25 (s, 1H) ppm; RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 177,6, 166,6, 151,2, 133,9, 131,6, 129,3, 127,8, 127,7, 123,6, 120,2, 111,0, 56,1 ppm; RMN de ^{77}Se (51,5 MHz, CDCl_3 ,) 393,2 ppm.



***N*-((3-Metoxifenil)carbamoselenoil)benzamida (BSU 9):** Sólido amarelo, 25%, P.F: 119-121°C, IV (ATR, cm^{-1}): 3387, 2965, 1651, 1611, 1510, 1484, 1451, 1381, 1276, 1207, 1161, 1125, 1026, 1003, 996, 832, 811, 793, 778, 692, 643, 631, 570; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): 3,87 (s, 3H), 6,93 (s, 1H), 7,36 (s, 1H), 7,53-7,58 (m, 3H), 7,69 (s, 1H), 7,94 (s, 2H), 9,45 (s, 1H), 13,08 (s, 1H) ppm; RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 179,6, 167,0, 160,0, 139,5, 134,1, 131,3, 129,8, 129,4, 127,6, 116,7, 113,6, 109,9, 55,6 ppm; RMN de ^{77}Se (51,5 MHz, CDCl_3 ,) 396,6 ppm.



***N*-((2-Nitrofenil)carbamoselenoil)benzamida (BSU 10):** Sólido amarelo, 23%, P.F: 140-143°C, IV (ATR, cm^{-1}): 3361, 1682, 1602, 1588, 1496, 1456, 1431, 1339, 1252, 1222, 1147, 1069, 1029, 898, 861, 782, 741, 695, 684, 611, 552; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): 7,13-7,19 (m, 1H), 7,45 (s, 2H, $J = 8\text{ Hz}$), 7,56 (s, 1H), 7,66-7,74 (m, 1H), 7,91 (s, 2H), 9,45 (s, 1H), 13,01 (s, 1H) ppm; RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 165,9, 136,6, 136,3, 135,5, 134,1, 132,8, 129,2, 127,5, 123,0, 123,4, 122,2 ppm.



***N*-((3-Nitrofenil)carbamoselenoil)benzamida (BSU 11):** Sólido amarelo, 37%, P.F: 190-193°C, IV (ATR, cm^{-1}): 3247, 3081, 2924, 1668, 1513, 1341, 1257, 1153, 1133, 1080, 1066, 897, 828, 735, 677, 666, 635, 566; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): 7,56-7,64 (m, 3H), 7,70 (t, 1H, $J = 8\text{ Hz}$), 7,93 (d, 2H, $J = 8\text{ Hz}$), 8,10 (d, 1H, $J = 8\text{ Hz}$), 8,20 (d, 1H, $J = 8\text{ Hz}$), 8,74 (s, 1H), 9,55 (s, 1H), 13,28 (s, 1H) ppm; RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 181,4, 167,3, 148,5, 139,6, 134,4, 131,0, 130,6, 129,9, 129,5, 127,7, 122,2, 119,9 ppm; RMN de ^{77}Se (51,5 MHz, CDCl_3 ,) 423,8 ppm.

REFERÊNCIAS

1. Kappaun, K., Piovesan, A. R., Carlini, C. R. & Ligabue-Braun, R. Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – A review. *J. Adv. Res.* **13**, 3–17 (2018).
2. Krajewska, B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **59**, 9–21 (2009).
3. Sumner, J. B. THE ISOLATION AND CRYSTALLIZATION OF THE ENZYME UREASE. *J. Biol. Chem.* **69**, 435–441 (1926).
4. Dixon, N. E., Gazzola, C., Blakeley, R. L. & Zerner, B. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). Metalloenzyme. Simple biological role for nickel. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 4131–4133 (1975).
5. Menegassi, A. *et al.* Urease from cotton (*Gossypium hirsutum*) seeds: Isolation, physicochemical characterization, and antifungal properties of the protein. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 4399–4405 (2008).
6. Yang, Y., Chu, J., Cao, B., Liu, H. & Cheng, L. Biocementation of soil using non-sterile enriched urease-producing bacteria from activated sludge. *J. Clean. Prod.* **262**, 121315 (2020).
7. Mora, D. & Arioli, S. Microbial Urease in Health and Disease. *PLoS Pathog.* **10**, e1004472 (2014).
8. Konieczna, I. *et al.* Bacterial Urease and its Role in Long-Lasting Human Diseases. *Curr. Protein Pept. Sci.* **13**, 789–806 (2012).
9. de Miranda, Rubens Augusto; Marriel, Ivanildo Evódio; Oliveira-Paiva, C. A. O mercado de biofertilizantes e inoculantes : status e potencial de ativos da Embrapa Milho e Sorgo. (2023).
10. Mazzei, L., Musiani, F. & Ciurli, S. The structure-based reaction mechanism of urease, a nickel dependent enzyme: tale of a long debate. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **25**, 829–845 (2020).
11. Benini, S. *et al.* A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels. *Structure* **7**, 205–216 (1999).
12. Maroney, M. J. & Ciurli, S. Nonredox nickel enzymes. *Chem. Rev.* **114**, 4206–4228 (2014).
13. Benini, S., Rypniewski, W., Wilson, K., Ciurli, S. & Mangani, S. Structure-based rationalization of urease inhibition by phosphate: novel insights into the enzyme mechanism. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **6**, 778–790 (2001).
14. Musiani, F., Arnofi, E., Casadio, R. & Ciurli, S. Structure-based computational study of the catalytic and inhibition mechanisms of urease. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **6**, 300–314 (2001).
15. PIB do Agronegócio Brasileiro - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada - CEPEA-Esalq/USP. <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do->

agronegocio-brasileiro.aspx.

16. Modolo, L. V., Da-Silva, C. J., Brandão, D. S. & Chaves, I. S. A minireview on what we have learned about urease inhibitors of agricultural interest since mid-2000s. *J. Adv. Res.* **13**, 29–37 (2018).
17. Klimczyk, M., Siczek, A. & Schimmelpfennig, L. Improving the efficiency of urea-based fertilization leading to reduction in ammonia emission. *Sci. Total Environ.* **771**, 145483 (2021).
18. Cantarella, H., Otto, R., Soares, J. R. & Silva, A. G. de B. Agronomic efficiency of NBPT as a urease inhibitor: A review. *J. Adv. Res.* **13**, 19–27 (2018).
19. Crise de fertilizantes arrasta metade do mundo para insegurança alimentar | ONU News. <https://news.un.org/pt/story/2022/12/1806712>.
20. Fome cresce no mundo e atinge 9,8% da população global | ONU News. <https://news.un.org/pt/story/2022/07/1794722>.
21. Grupo de trabalho interministerial. Plano Nacional de Fertilizantes. *Secr. Espec. Assuntos Estratégicos* **1**, 195 (2021).
22. Cox, G. M., Mukherjee, J., Cole, G. T., Casadevall, A. & Perfect, J. R. Urease as a Virulence Factor in Experimental Cryptococcosis. *Infect. Immun.* **68**, 443–448 (2000).
23. Rego, Y. F. *et al.* A review on the development of urease inhibitors as antimicrobial agents against pathogenic bacteria. *J. Adv. Res.* **13**, 69–100 (2018).
24. Burne, R. A. & Chen, Y. Y. M. Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes Infect.* **2**, 533–542 (2000).
25. Rutherford, J. C. The Emerging Role of Urease as a General Microbial Virulence Factor. *PLoS Pathog.* **10**, 1–4 (2014).
26. Wu, H. *et al.* Epiberberine inhibits *Helicobacter pylori* and reduces host apoptosis and inflammatory damage by down-regulating urease expression. *J. Ethnopharmacol.* **318**, (2024).
27. de Jesus Souza, M. *et al.* *Helicobacter pylori* urease induces pro-inflammatory effects and differentiation of human endothelial cells: Cellular and molecular mechanism. *Helicobacter* **24**, 1–11 (2019).
28. Danilo de Oliveira, W. *et al.* Virulence, resistance and clonality of *Proteus mirabilis* isolated from patients with community-acquired urinary tract infection (CA-UTI) in Brazil. *Microb. Pathog.* **152**, (2021).
29. Norsworthy, A. N. & Pearson, M. M. From Catheter to Kidney Stone: The Uropathogenic Lifestyle of *Proteus mirabilis*. *Trends Microbiol.* **25**, 304–315 (2017).
30. Rathore, S. S., Sathiyamoorthy, J., Lalitha, C. & Ramakrishnan, J. A holistic review on *Cryptococcus neoformans*. *Microb. Pathog.* **166**, (2022).
31. Toplis, B. *et al.* A link between urease and polyamine metabolism in *Cryptococcus neoformans*. *Microb. Pathog.* **158**, (2021).

32. Olszewski, M. A. *et al.* Urease Expression by *Cryptococcus neoformans* Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. *Am. J. Pathol.* **164**, 1761–1771 (2004).
33. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (2017).
34. Milo, S. *et al.* A small-molecular inhibitor against *Proteus mirabilis* urease to treat catheter-associated urinary tract infections. *Sci. Rep.* **11**, 3726 (2021).
35. Cantarella, H., Otto, R., Soares, J. R. & Silva, A. G. de B. Agronomic efficiency of NBPT as a urease inhibitor: A review. *J. Adv. Res.* **13**, 19–27 (2018).
36. de Fátima, Â. *et al.* A mini-review on Biginelli adducts with notable pharmacological properties. *J. Adv. Res.* **6**, 363–373 (2015).
37. Modolo, L. V., da-Silva, C. J., Brandão, D. S. & Chaves, I. S. A minireview on what we have learned about urease inhibitors of agricultural interest since mid-2000s. *J. Adv. Res.* **13**, 29–37 (2018).
38. Kafarski, P. & Talma, M. Recent advances in design of new urease inhibitors: A review. *J. Adv. Res.* **13**, 101–112 (2018).
39. Svane, S., Sigurdarson, J. J., Finkenwirth, F., Eitinger, T. & Karring, H. Inhibition of urease activity by different compounds provides insight into the modulation and association of bacterial nickel import and ureolysis. *Sci. Rep.* **10**, 8503 (2020).
40. Horta, L. P. *et al.* Urease inhibitors of agricultural interest inspired by structures of plant phenolic aldehydes. *J. Braz. Chem. Soc.* **27**, 1512–1519 (2016).
41. Braga, T. C. *et al.* Ionic liquid-assisted synthesis of dihydropyrimidin(thi)one Biginelli adducts and investigation of their mechanism of urease inhibition. *New J. Chem.* **43**, 15187–15200 (2019).
42. Rashid, U. *et al.* Structure based virtual screening-driven identification of monastrol as a potent urease inhibitor. *J. Mol. Graph. Model.* **43**, 47–57 (2013).
43. Brito, T. O. *et al.* Design, syntheses and evaluation of benzoylthioureas as urease inhibitors of agricultural interest. *RSC Adv.* **5**, 44507–44515 (2015).
44. Priyadarsini, V. K. ; Indira, K. *Organoselenium Compounds in Biology and Medicine Synthesis, Biological and Therapeutic Treatments. The Royal Society of Chemistry 2018* (2017). doi:10.1039/9781788011907-fp001.
45. Genchi, G., Lauria, G., Catalano, A., Sinicropi, M. S. & Carocci, A. Biological Activity of Selenium and Its Impact on Human Health. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, (2023).
46. Burk, R. F. & Hill, K. E. Glutathione Peroxidases. in *Comprehensive Toxicology* 229–242 (Elsevier, 2010). doi:10.1016/B978-0-08-046884-6.00413-9.
47. Reich, H. J. & Hondal, R. J. Why Nature Chose Selenium. *ACS Chem. Biol.* **11**, 821–841 (2016).
48. Antiviral, N. *et al.* Broad-Spectrum Antiviral Activity of 2-p-D- Agentt. **24**, 353–

- 361 (1983).
49. Lenardão, E. J., Sancineto, L. & Santi, C. *New frontiers in organoselenium compounds. New Frontiers in Organoselenium Compounds* (2018). doi:10.1007/978-3-319-92405-2.
 50. Moussa, Z., Kaddoura, R., Saadeh, H. A., Abutaha, N. & Ahmed, S. A. Highly bioactive novel aryl-, benzyl-, and piperazine-selenoureas: synthesis, structural characterization and in vitro biological evaluation. *Heliyon* **8**, e10709 (2022).
 51. Ali, W., Benedetti, R., Handzlik, J., Zwergel, C. & Battistelli, C. The innovative potential of selenium-containing agents for fighting cancer and viral infections. *Drug Discov. Today* **26**, 256–263 (2021).
 52. Hou, W. & Xu, H. Incorporating Selenium into Heterocycles and Natural Products—From Chemical Properties to Pharmacological Activities. *J. Med. Chem.* **65**, 4436–4456 (2022).
 53. Nieuwland, C. & Fonseca Guerra, C. How the Chalcogen Atom Size Dictates the Hydrogen-Bond Donor Capability of Carboxamides, Thioamides, and Selenoamides. *Chem. – A Eur. J.* **28**, (2022).
 54. Desai, D. *et al.* Synthesis and characterization of a novel iNOS/Akt inhibitor Se,Se'-1,4-phenylenebis(1,2-ethanediyl)bisisoselenourea (PBISe)—against colon cancer. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 2038–2043 (2010).
 55. Angeli, A. *et al.* Discovery of New Selenoureido Analogues of 4-(4-Fluorophenylureido)benzenesulfonamide as Carbonic Anhydrase Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **8**, 963–968 (2017).
 56. Wiles, J. A. *et al.* Selenophene-Containing Inhibitors of Type IIA Bacterial Topoisomerases. *J. Med. Chem.* **54**, 3418–3425 (2011).
 57. Arsenyan, P. *et al.* Selenium analogues of raloxifene as promising antiproliferative agents in treatment of breast cancer. *Eur. J. Med. Chem.* **87**, 471–483 (2014).
 58. Martins, I. L. *et al.* Selenium-Containing Chrysin and Quercetin Derivatives: Attractive Scaffolds for Cancer Therapy. *J. Med. Chem.* **58**, 4250–4265 (2015).
 59. Kim, E. J. *et al.* OGA inhibition by GlcNAc-selenazoline. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 7058–7064 (2010).
 60. Macegoniuk, K. *et al.* 1,2-Benzisoselenazol-3(2H)-one Derivatives As a New Class of Bacterial Urease Inhibitors. *J. Med. Chem.* **59**, 8125–8133 (2016).
 61. Shakya, R., Kurmi, B. Das & Patel, P. A comprehensive review on synthesis of dihydropyrimidione via Biginelli reaction catalyzed by reusable magnetic nanocatalyst (from 2020–till date). *Appl. Organomet. Chem.* **37**, (2023).
 62. BIGINELLI, P. Intorno ad uramidi aldeidiche dell'etere acetilacetico. *Gazz. Chim. Ital.* **21**, 497–500 (1891).
 63. Costa dos Santos, P. H. *et al.* Synthesis of Biginelli Compounds using Microwave-Assisted Methods. *Curr. Microw. Chem.* **10**, 70–87 (2023).
 64. Mayer, T. U. *et al.* Small Molecule Inhibitor of Mitotic Spindle Bipolarity

- Identified in a Phenotype-Based Screen. *Science* (80-.). **286**, 971–974 (1999).
65. Matos, L. H. S., Masson, F. T., Simeoni, L. A. & Homem-de-Mello, M. Biological activity of dihydropyrimidinone (DHPM) derivatives: A systematic review. *Eur. J. Med. Chem.* **143**, 1779–1789 (2018).
 66. Faizan, S., Roohi, T. F., Raju, R. M., Sivamani, Y. & BR, P. K. A century-old one-pot multicomponent Biginelli reaction products still finds a niche in drug discoveries: Synthesis, mechanistic studies and diverse biological activities of dihydropyrimidines. *J. Mol. Struct.* **1291**, 136020 (2023).
 67. Mahgoub, S. *et al.* Synthesis of novel calcium channel blockers with ACE2 inhibition and dual antihypertensive/anti-inflammatory effects: A possible therapeutic tool for COVID-19. *Bioorg. Chem.* **116**, 105272 (2021).
 68. Mishra, M. K.; Gupta, A. K.; Negi, S. Anti-inflammatory activity of some new dihydropyrimidines derivatives. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **1**, 92–95 (2010).
 69. Huseynzada, A. E. *et al.* Synthesis, crystal structure and antibacterial studies of dihydropyrimidines and their regioselectively oxidized products. *RSC Adv.* **11**, 6312–6329 (2021).
 70. Lal, J., Gupta, S. K., Thavaselvam, D. & Agarwal, D. D. Design, synthesis, synergistic antimicrobial activity and cytotoxicity of 4-aryl substituted 3,4-dihydropyrimidinones of curcumin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 2872–2876 (2012).
 71. Folkers, K. & Johnson, T. B. Researches on Pyrimidines. CXXXVI. The Mechanism of Formation of Tetrahydropyrimidines by the Biginelli Reaction 1. *J. Am. Chem. Soc.* **55**, 3784–3791 (1933).
 72. Sweet, F. & Fissekis, J. D. Synthesis of 3,4-dihydro-2(1H)-pyrimidinones and the mechanism of the Biginelli reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 8741–8749 (1973).
 73. Kappe, C. O. A Reexamination of the Mechanism of the Biginelli Dihydropyrimidine Synthesis. Support for an N -Acyliiminium Ion Intermediate 1. *J. Org. Chem.* **62**, 7201–7204 (1997).
 74. Maskrey, T. S., Frischling, M. C., Rice, M. L. & Wipf, P. A Five-Component Biginelli-Diels-Alder Cascade Reaction. *Front. Chem.* **6**, (2018).
 75. Cepanec, I., Litvić, M., Filipan-Litvić, M. & Grüngold, I. Antimony(III) chloride-catalysed Biginelli reaction: a versatile method for the synthesis of dihydropyrimidinones through a different reaction mechanism. *Tetrahedron* **63**, 11822–11827 (2007).
 76. Ramos, L. M. *et al.* Mechanistic Studies on Lewis Acid Catalyzed Biginelli Reactions in Ionic Liquids: Evidence for the Reactive Intermediates and the Role of the Reagents. *J. Org. Chem.* **77**, 10184–10193 (2012).
 77. Barbosa, F. A. R. *et al.* Novel pyrimidinic selenourea induces DNA damage, cell cycle arrest, and apoptosis in human breast carcinoma. *Eur. J. Med. Chem.* **155**, 503–515 (2018).
 78. Fouda, A. M., Assiri, M. A. & Ali, T. E. Facile synthesis of some new functionalized 2-selenoxypyrimidines. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.*

- 195**, 324–330 (2020).
79. Mohammadi, B., Behbahani, F. K., Marandi, G. B. & Mirza, B. One-pot synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones, thiones and 2-selenoxo DHPMs using 1-butyl-3-methylimidazolium hydrogen sulfate as non-halogenated ionic liquid. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **196**, 54–60 (2020).
 80. Klein, E. *et al.* New chemical tools for investigating human mitotic kinesin Eg5. *Bioorganic Med. Chem.* **15**, 6474–6488 (2007).
 81. Samdhian, V., Bhatia, S. K. & Kaur, B. Cell-Viability Analysis Against MCF-7 Human Breast Cell Line and Antimicrobial Evaluation of Newly Synthesized Selenoxypyrimidines. *Russ. J. Org. Chem.* **55**, 1041–1046 (2019).
 82. Shaabani, A., Bazgir, A. & Teimouri, F. Ammonium chloride-catalyzed one-pot synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-ones under solvent-free conditions. *Tetrahedron Lett.* **44**, 857–859 (2003).
 83. Alberto, E. E. *et al.* Efficient Synthesis of Modular Amino Acid Derivatives Containing Selenium with Pronounced GPx-Like Activity. *European J. Org. Chem.* **2009**, 4211–4214 (2009).
 84. Copeland, R. A. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologist.* (2013).
 85. Engelking, L. R. Enzyme Kinetics. in *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry* 32–38 (Elsevier, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-391909-0.50006-2.
 86. Albert Lehninger, Michael M. Cox e Nelson, D. L. N. *Princípios de Bioquímica de Lehninger.* (2019).
 87. Silva, M. P., Saraiva, L., Pinto, M. & Sousa, M. E. Boronic Acids and Their Derivatives in Medicinal Chemistry: Synthesis and Biological Applications. *Molecules* **25**, (2020).
 88. Fernandes, G. F. S., Denny, W. A. & Dos Santos, J. L. Boron in drug design: Recent advances in the development of new therapeutic agents. *Eur. J. Med. Chem.* **179**, 791–804 (2019).
 89. Liu, J. *et al.* Fulvestrant-3 Boronic Acid (ZB716): An Orally Bioavailable Selective Estrogen Receptor Downregulator (SERD). *J. Med. Chem.* **59**, 8134–8140 (2016).
 90. Wang, L., Xie, S., Ma, L., Chen, Y. & Lu, W. 10-Boronic acid substituted camptothecin as prodrug of SN-38. *Eur. J. Med. Chem.* **116**, 84–89 (2016).
 91. Caselli, E. *et al.* Inhibition of Acinetobacter -Derived Cephalosporinase: Exploring the Carboxylate Recognition Site Using Novel β -Lactamase Inhibitors. *ACS Infect. Dis.* **4**, 337–348 (2018).
 92. Mandal, S. M., Pegu, R., Porto, W. F., Franco, O. L. & Pratihari, S. Novel boronic acid derivatives of bis(indolyl) methane as anti-MRSA agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27**, 2135–2138 (2017).
 93. Breitenbach, J. M. & Hausinger, R. P. Proteus mirabilis urease. Partial purification and inhibition by boric acid and boronic acids. *Biochem. J.* **250**, 917–920 (1988).

94. Todd, M. J. & Hausinger, R. P. Competitive inhibitors of *Klebsiella aerogenes* urease. Mechanisms of interaction with the nickel active site. *J. Biol. Chem.* **264**, 15835–15842 (1989).
95. Du, N., Sheng, L., Xu, H., Song, C. & Chen, S. Kinetics of competitive inhibition of jack bean urease by boric acid. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **82**, 53–58 (2012).
96. Ravi Charan Reddy, K. & Kayastha, A. M. Boric acid and boronic acids inhibition of pigeonpea urease. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **21**, 467–470 (2006).
97. Kumar, S. & Kayastha, A. M. Inhibition studies of soybean (*Glycine max*) urease with heavy metals, sodium salts of mineral acids, boric acid, and boronic acids. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **25**, 646–652 (2010).
98. Benini, S., Rypniewski, W. R., Wilson, K. S., Mangani, S. & Ciurli, S. Molecular Details of Urease Inhibition by Boric Acid: Insights into the Catalytic Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 3714–3715 (2004).
99. Protocol, M.-, Cao, C., Chen, Y., Wu, Y. & Deumens, E. OPAL : A Multiscale Multicenter Simulation Package Based on MPI-2 Protocol. *Int. J. Quantum Chem.* **111**, 4020–4029 (2011).
100. Blacquiere, J. M. *et al.* Dihydropyrimidinones containing boronic acids. *Can. J. Chem.* **83**, 2052–2059 (2005).
101. Bose, D. S., Fatima, L., Mereyala, H. B. Green Chemistry Approaches to the Synthesis of 5-Alkoxycarbonyl-4-aryl-3,4- dihydropyrimidin-2(1H)-ones by a Three-Component Coupling of One-Pot Condensation Reaction: Comparison of Ethanol, Water, and Solvent-free Conditions. *J. Org. Chem* **68**, 587–590 (2003).
102. Duguay, D. *et al.* Synthesis, characterization and antifungal testing of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-(thio)ones containing boronic acids and boronate esters. *Open Chem.* **6**, 562–568 (2008).
103. Francesca Macii, T. B. Spectrofluorimetric analysis of the binding of a target molecule to serum albumin: tricky aspects and tips. *J. Inorg. Biochem.* **216**, 1–14 (2021).
104. Hong-Mei, Z. . Y.-Q. W. Spectral studies on the interaction between Cu²⁺ and urease. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **96**, 352–357 (2012).
105. Bakar, K. A.; Feroz, S. R. A critical view on the analysis of fluorescence quenching data for determining ligand–protein binding affinity. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **223**, 1–5 (2019).
106. Van De Weert, M.; Stella, L. Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology. *J. Mol. Struct.* **998**, 144–150 (2011).
107. Krajewska, .; Zaborska, W. Jack bean urease: The effect of active-site binding inhibitors on the reactivity of enzyme thiol groups. *Bioorg. Chem.* **35**, 355–365 (2007).
108. Dias Júnior, L. C.; Novo, J. B. M. Software para simulação de mecanismo de supressão da luminescência: modelo cinético de stern-volmer. *Quim. Nov.* **37**,

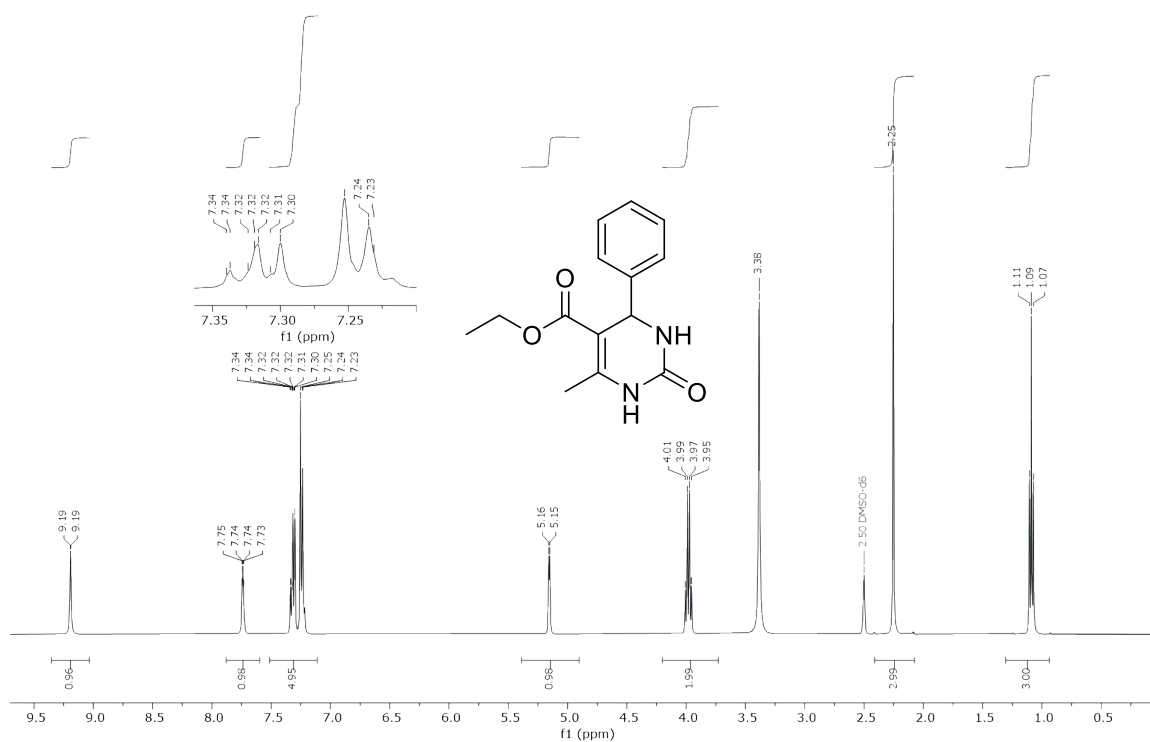
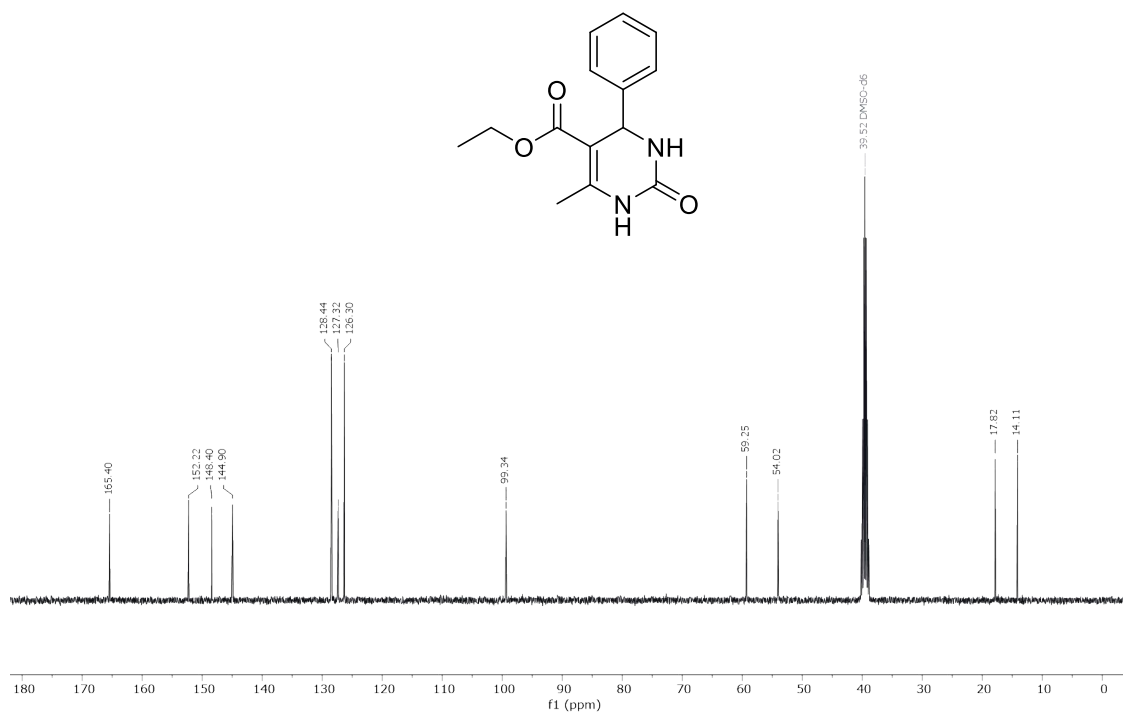
- 361–366 (2014).
109. de Barros, W. A.; Nunes, C. da S.; Souza, J. A. da C. R.; Nascimento, I. J. dos S.; Figueiredo, I. M.; de Aquino, T. M.; Vieira, L.; Farias, D.; Santos, J. C. C.; de Fátima, Â. The new psychoactive substances 25H-NBOMe and 25H-NBOH induce abnormal development in the zebrafish embryo and interact in the DNA major groove. *Curr. Res. Toxicol.* **2**, 386–398 (2021).
 110. Tavares, M. C.; Nascimento I. J. dos S.; de Aquino T. M.; Brito T. de O.; Macedo, F.; Modolo, L. V.; de Fátima, Â.; Santos, J. C. C. 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.* **299**, 1–13 (2023).
 111. Yao-Qun Li , Xiu-Ying Li , Ali Abbas Falih Shindi, Zhe-Xiang Zou Qian Liu , Li-Rong Lin, and N. L. Synchronous Fluorescence Spectroscopy and Its Applications in Clinical Analysis and Food Safety Evaluation. in *Reviews in Fluorescence* 95–117 (Springer Science+Business Media, LLC 2012, 2010). doi:10.1007/978-1-4419-9828-6_5.
 112. Sirajuddin, M., Ali, S. & Badshah, A. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **124**, 1–19 (2013).
 113. Wang, R., Hu, X., Pan, J., Zhang, G. & Gong, D. Interaction of isoeugenol with calf thymus DNA and its protective effect on DNA oxidative damage. *J. Mol. Liq.* **282**, 356–365 (2019).
 114. Guimarães, A. *et al.* Aminoguanidine Hydrazone Derivatives: The Antioxidant, Antineoplastic Profile, and Interaction with ctDNA Studies. *J. Braz. Chem. Soc.* (2024) doi:10.21577/0103-5053.20230177.
 115. Krajewska, B. & Zaborska, W. Jack bean urease: The effect of active-site binding inhibitors on the reactivity of enzyme thiol groups. *Bioorg. Chem.* **35**, 355–365 (2007).
 116. Lage, T. C. A. *et al.* In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* and interaction studies of lichen natural products with jack bean urease. *New J. Chem.* **42**, 5356–5366 (2018).
 117. Wallace, B. & Atzberger, P. J. Förster resonance energy transfer: Role of diffusion of fluorophore orientation and separation in observed shifts of FRET efficiency. *PLoS One* **12**, e0177122 (2017).
 118. Angeli, A. *et al.* Seleno Containing Compounds as Potent and Selective Antifungal Agents. *ACS Infect. Dis.* **8**, 1905–1919 (2022).
 119. Musthafa, M., Konakanchi, R., Ganguly, R. & Sreekanth, A. Novel dibenzosuberene substituted aroyl selenoureas: Synthesis, crystal structure, DFT, molecular docking and biological studies. *Phosphorus. Sulfur. Silicon Relat. Elem.* **195**, 331–338 (2020).
 120. Carta, Fabrizio; Angeli, Andrea; Seller, Silvia; Supuran, Claudiu T.; Cabassi, Clotilde Silvia; Spadini, C. Carbamoselenoyl derivatives as anti-infective agents. (2023).

121. Piętka-Ottlik, M., Wójtowicz-Młochowska, H., Kołodziejczyk, K., Piasecki, E. & Młochowski, J. New Organoselenium Compounds Active against Pathogenic Bacteria, Fungi and Viruses. *Chem. Pharm. Bull.* **56**, 1423–1427 (2008).
122. Almeida, F., Wolf, J. M. & Casadevall, A. Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* **14**, 1173–1185 (2015).
123. Rajasingham, R. *et al.* The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis. *Lancet Infect. Dis.* **22**, 1748–1755 (2022).
124. Chang, C. C. *et al.* Global guideline for the diagnosis and management of cryptococcosis: an initiative of the ECMM and ISHAM in cooperation with the ASM. *Lancet Infect. Dis.* (2024) doi:10.1016/S1473-3099(23)00731-4.
125. Cox, G. M., Mukherjee, J., Cole, G. T., Casadevall, A. & Perfect, J. R. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect. Immun.* **68**, 443–448 (2000).
126. Fu, M. S. *et al.* *Cryptococcus neoformans* urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. *PLOS Pathog.* **14**, e1007144 (2018).
127. Olszewski, M. A. *et al.* Urease Expression by *Cryptococcus neoformans* Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. *Am. J. Pathol.* **164**, 1761–1771 (2004).
128. Zaragoza, O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. *Virulence* **10**, 490–501 (2019).
129. Fabris, M., Nascimento-Júnior, N. M., Bispo, M. L. F. & Camargo, P. G. Computational Strategies Targeting Inhibition of *Helicobacter pylori* and *Cryptococcus neoformans* Ureases. *Curr. Pharm. Des.* **29**, 777–792 (2023).
130. De Jesus, D. F. F. *et al.* Organoselenium Has a Potent Fungicidal Effect on *Cryptococcus neoformans* and Inhibits the Virulence Factors. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2023) doi:10.1128/aac.00759-22.
131. Andriani, G. M. *et al.* Synergistic antifungal interaction of N-(butylcarbamothioyl) benzamide and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *Front. Microbiol.* **14**, (2023).
132. Hua, G. *et al.* New insight into the chemistry of selenoureas: Synthesis and single crystal structural study of diverse derivatives. *New J. Chem.* **43**, 7035–7043 (2019).
133. CLSI. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts - M27 document. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* (2017).
134. Pfaller, M. A., Sheehan, D. J. & Rex, J. H. Determination of Fungicidal Activities against Yeasts and Molds: Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for Standardization. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 268–280 (2004).
135. Singh, A. *et al.* Factors Required for Activation of Urease as a Virulence Determinant in *Cryptococcus neoformans*. *MBio* **4**, (2013).

136. Bradford, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
137. Weatherburn, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* **39**, 971–974 (1967).

APÊNDICE

Capítulo I – Adutos de Biginelli derivados da (tio/seleno)ureia e isotioureias

Figura S1 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABO-a.Figura S2 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABO-a.

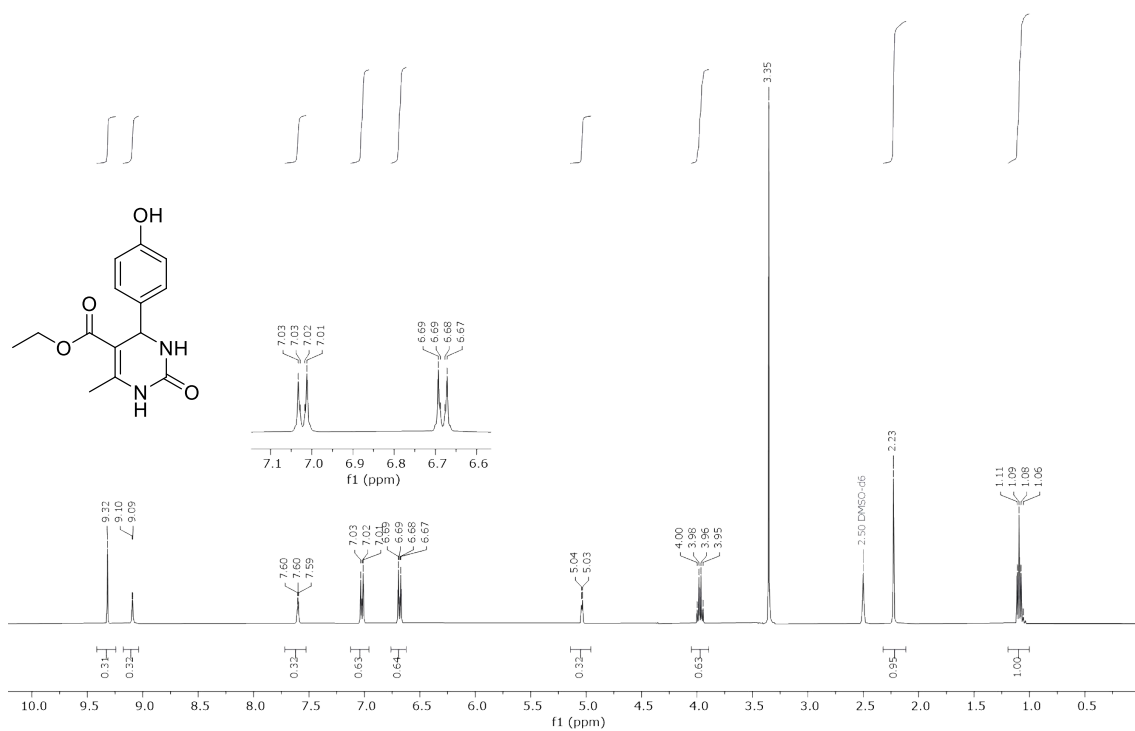


Figura S3 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABO-b.

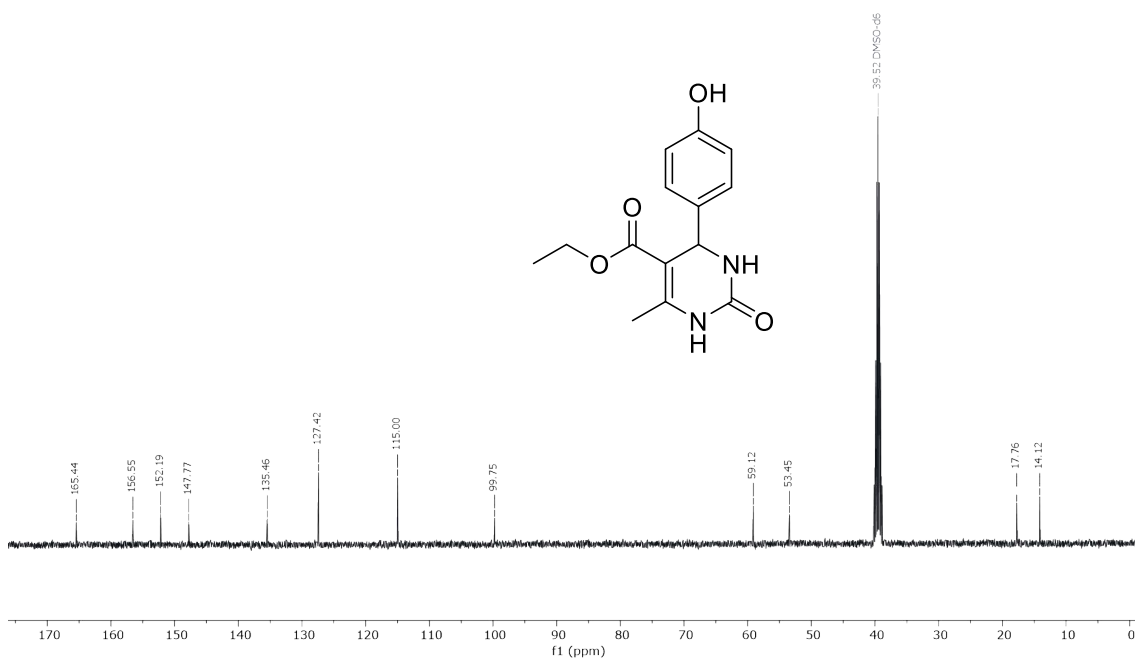


Figura S4 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABO-b.

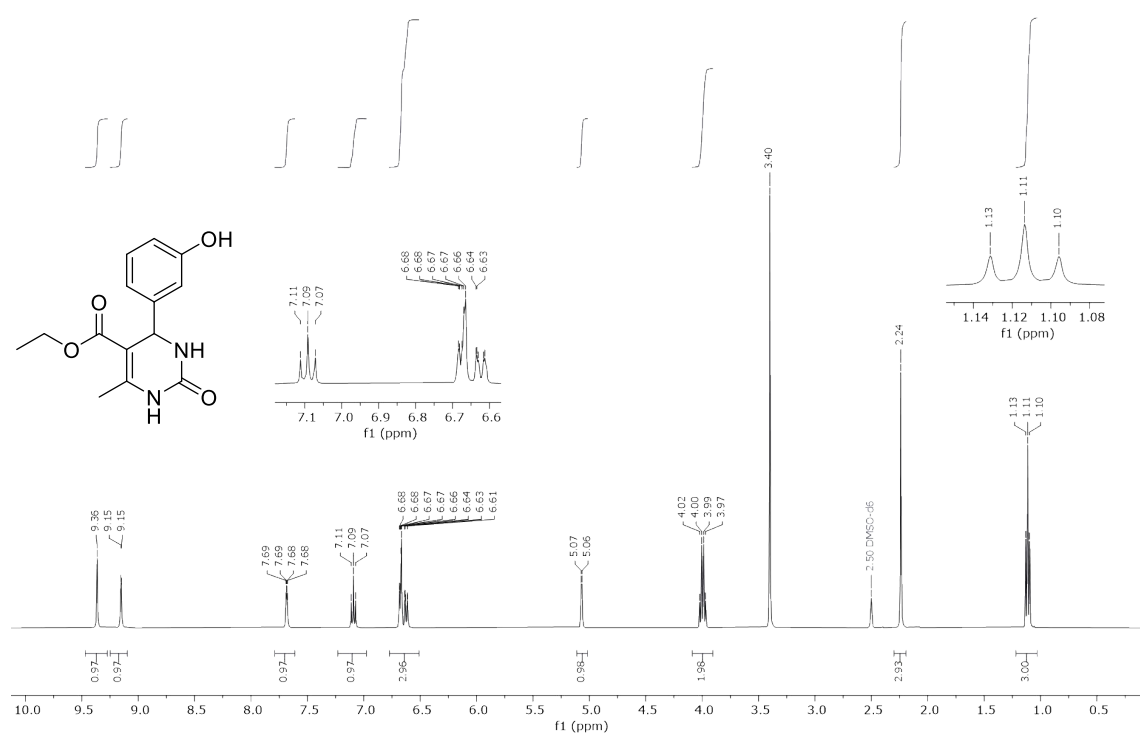


Figura S5 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABO-c.

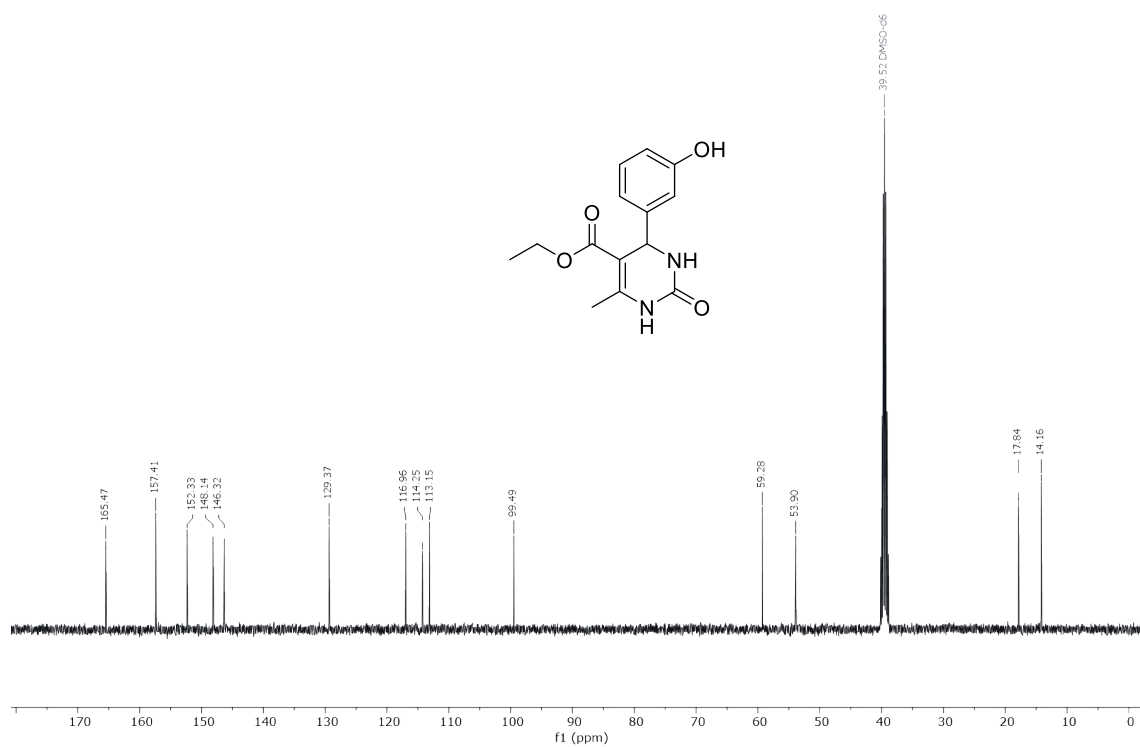


Figura S6 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABO-c.

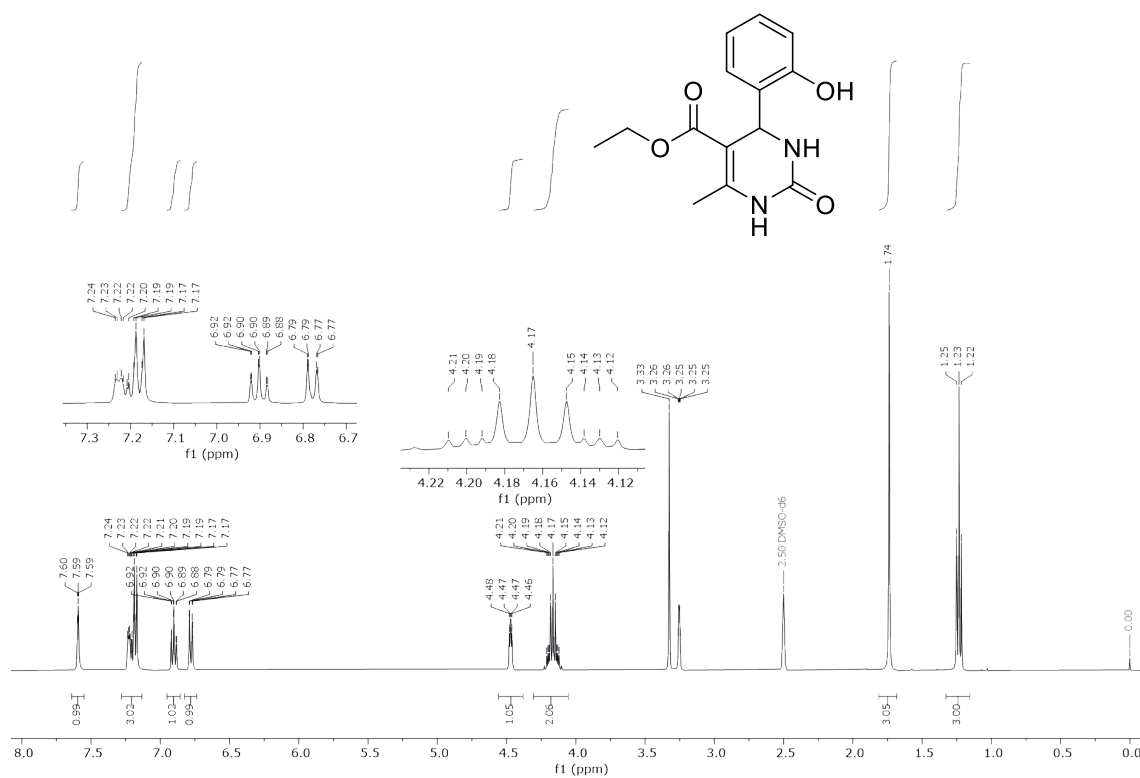


Figura S7 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABO-d.

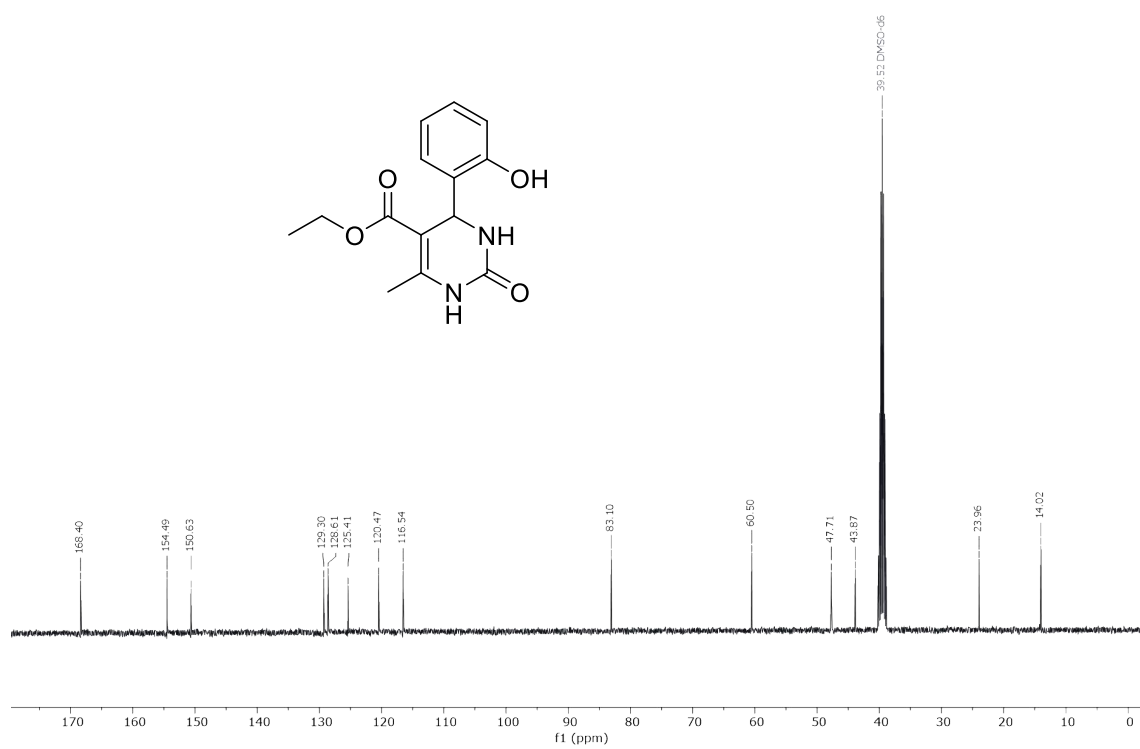


Figura S8 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABO-d.

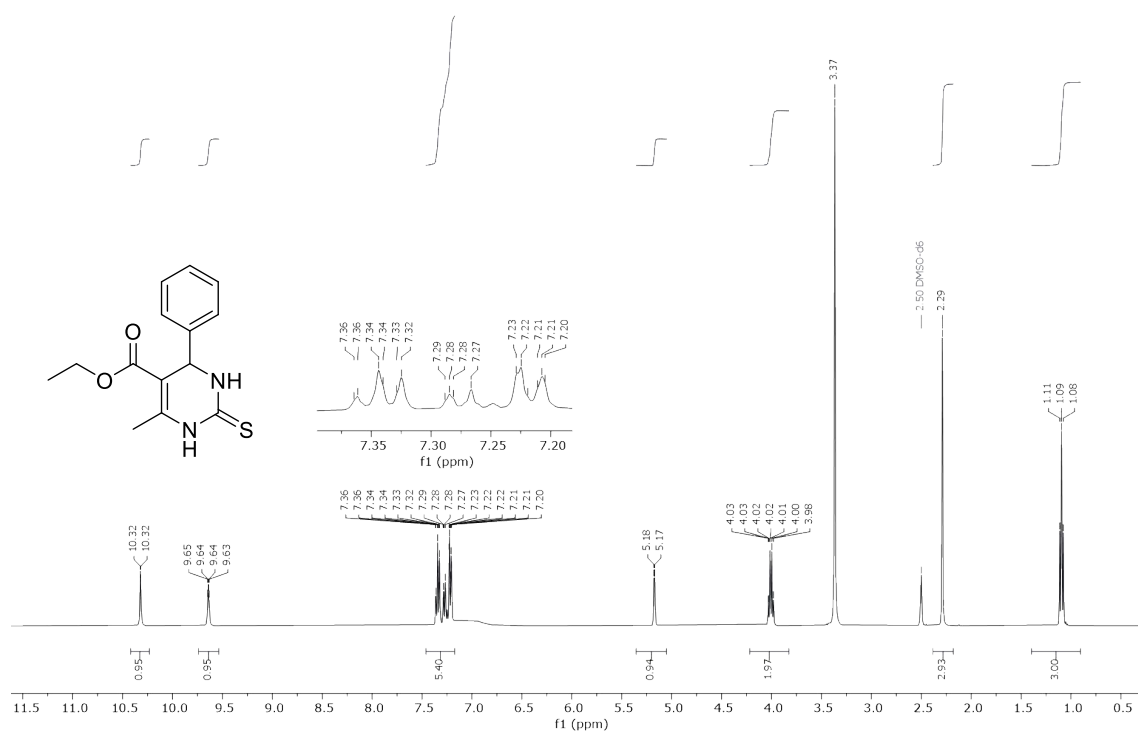


Figura S9 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABS-a.

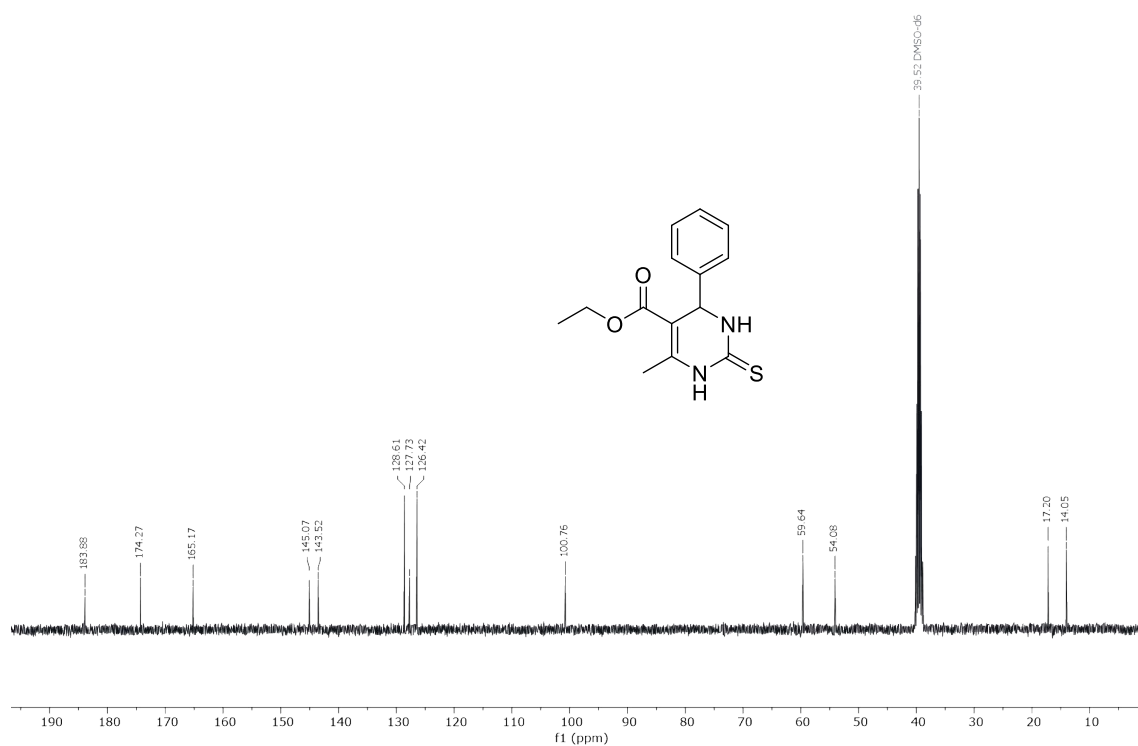


Figura S10 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABS-a.

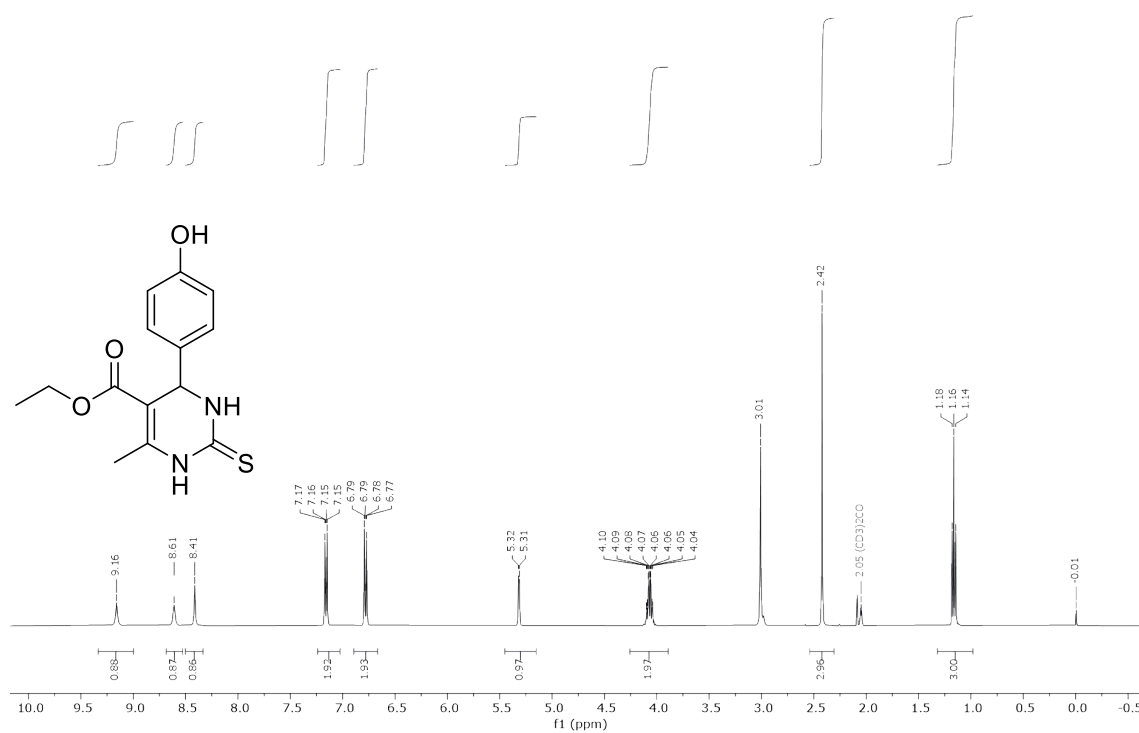


Figura S11 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, acetona-*d*₆) do composto ABS-b.

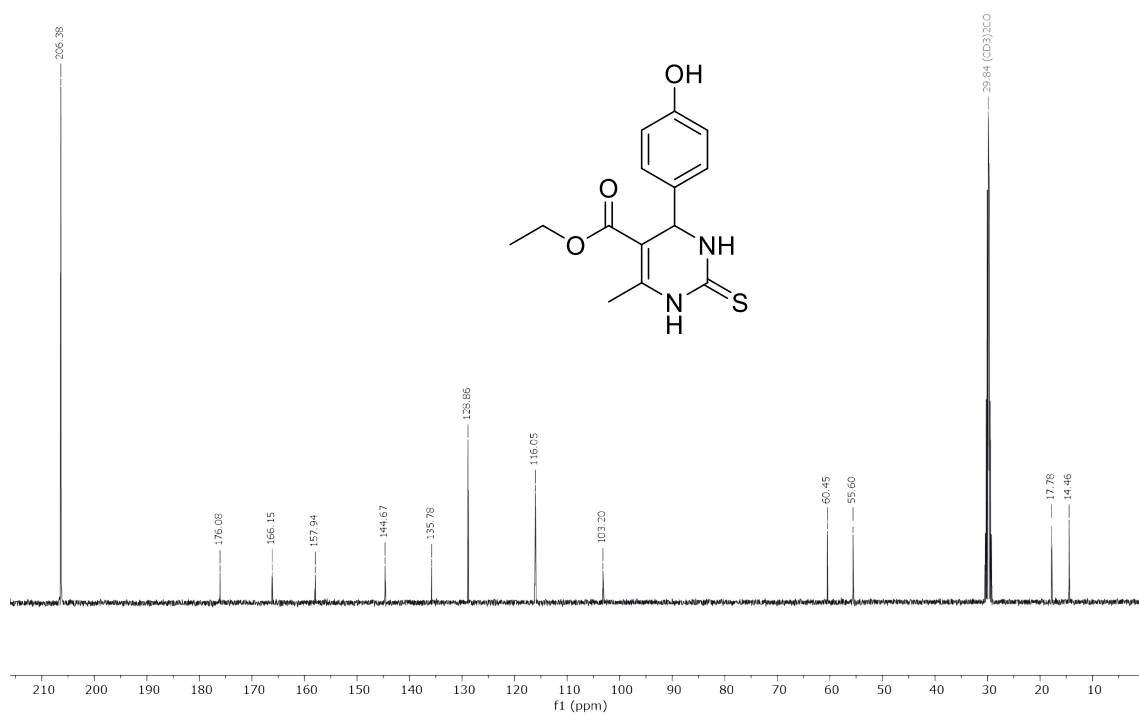


Figura S12 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, acetona-*d*₆) do composto ABS-b.

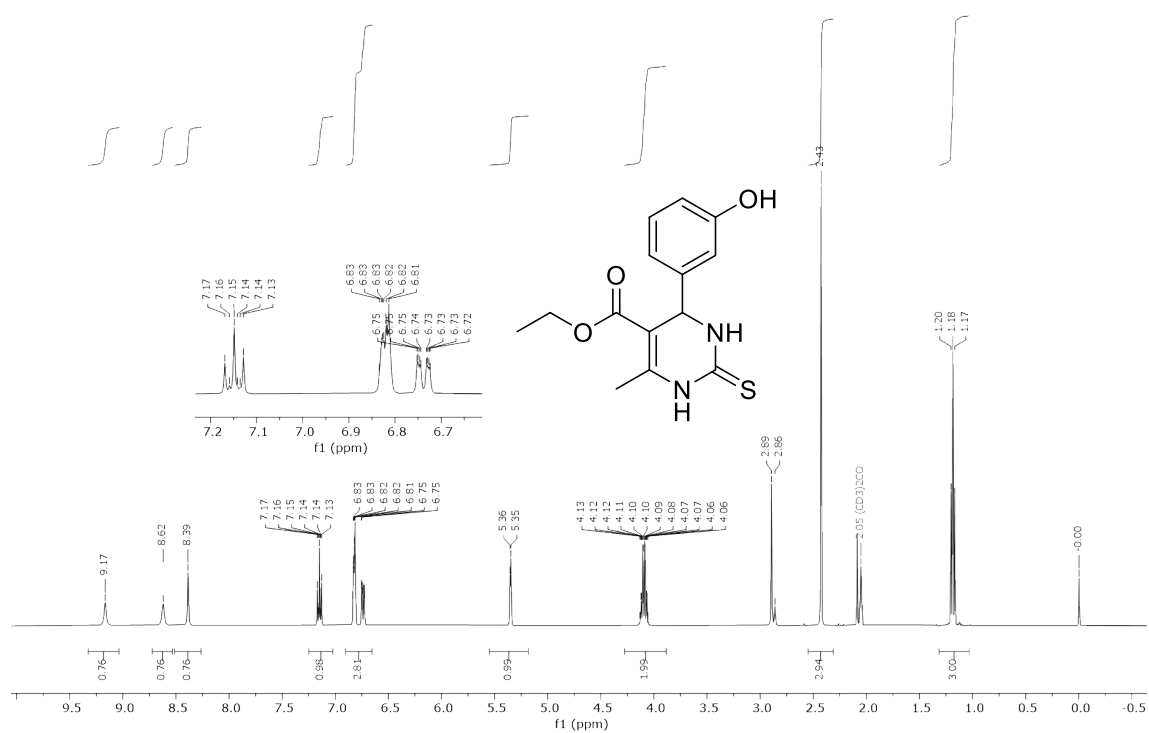


Figura S13 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, acetona-*d*₆) do composto ABS-c.

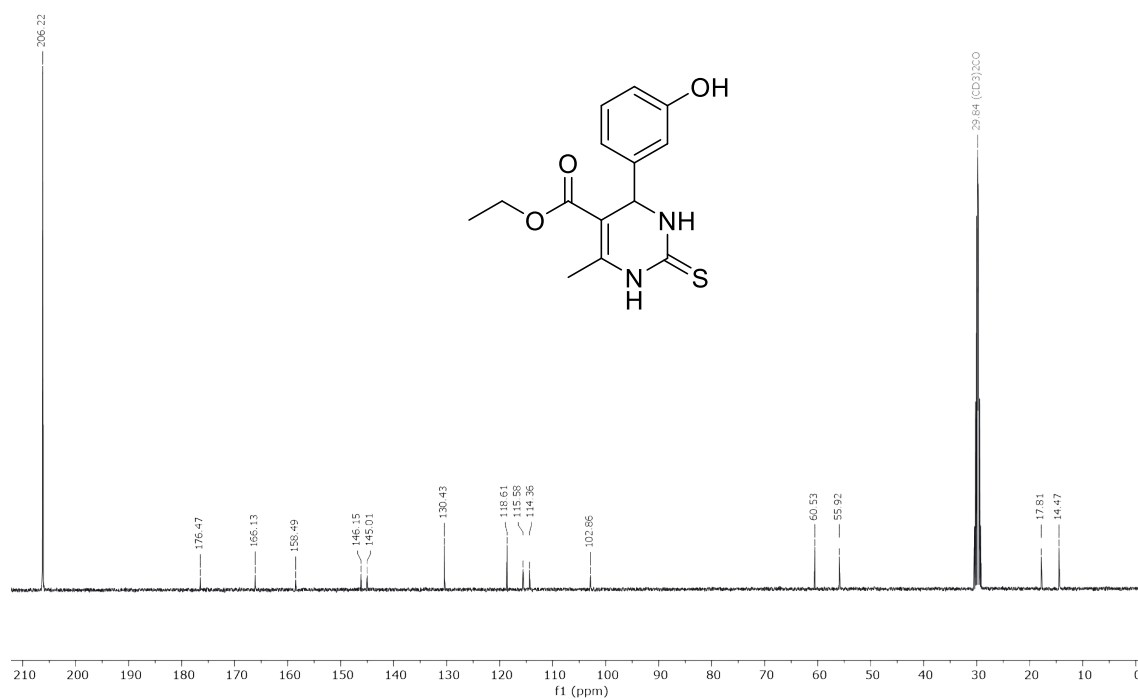


Figura S14 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, acetona-*d*₆) do composto ABS-c.

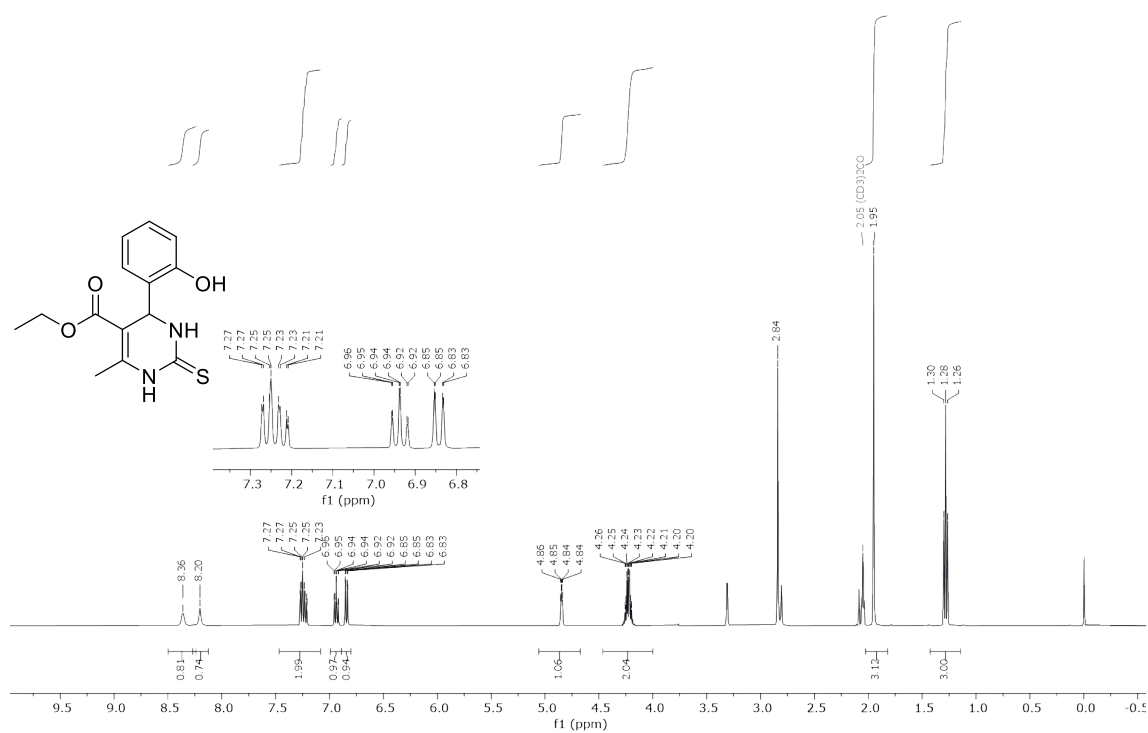


Figura S15 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, acetona-*d*₆) do composto ABS-d.

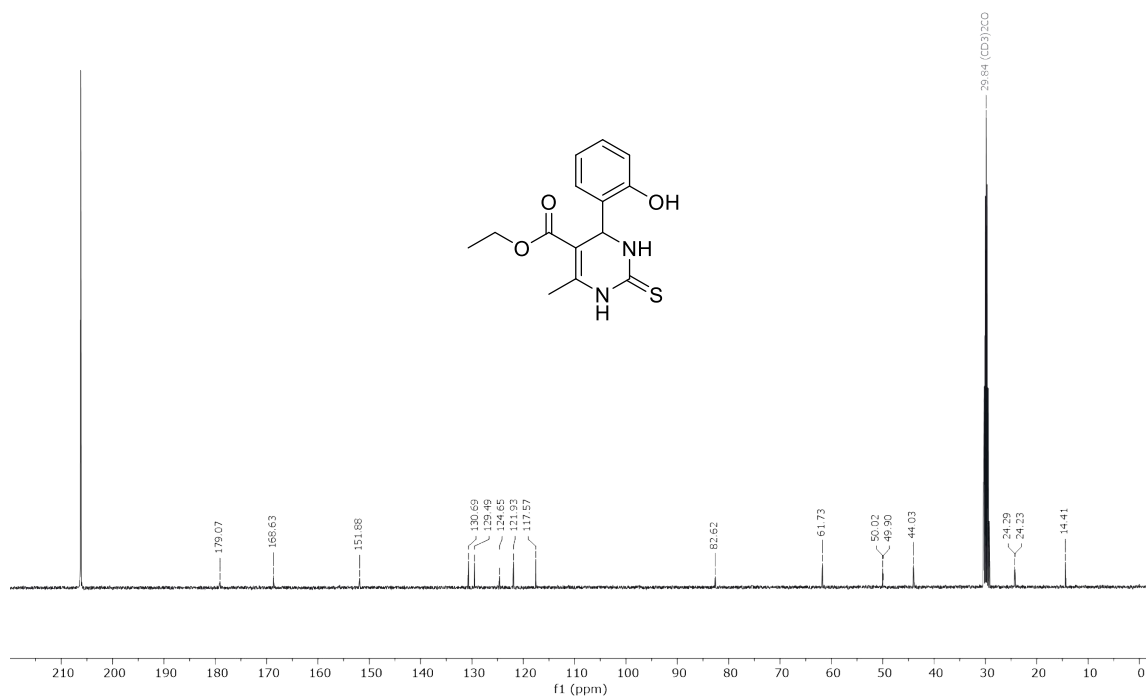


Figura S16 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, acetona-*d*₆) do composto ABS-d.

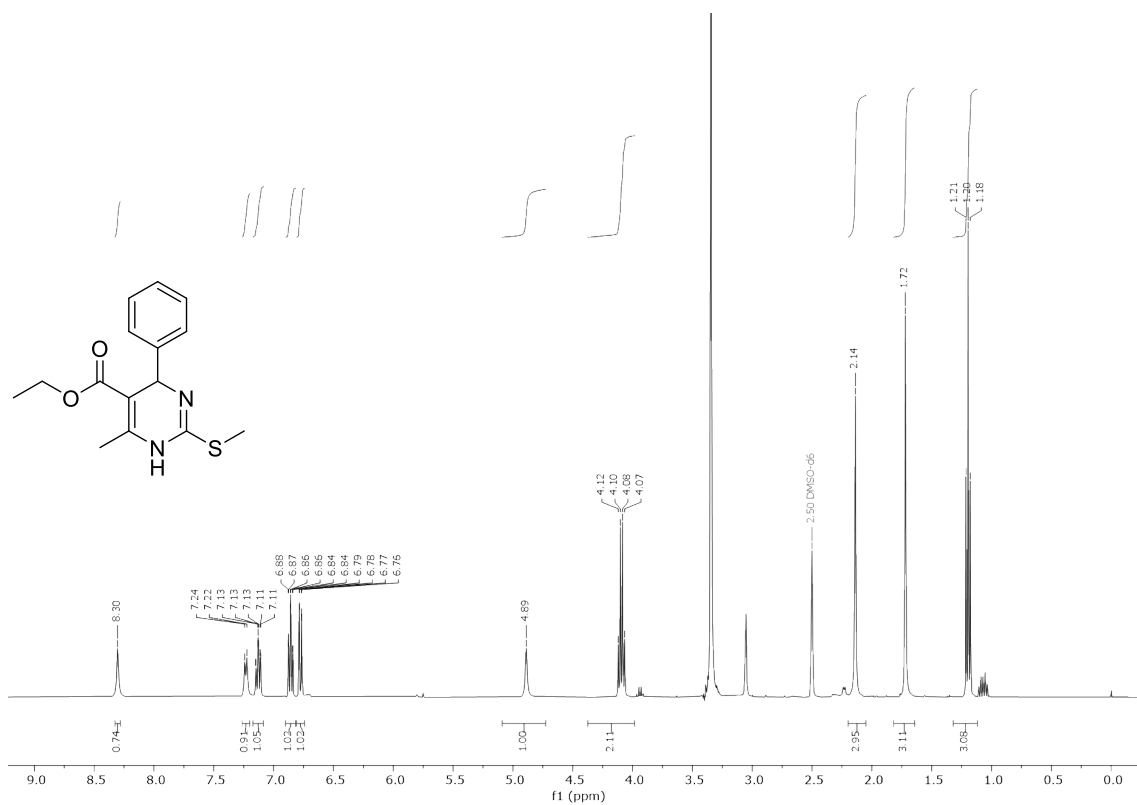


Figura S17 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABSMe-a.

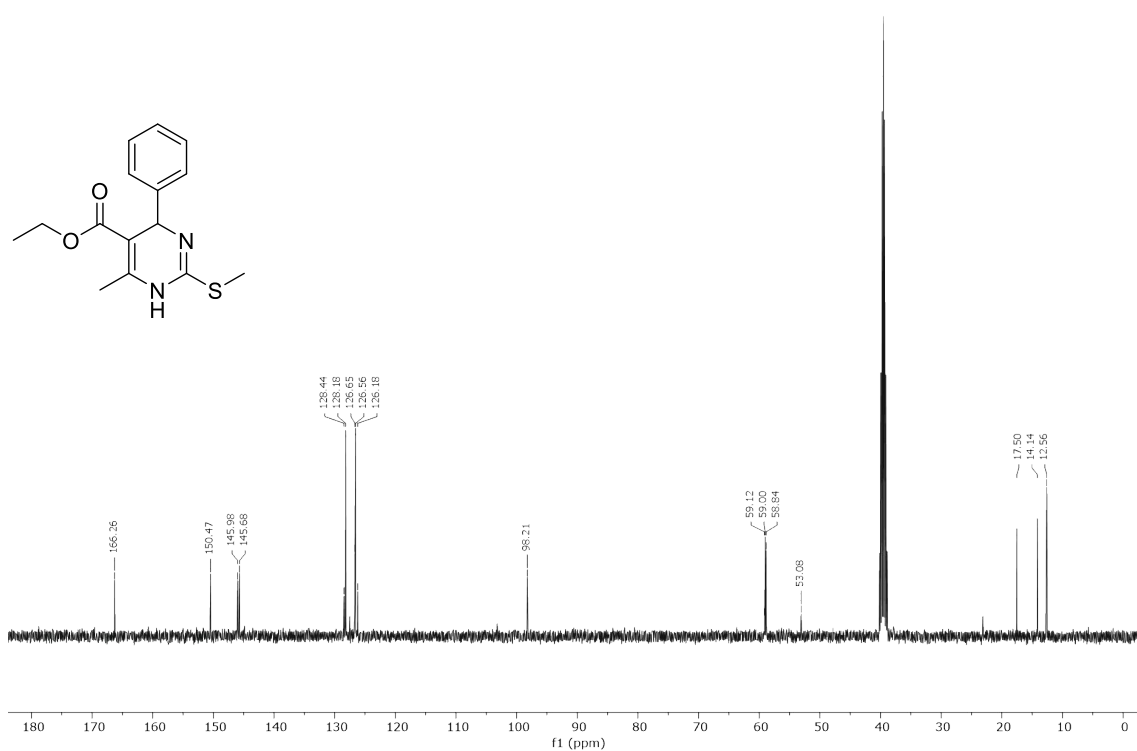


Figura S18 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABSMe-a.

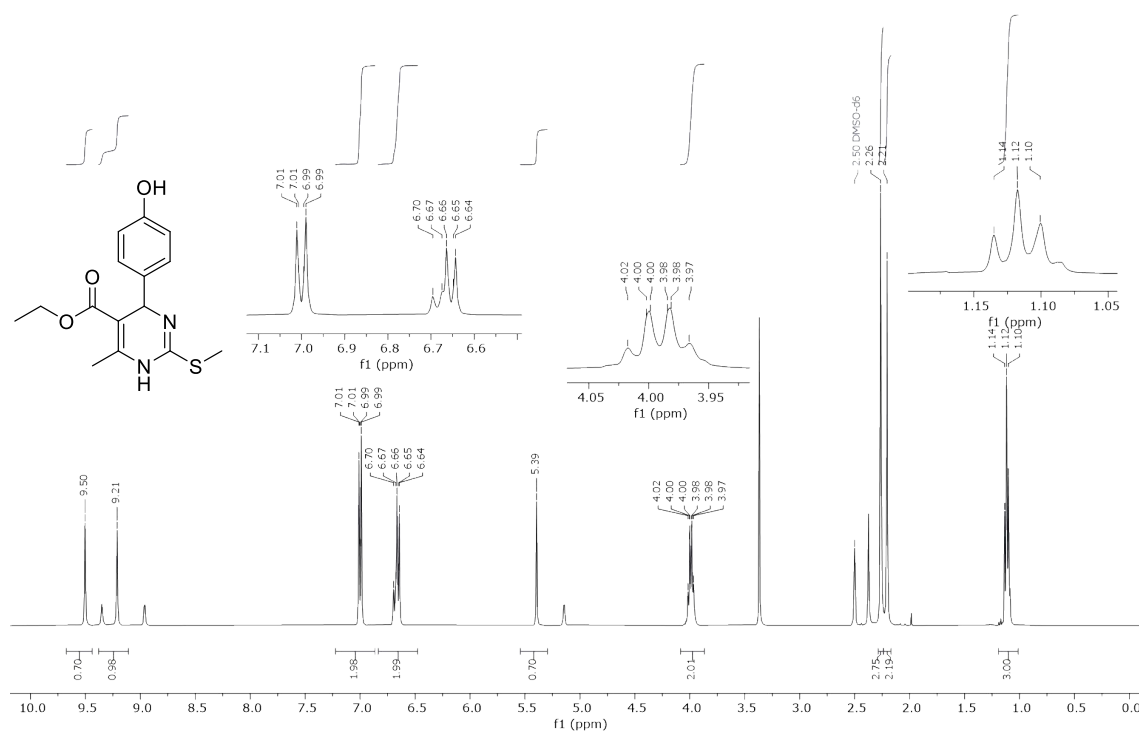


Figura S19 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABSMe-b.

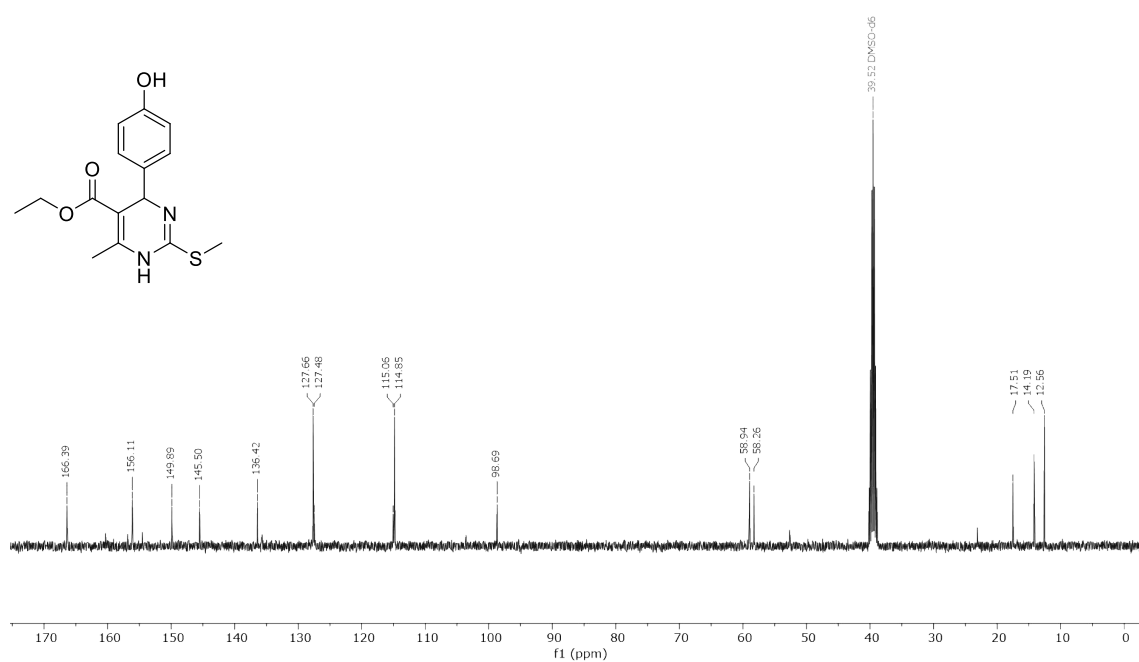


Figura S20 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABSMe-b.

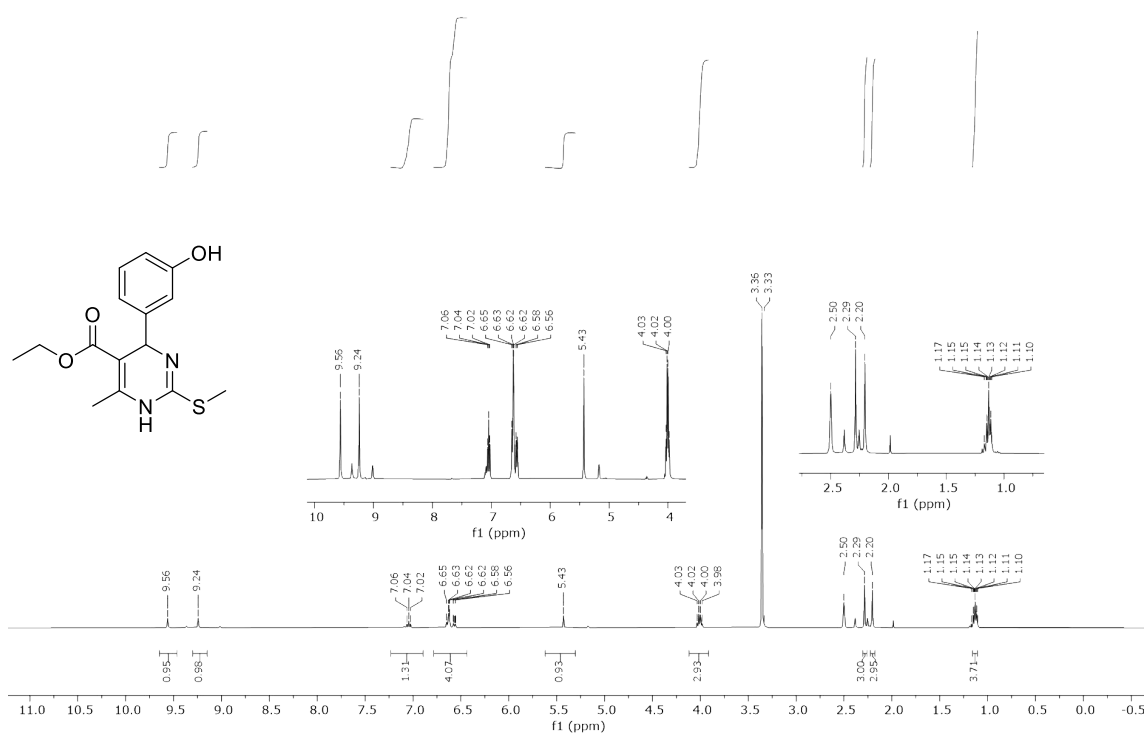


Figura S21 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABSMe-c.

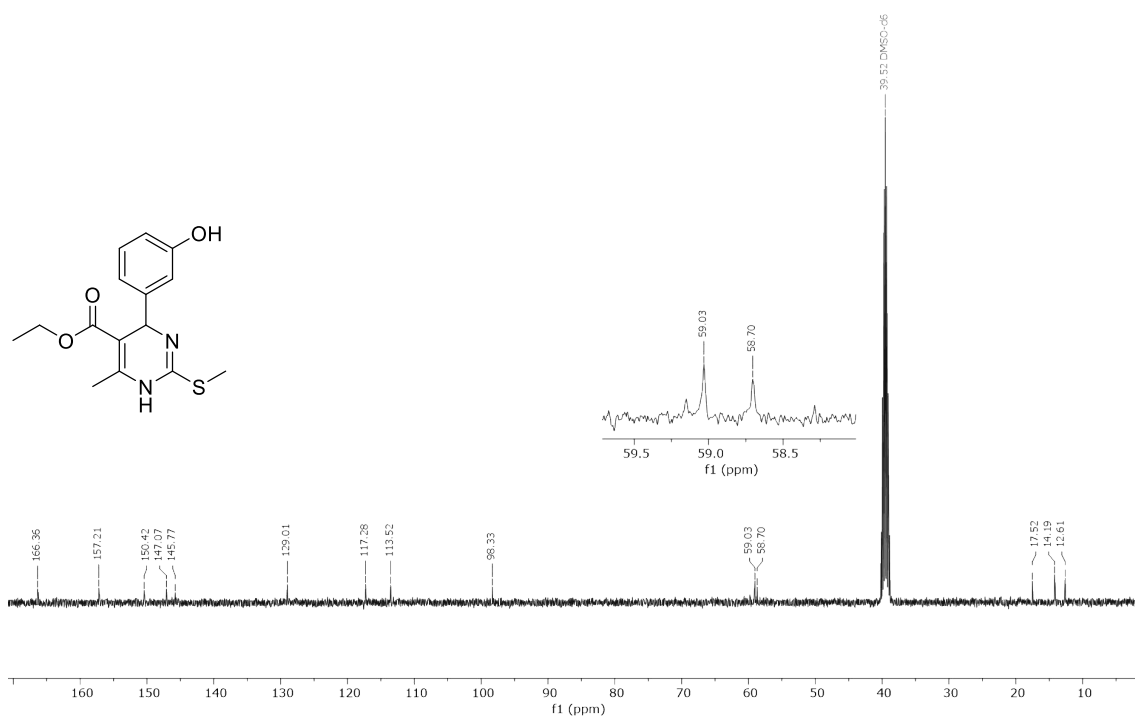


Figura S22 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABSMe-c.

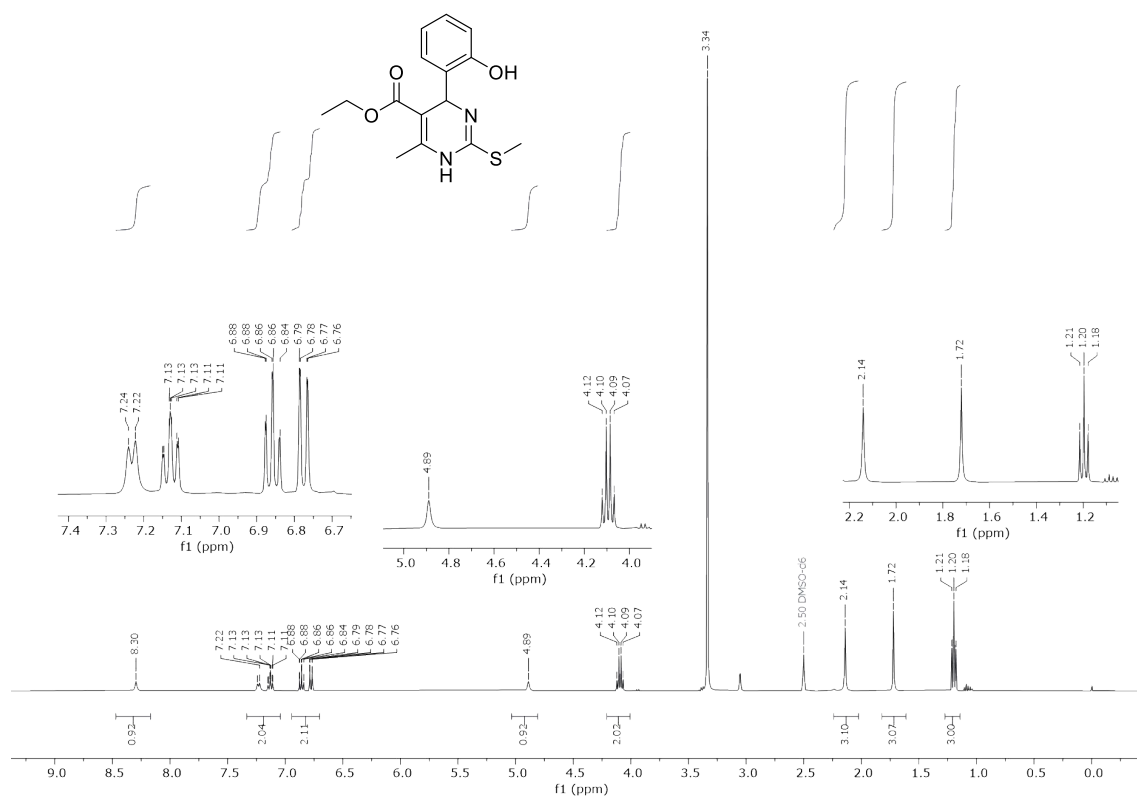


Figura S23 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABSMe-d.

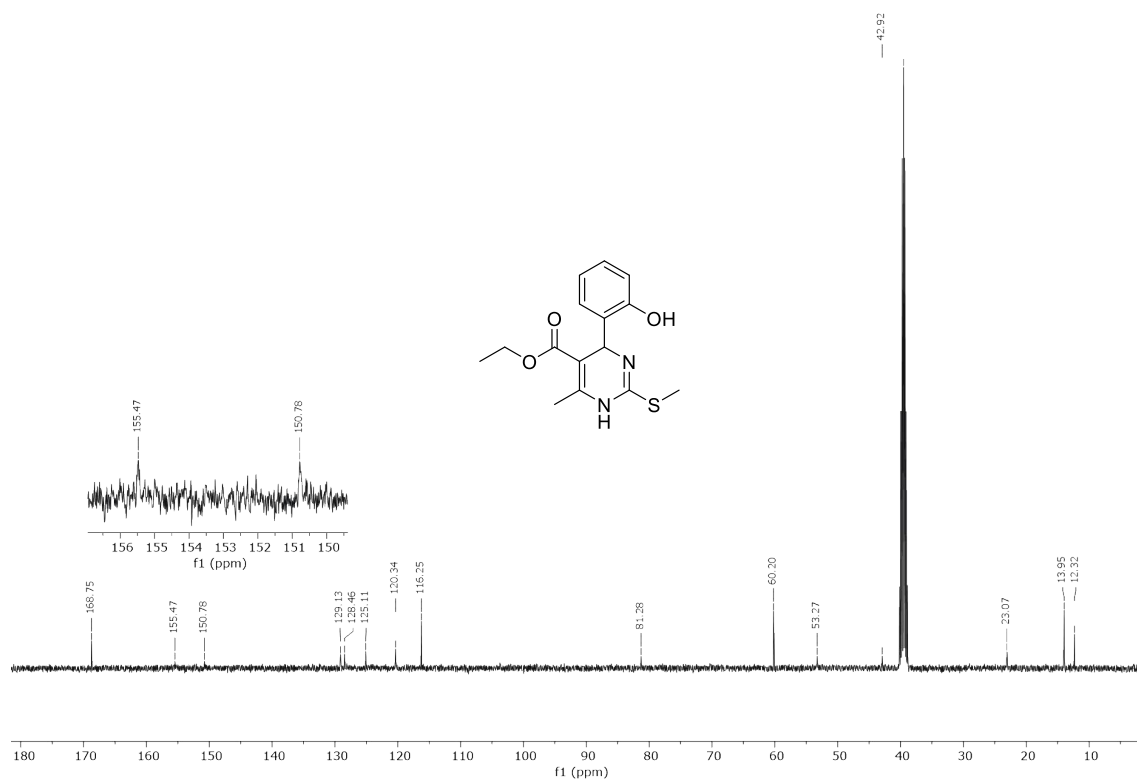


Figura S24 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABSMe-d.

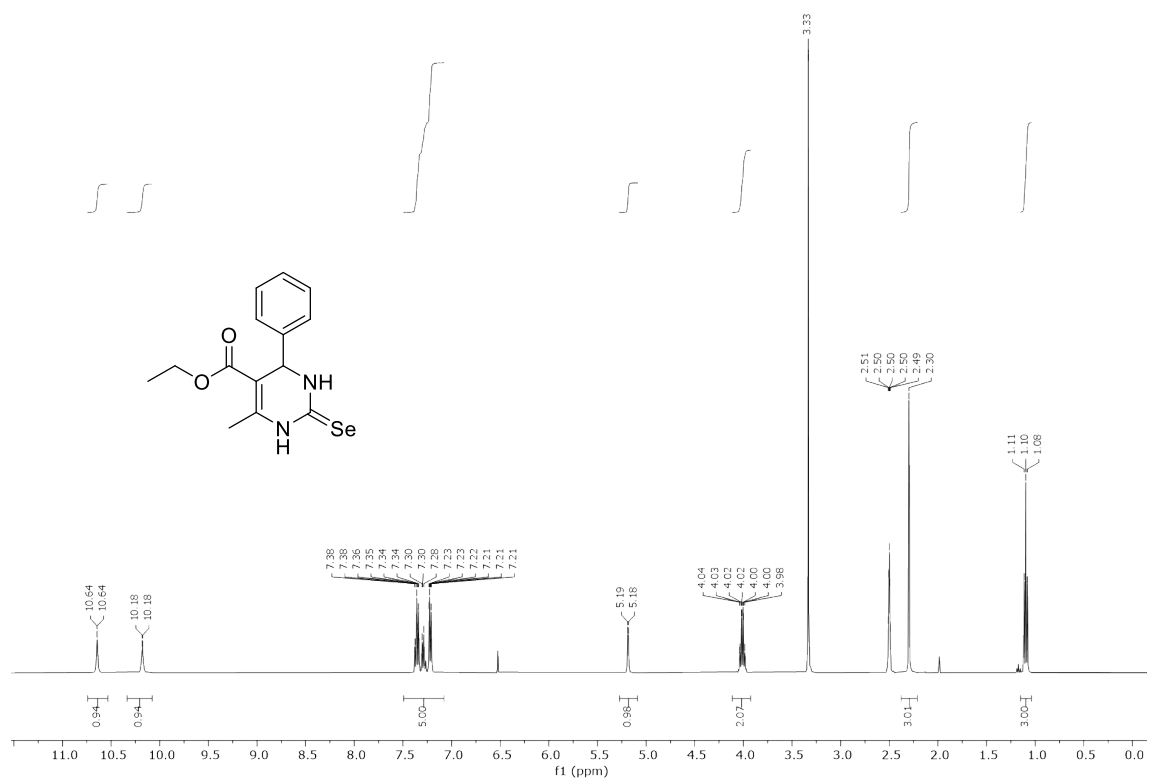


Figura S25 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABSe-a.

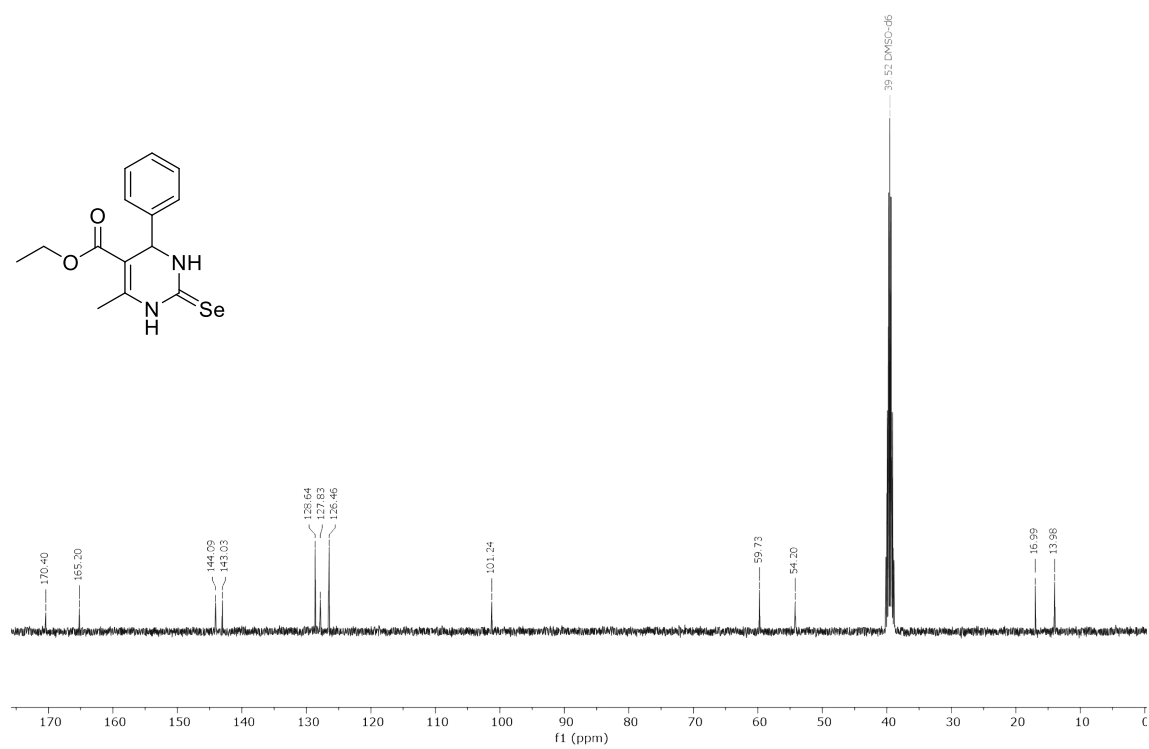


Figura S26 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABSe-a.

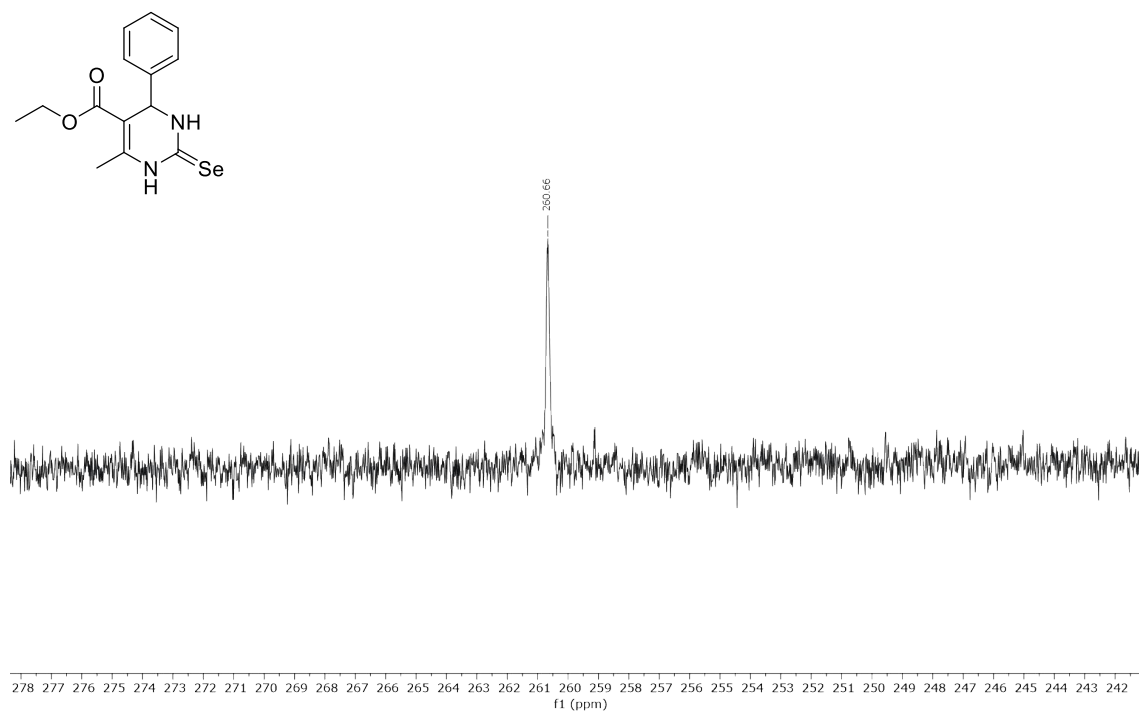


Figura S27 – Espectro de RMN de ^{77}Se (51,5 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto ABSe-a.

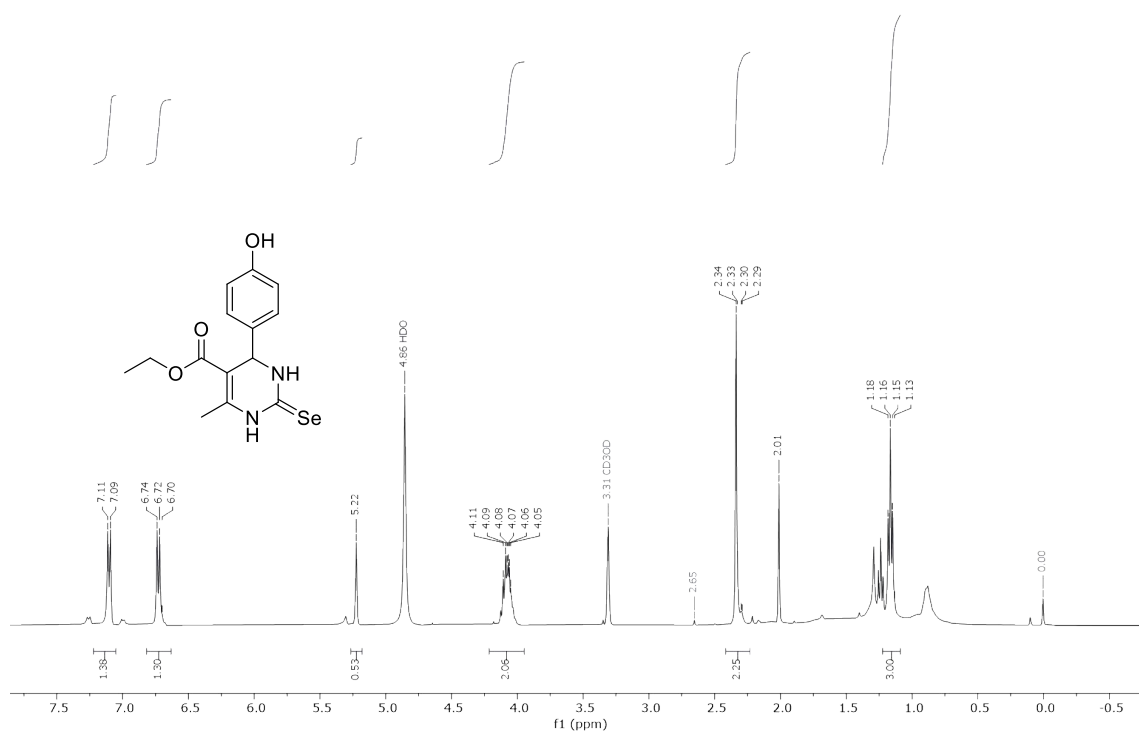


Figura S28 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto ABSe-b.

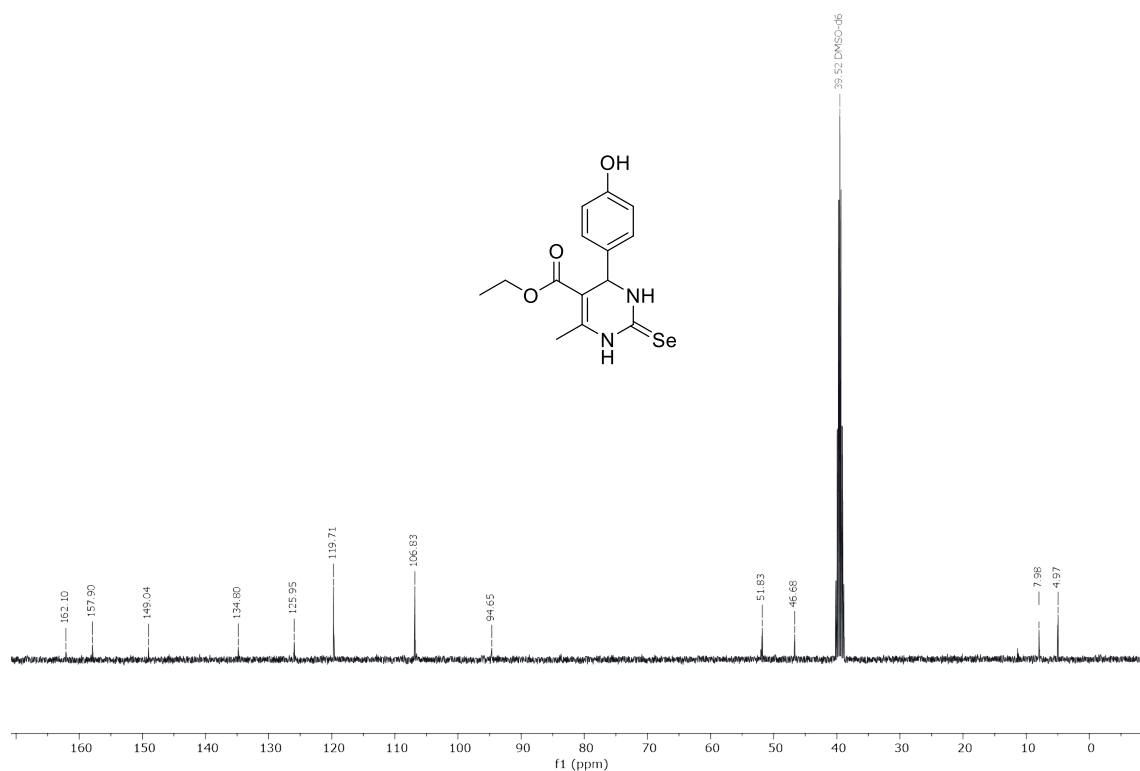


Figura S29 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABSe-b.

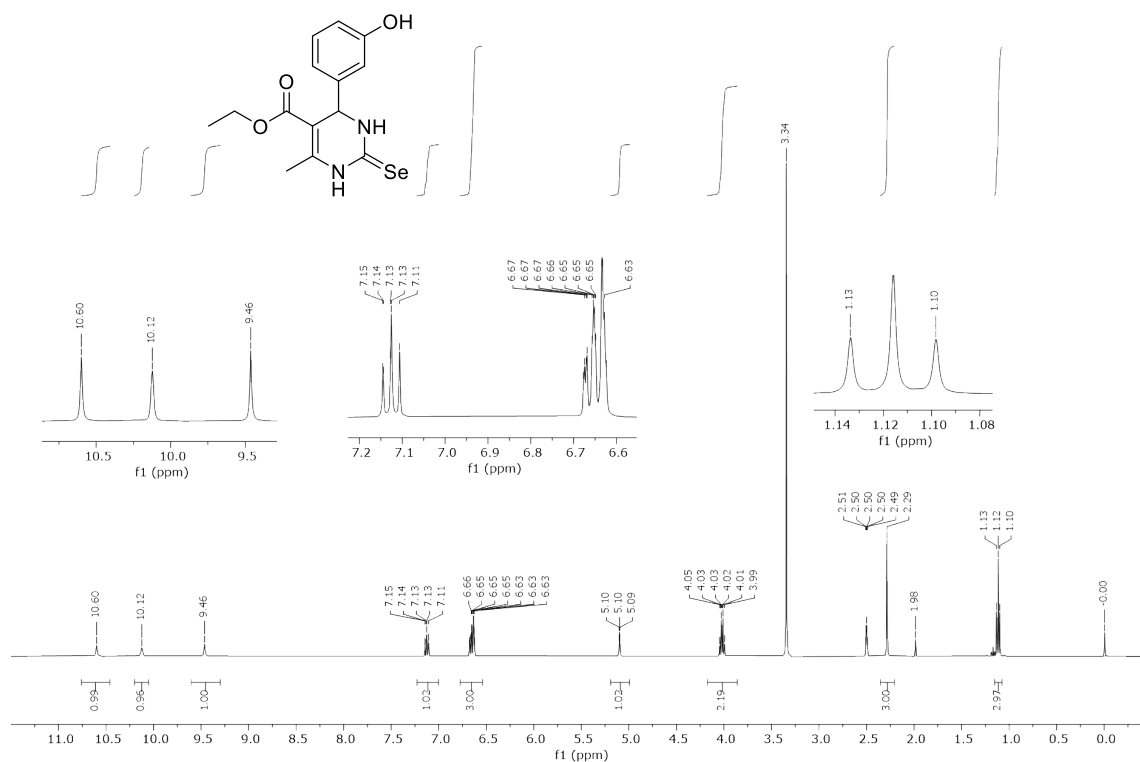


Figura S30 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABSe-c.

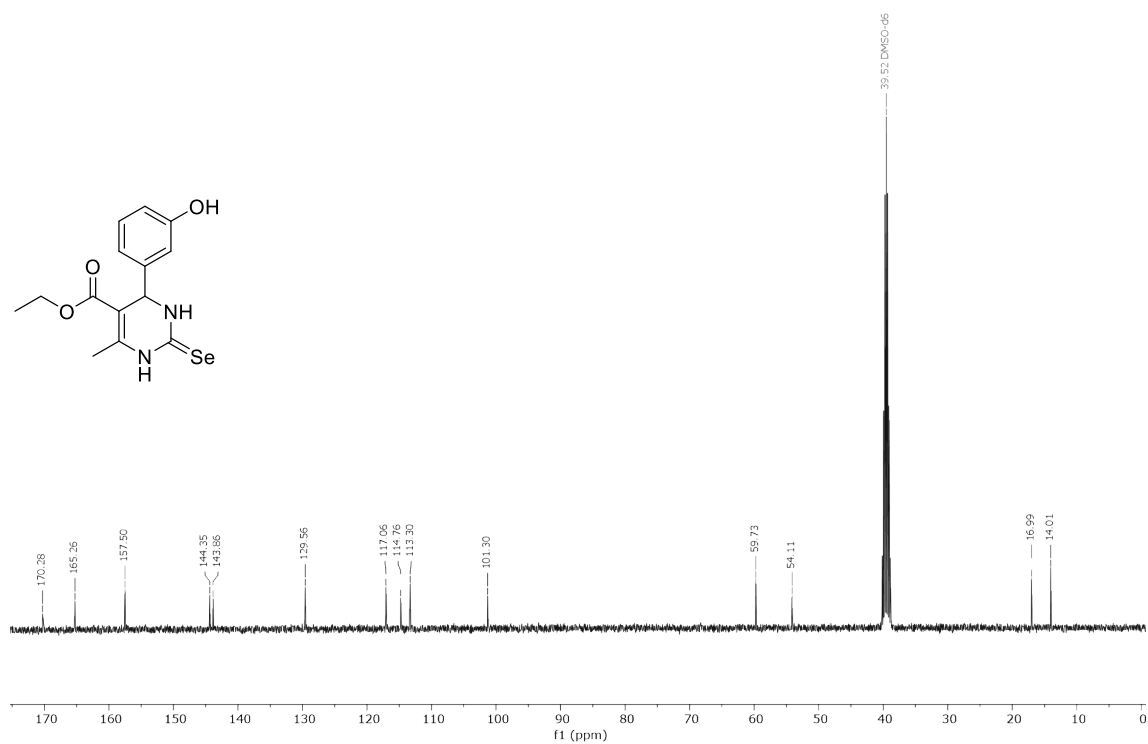


Figura S31 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABSe-c.

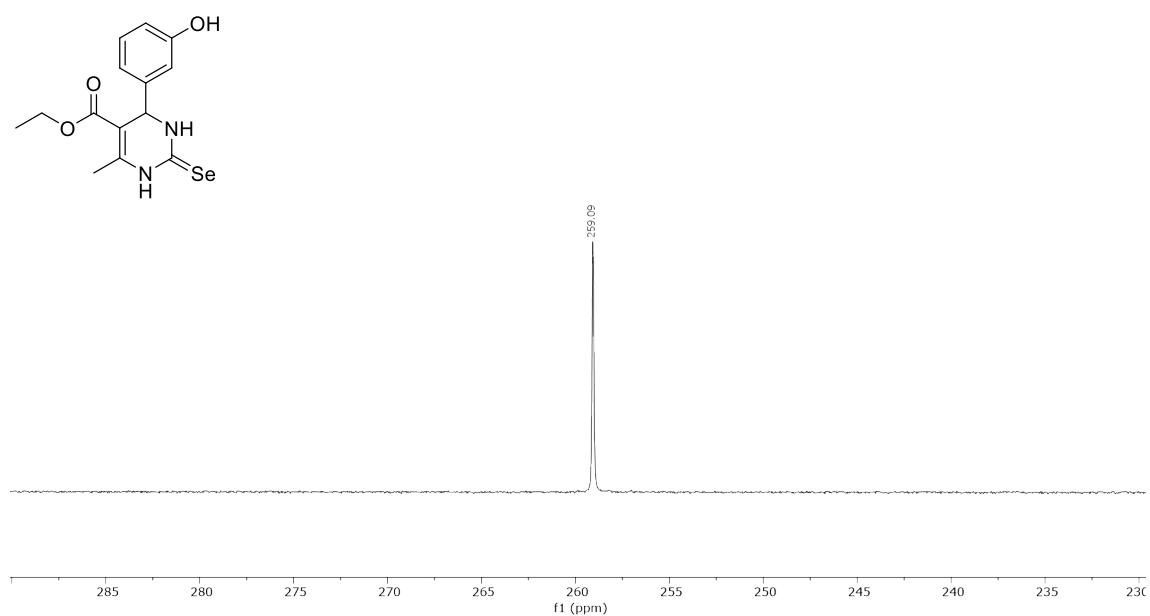


Figura S32 – Espectro de RMN de ⁷⁷Se (51,5 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABSe-c.

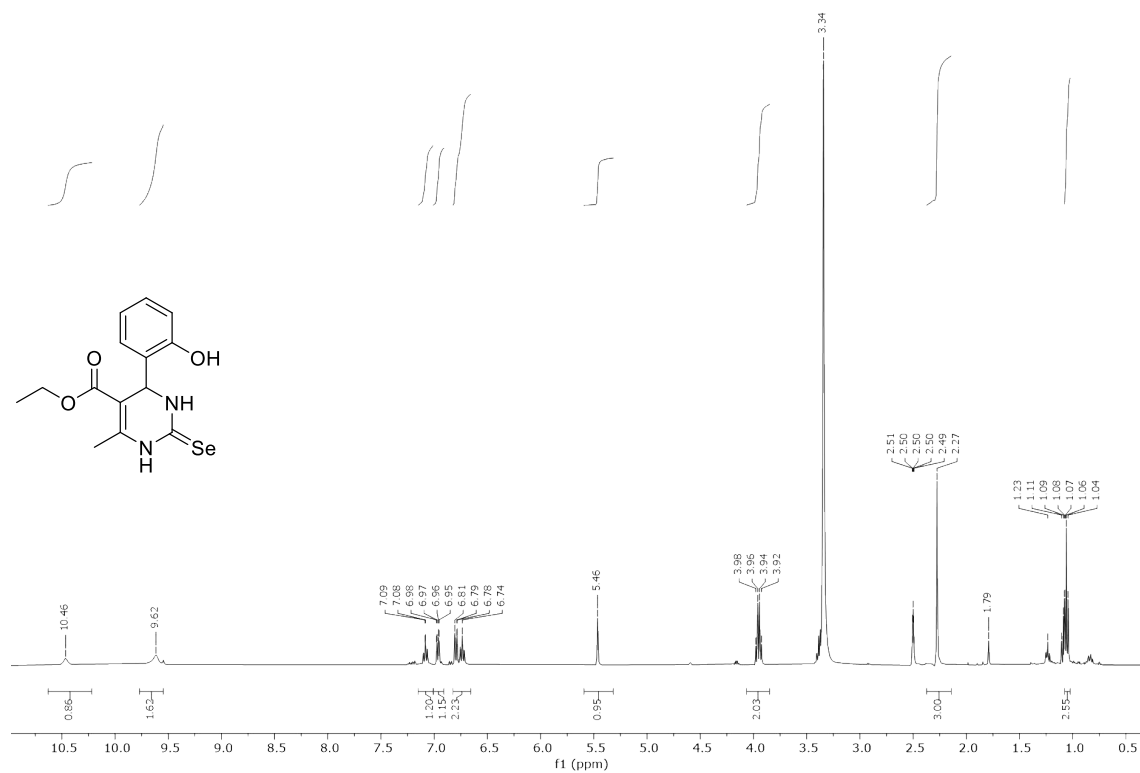


Figura S33 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABSe-d.

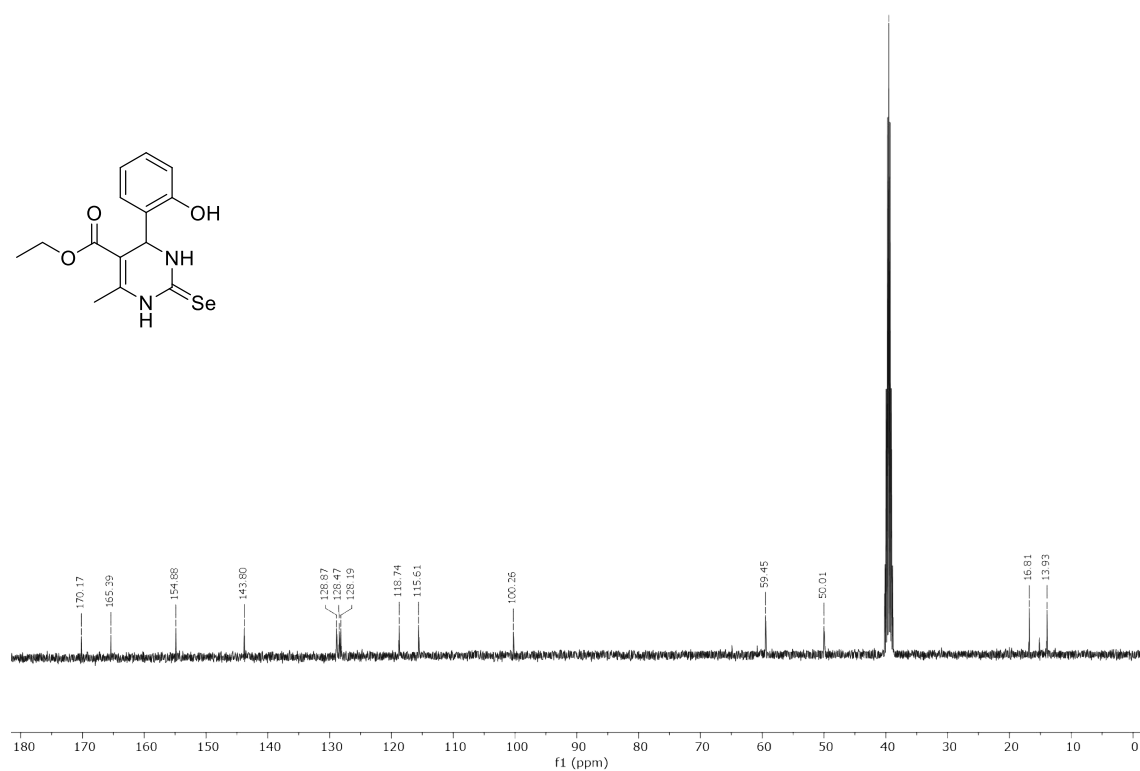


Figura S33 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto ABSe-d.

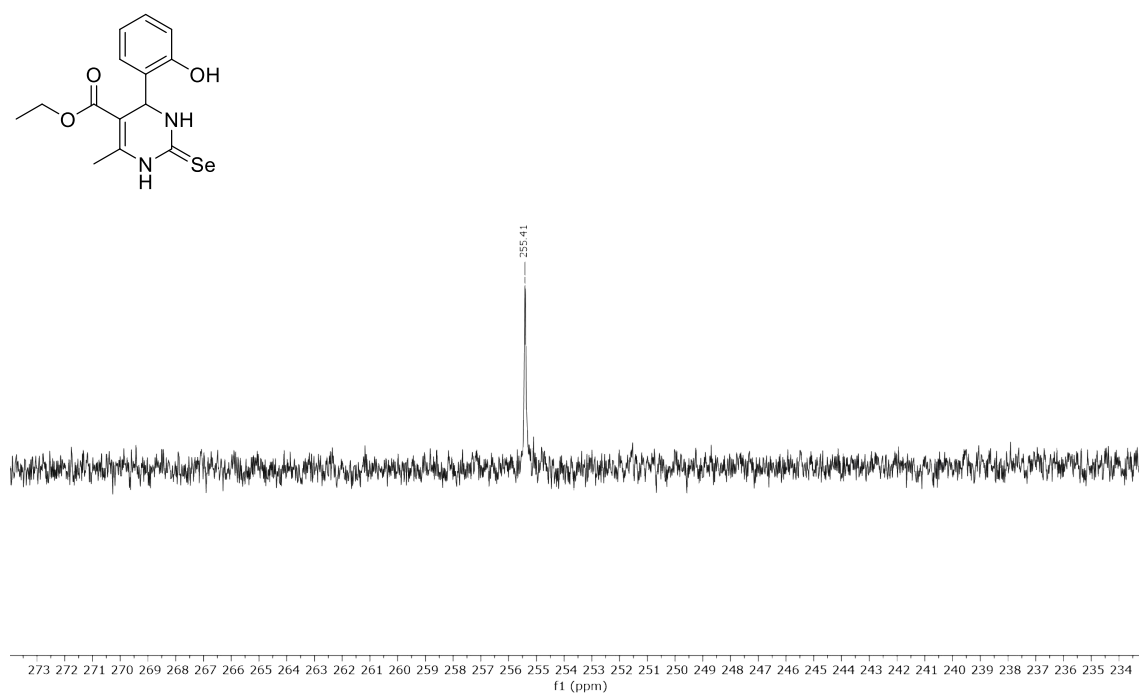


Figura S34 – Espectro de RMN de ^{77}Se (51,5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto ABSe-d.

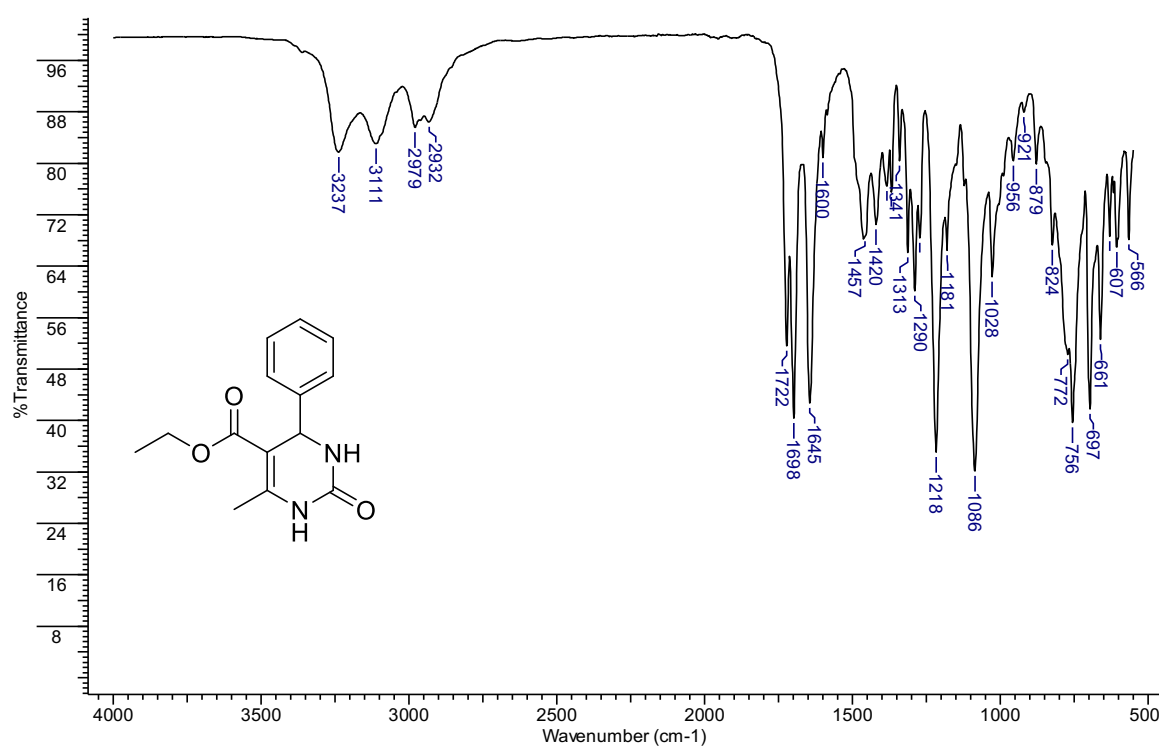


Figura S35 – Espectro na região de infravermelho do composto ABO-a.

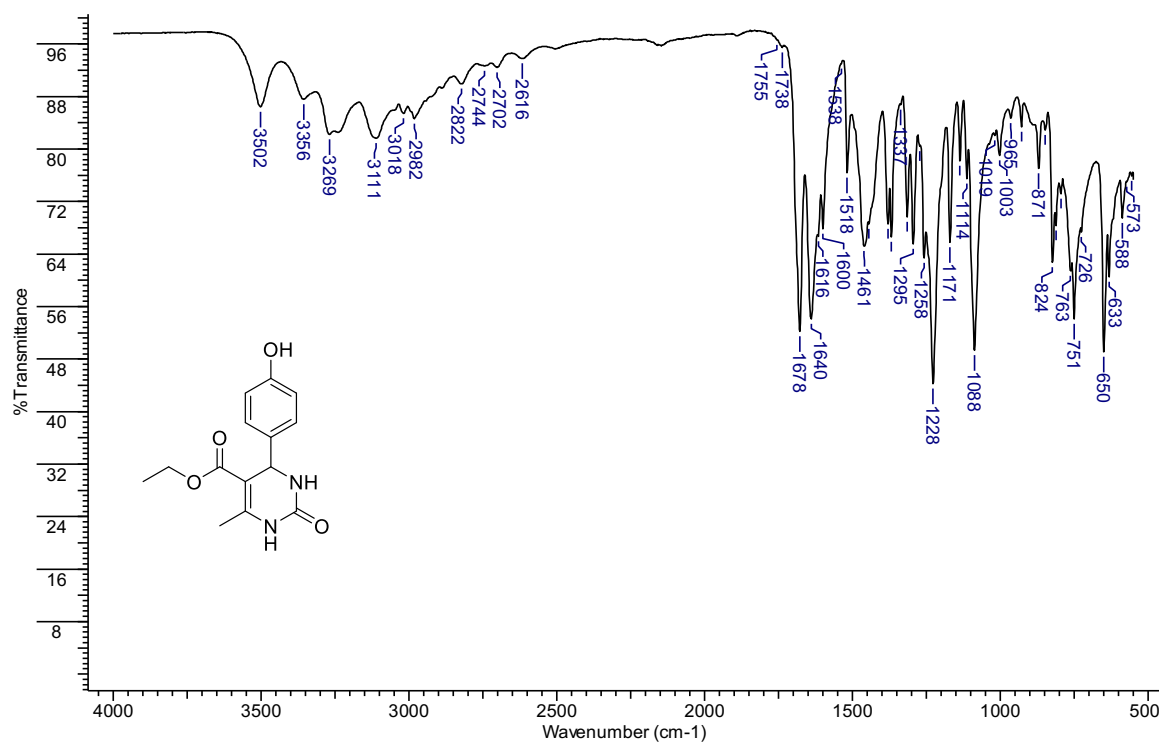


Figura S36 – Espectro na região de infravermelho do composto ABO-b.

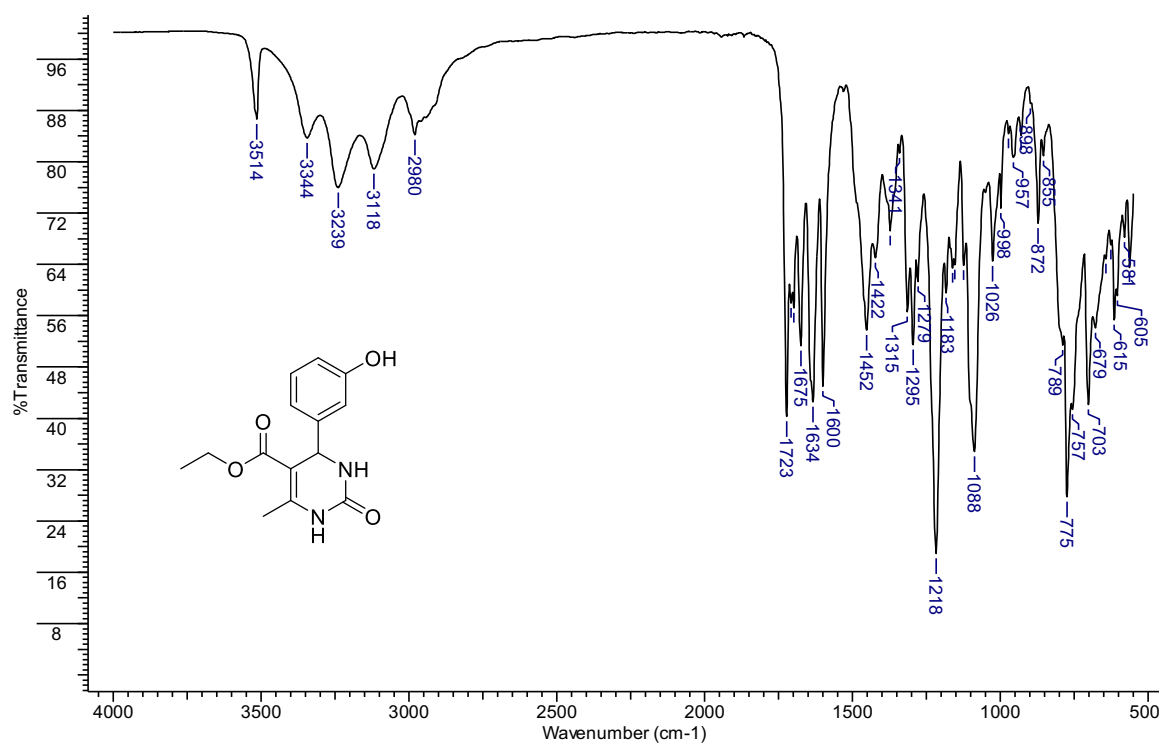


Figura S37 – Espectro na região de infravermelho do composto ABO-c.

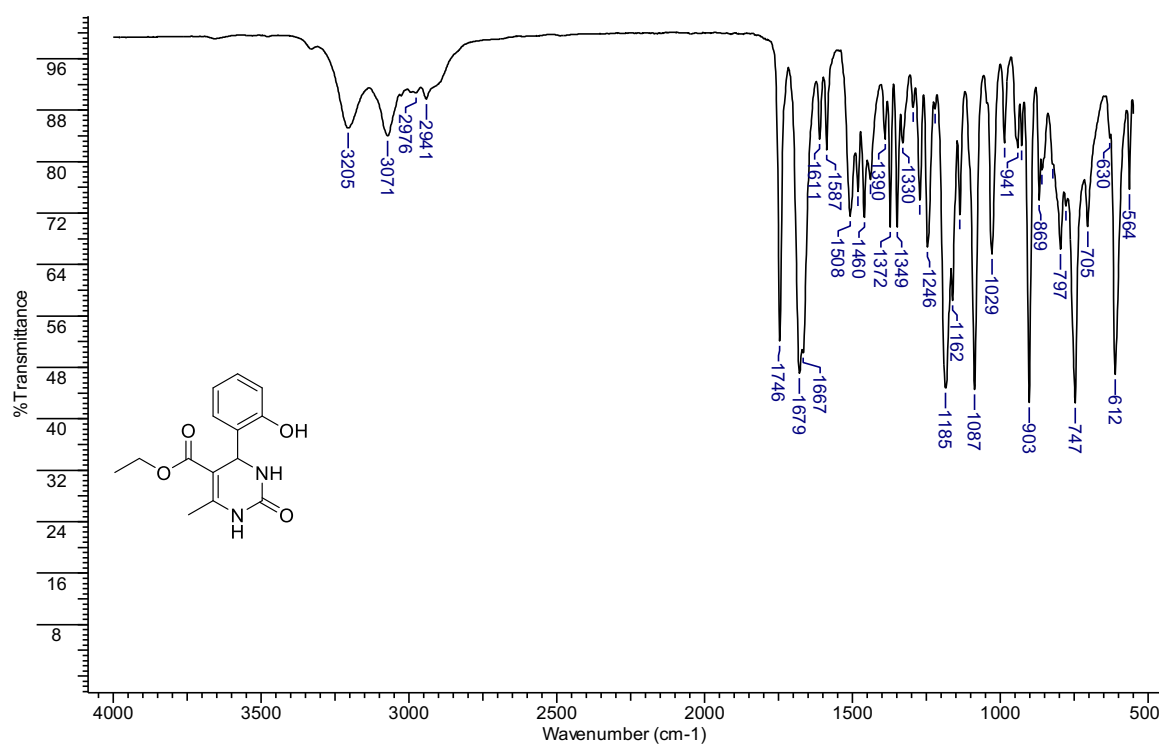


Figura S38 – Espectro na região de infravermelho do composto ABO-d.

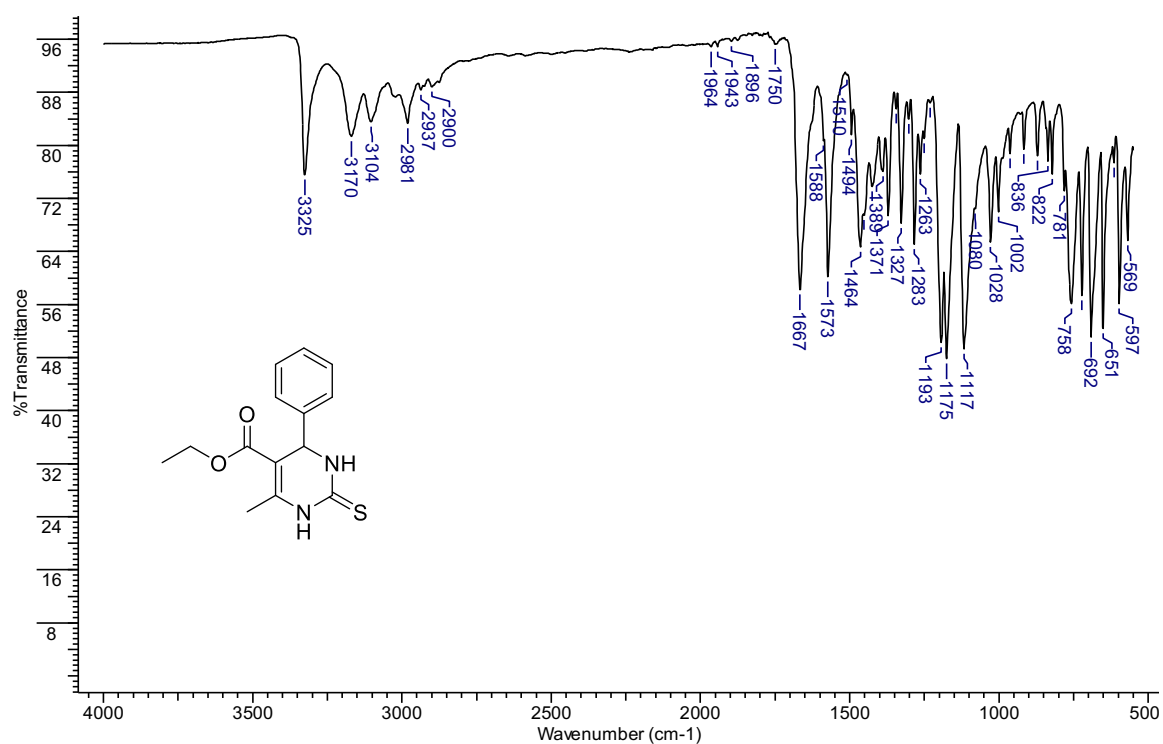


Figura S39 – Espectro na região de infravermelho do composto ABS-a.

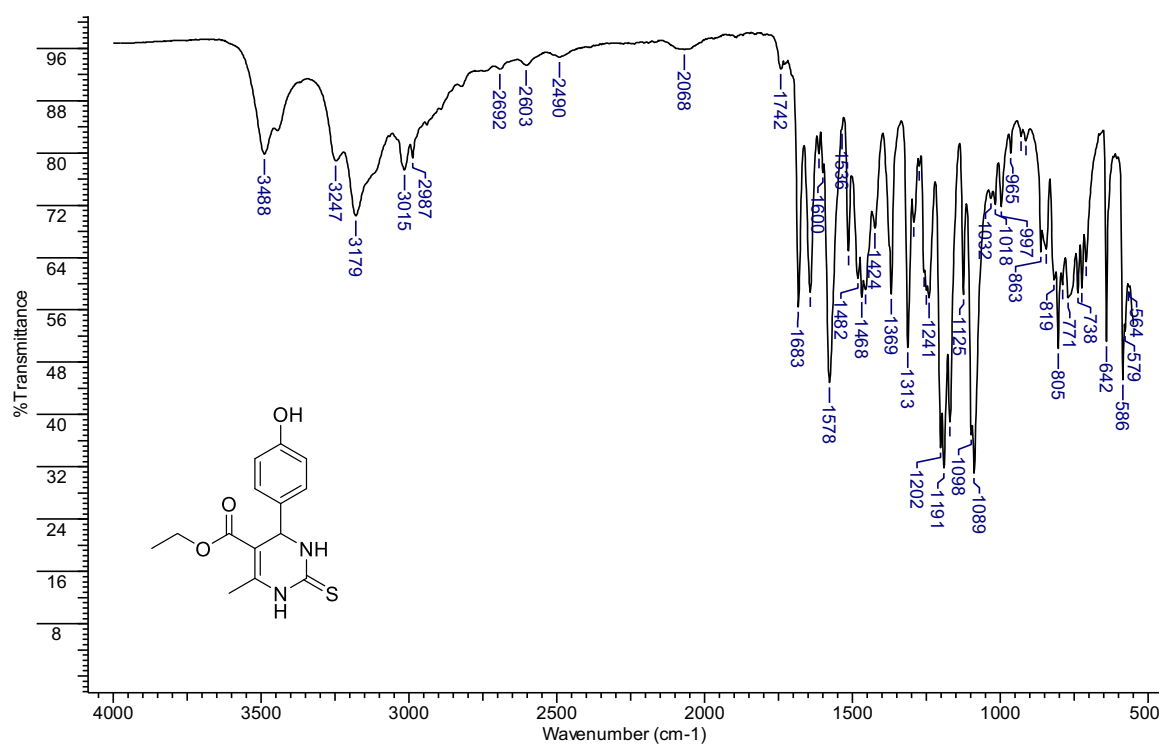


Figura S40 – Espectro na região de infravermelho do composto ABS-b.

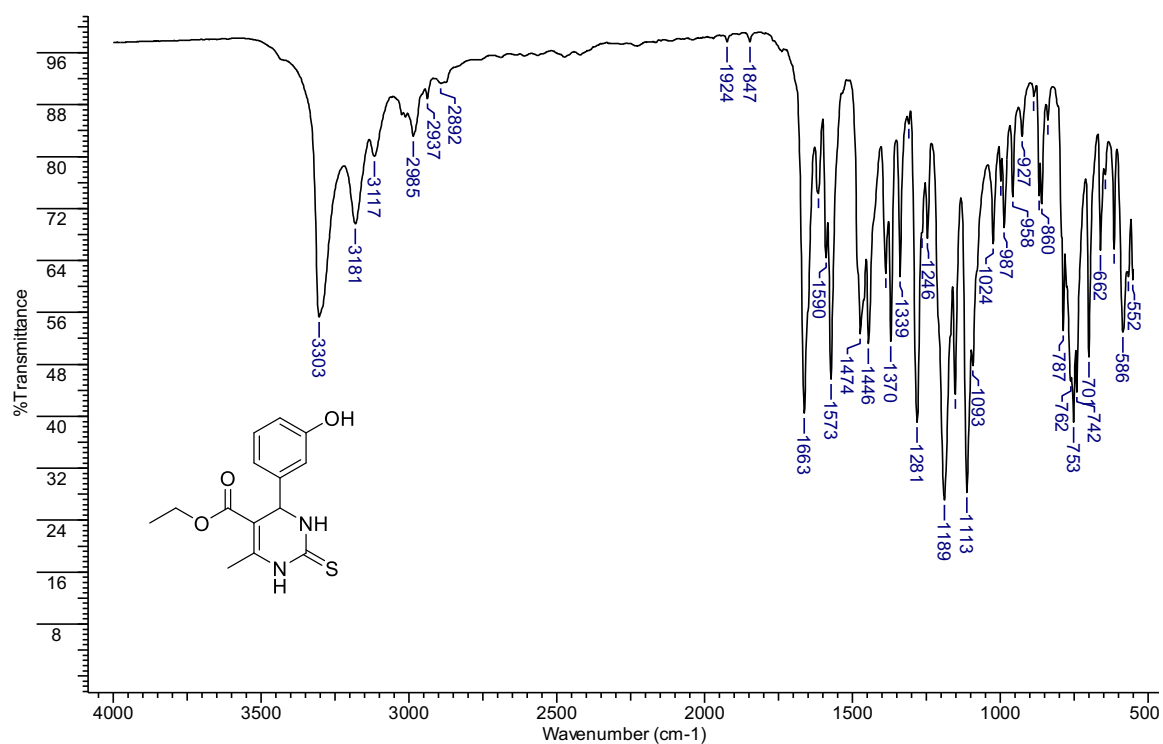


Figura S41 – Espectro na região de infravermelho do composto ABS-c.

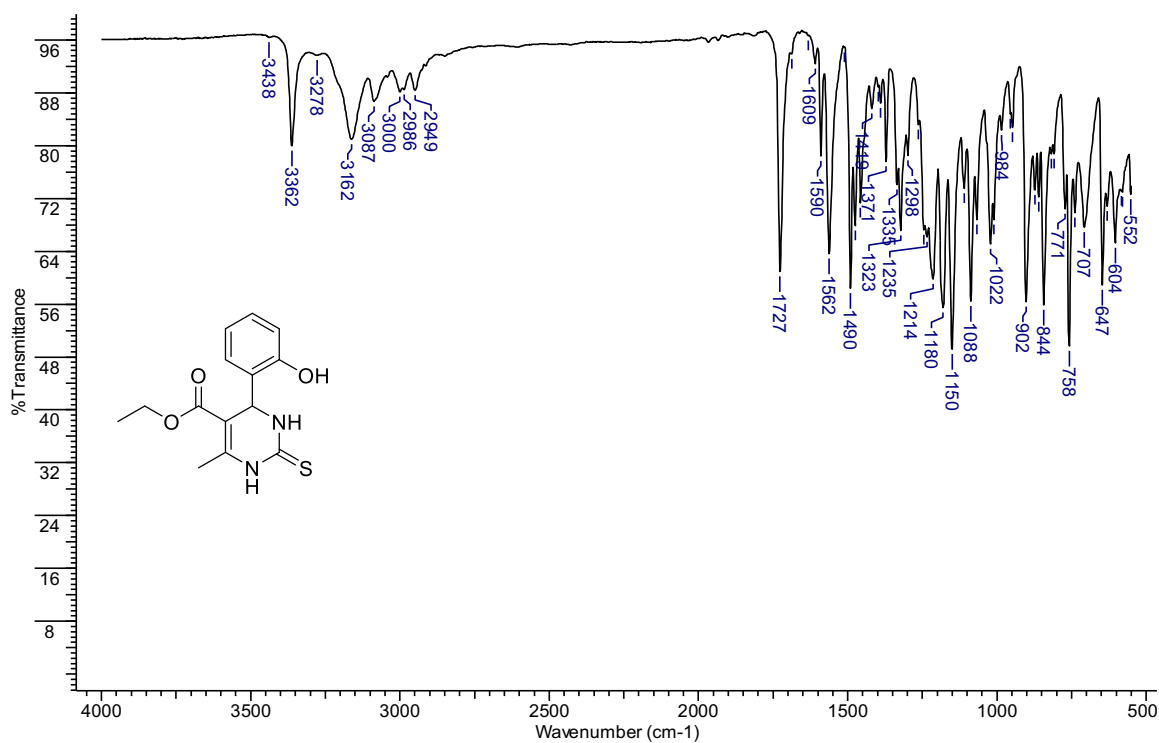


Figura S42 – Espectro na região de infravermelho do composto ABS-d.

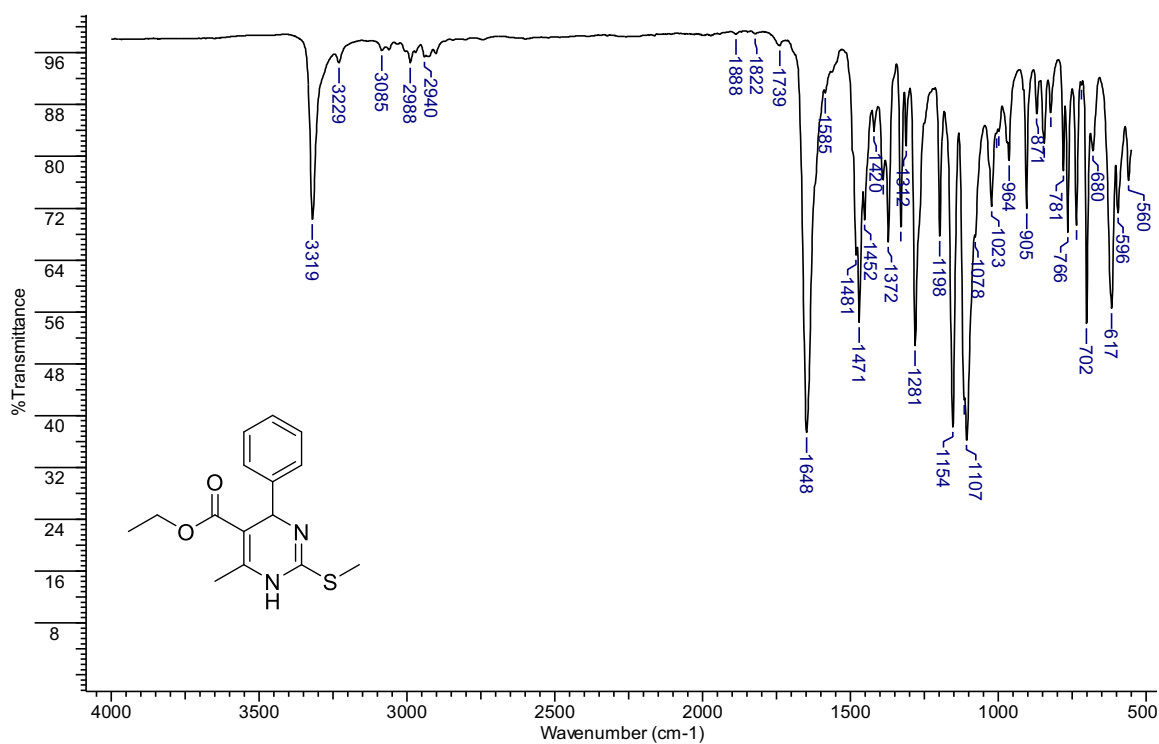


Figura S43 – Espectro na região de infravermelho do composto ABSMe-a.

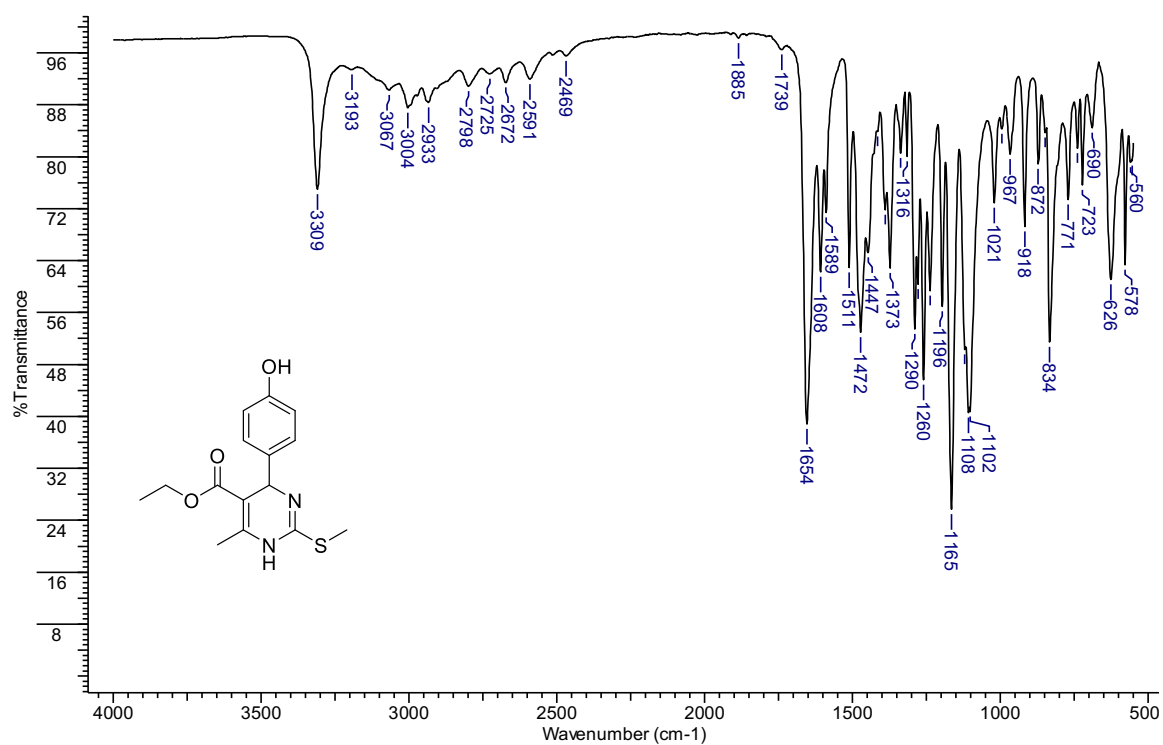


Figura S44 – Espectro na região de infravermelho do composto ABSMe-b.

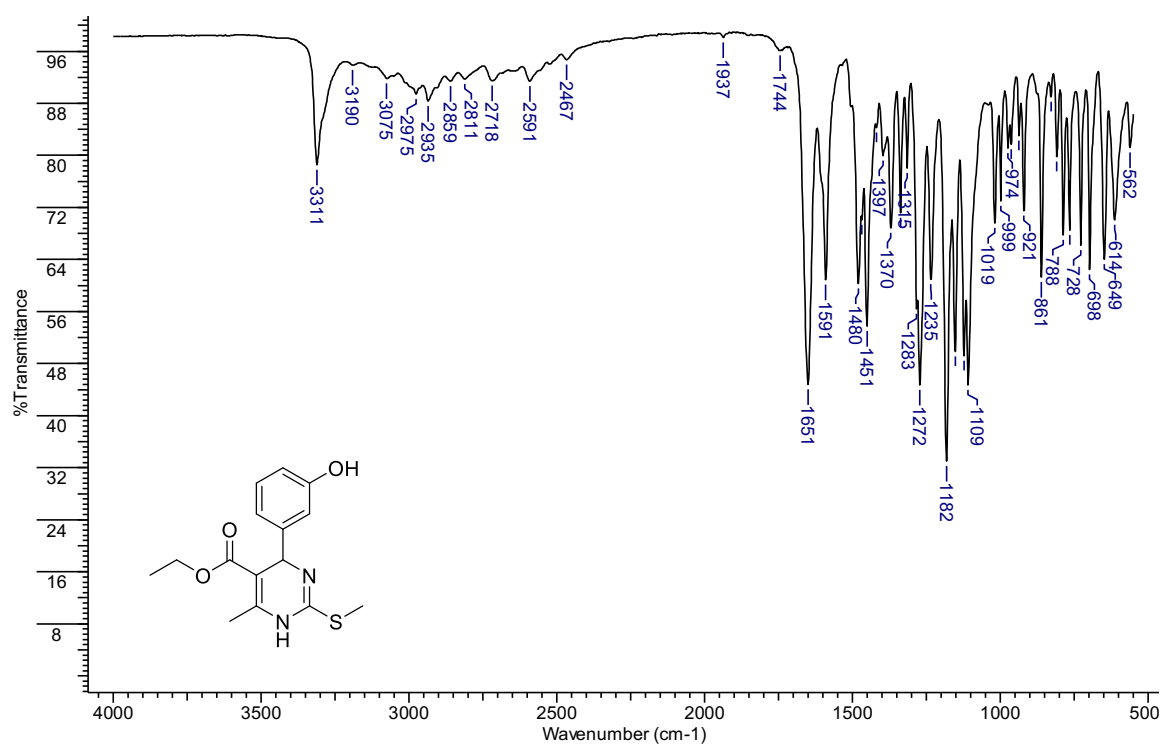


Figura S45 – Espectro na região de infravermelho do composto ABSMe-c.

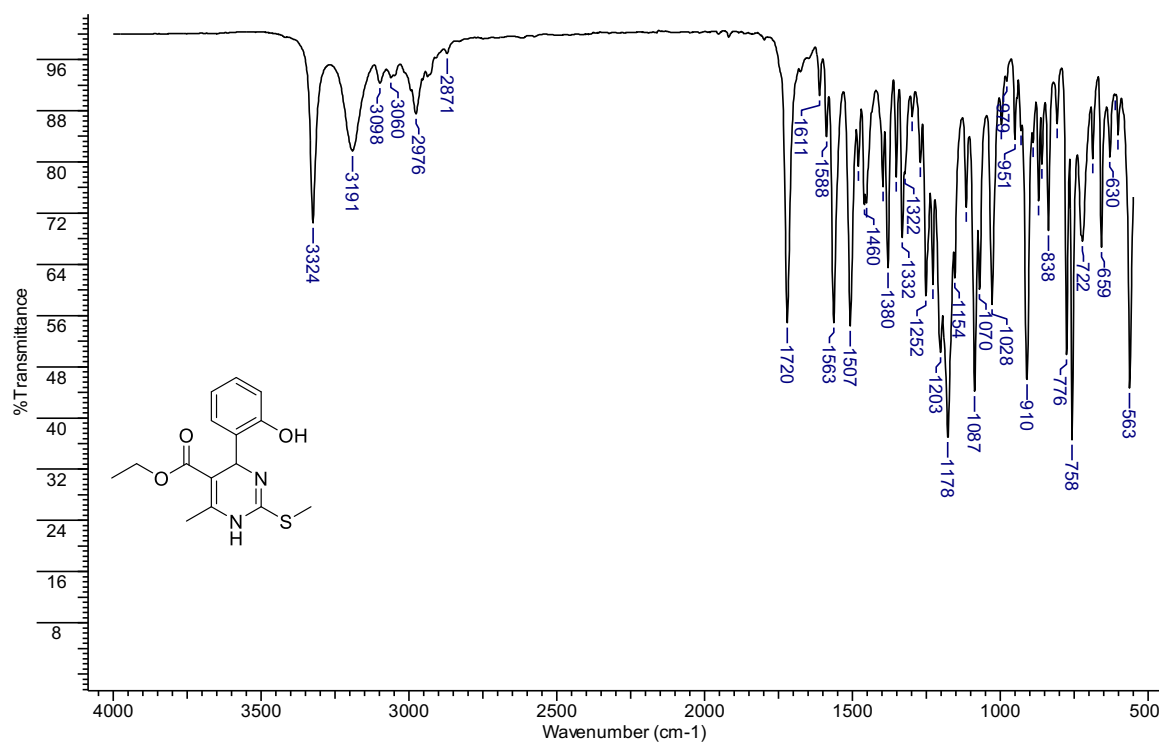


Figura S46 – Espectro na região de infravermelho do composto ABSMe-d.

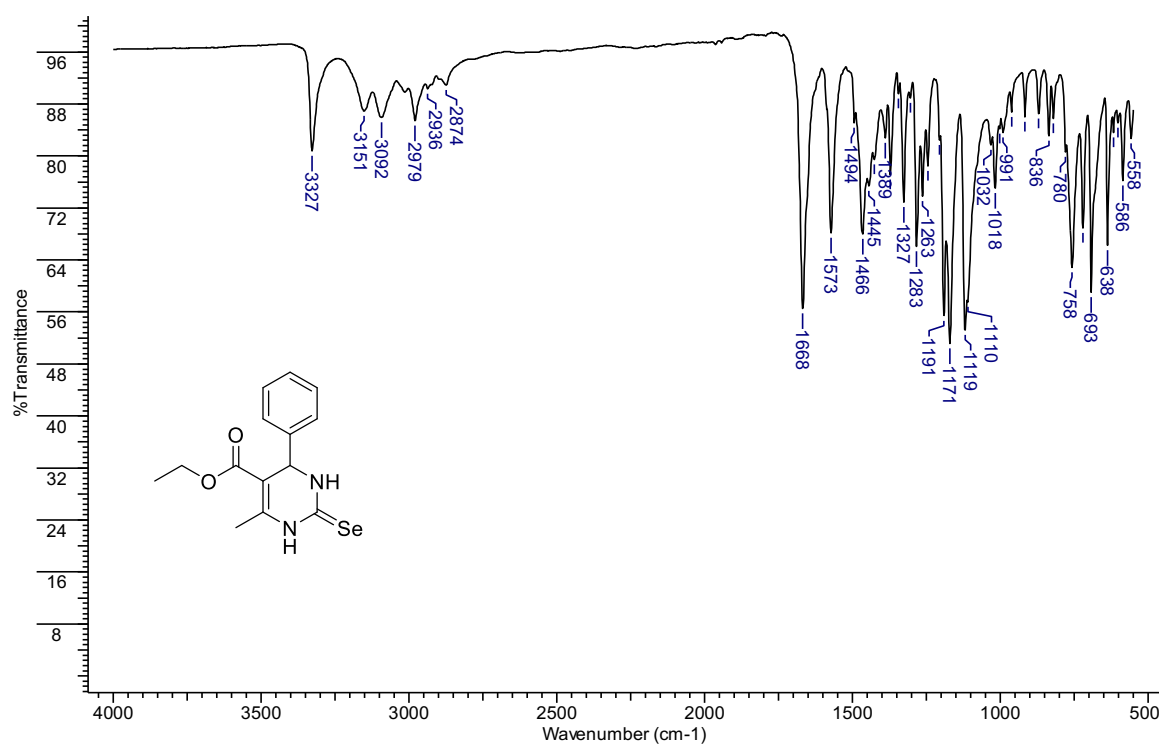


Figura S47 – Espectro na região de infravermelho do composto ABSe-a.

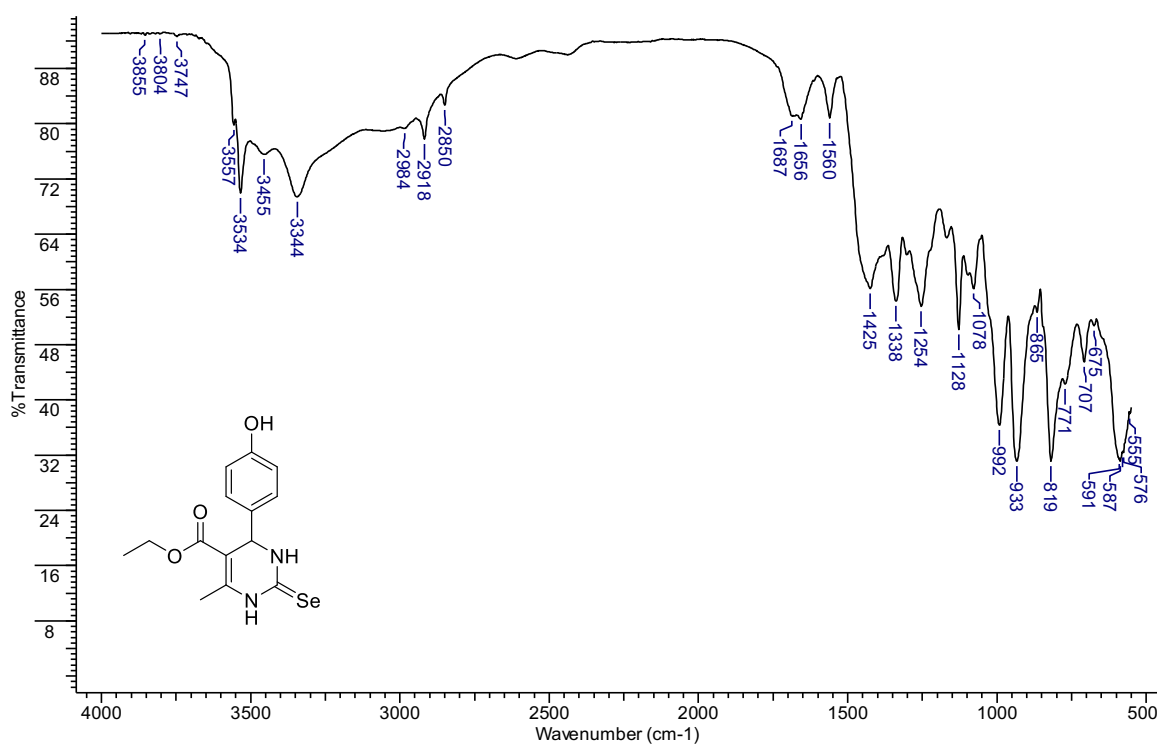


Figura S48 – Espectro na região de infravermelho do composto ABSe-b.

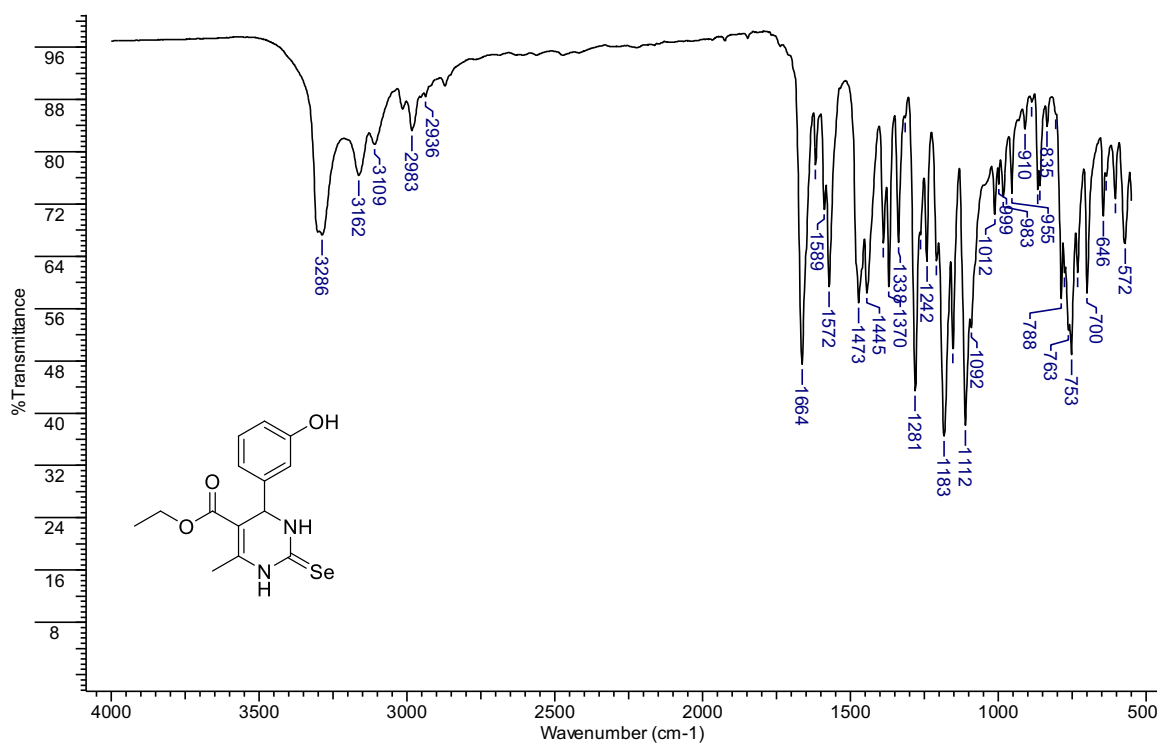


Figura S49 – Espectro na região de infravermelho do composto ABSe-c.

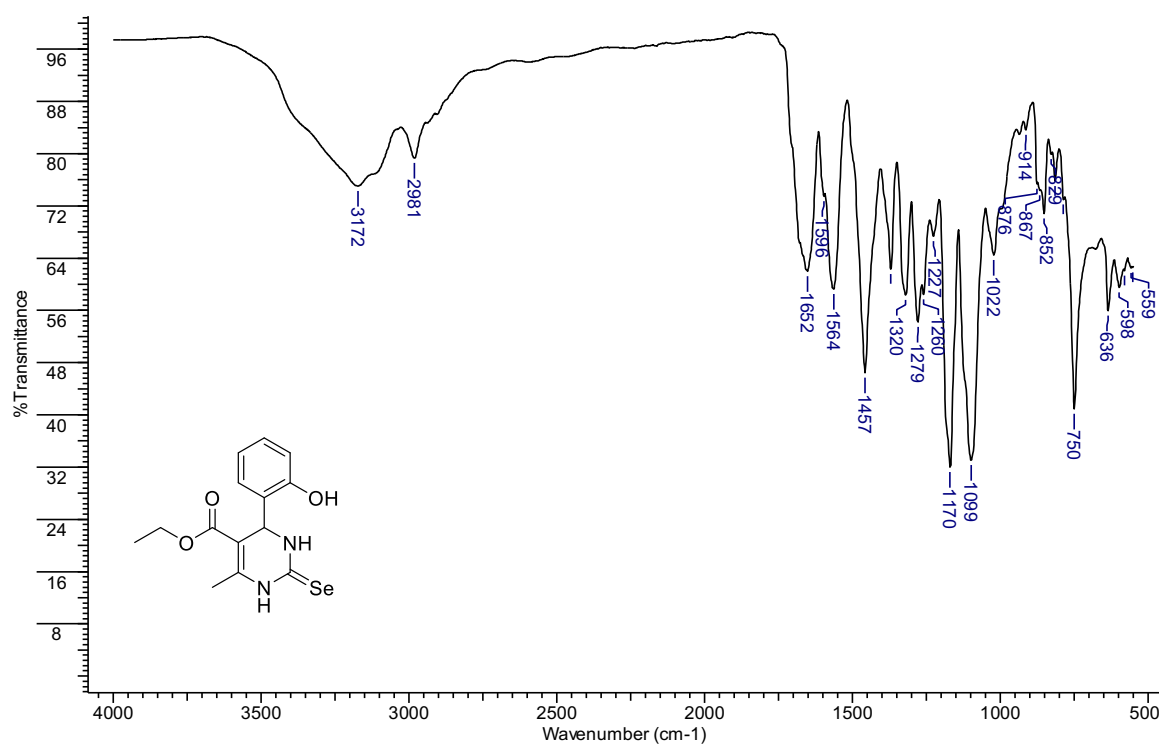


Figura S50 – Espectro na região de infravermelho do composto ABSe-d.

Capítulo II – Adutos de Biginelli borônicos

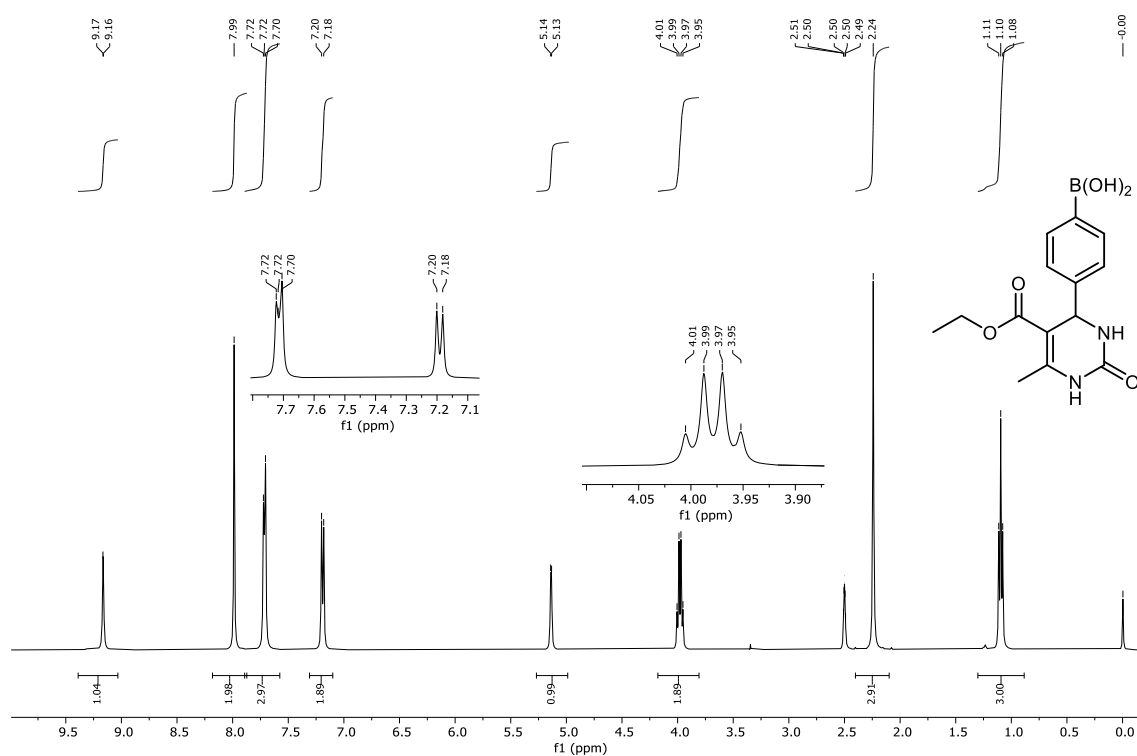


Figura S51 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto AcB-a.

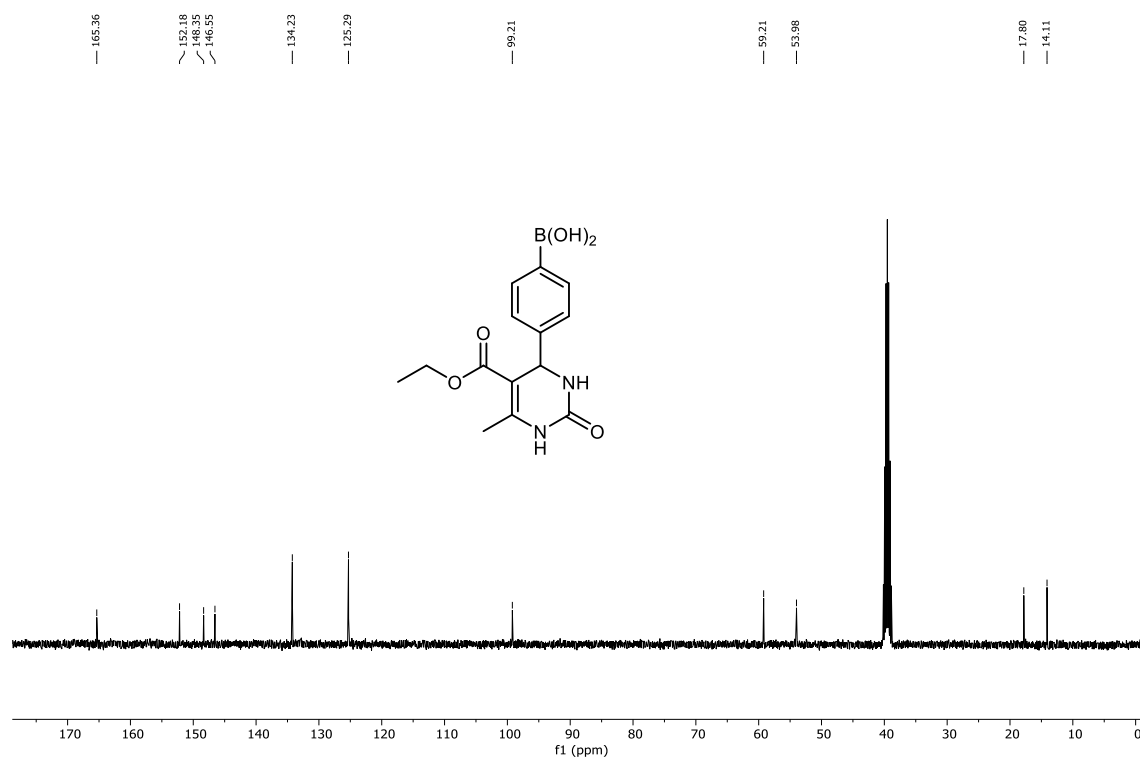


Figura S52 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto AcB-a.

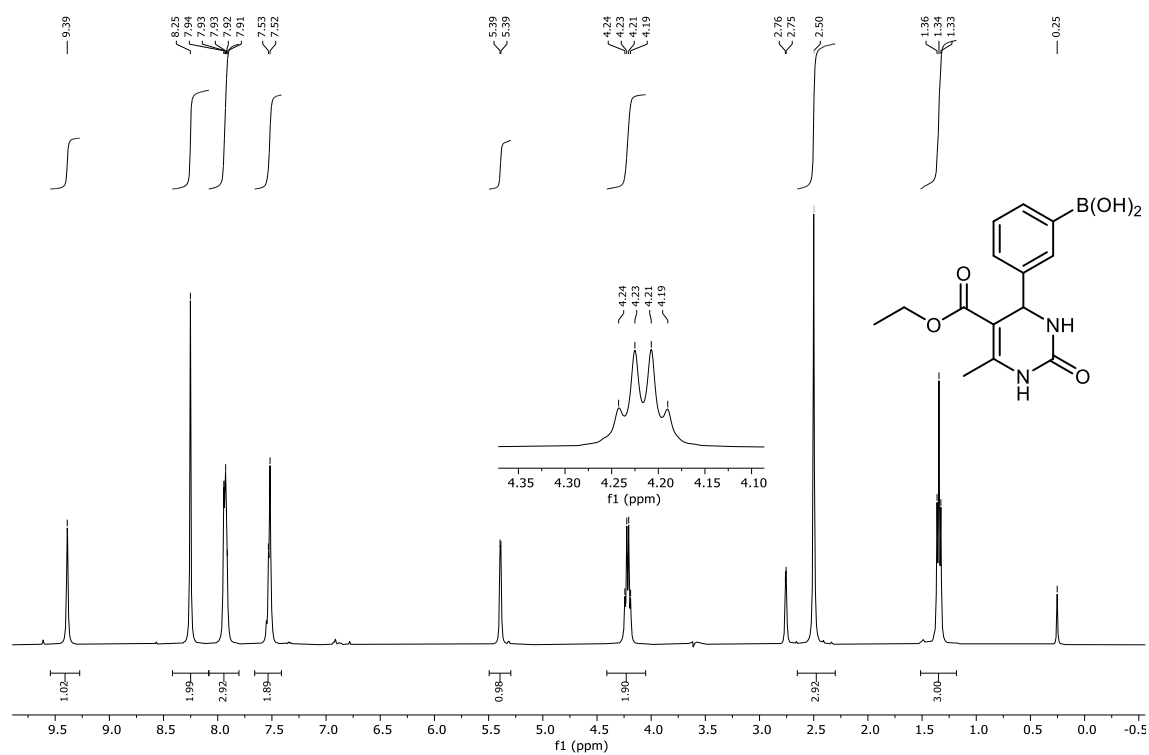


Figura S53 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto AcB-b.

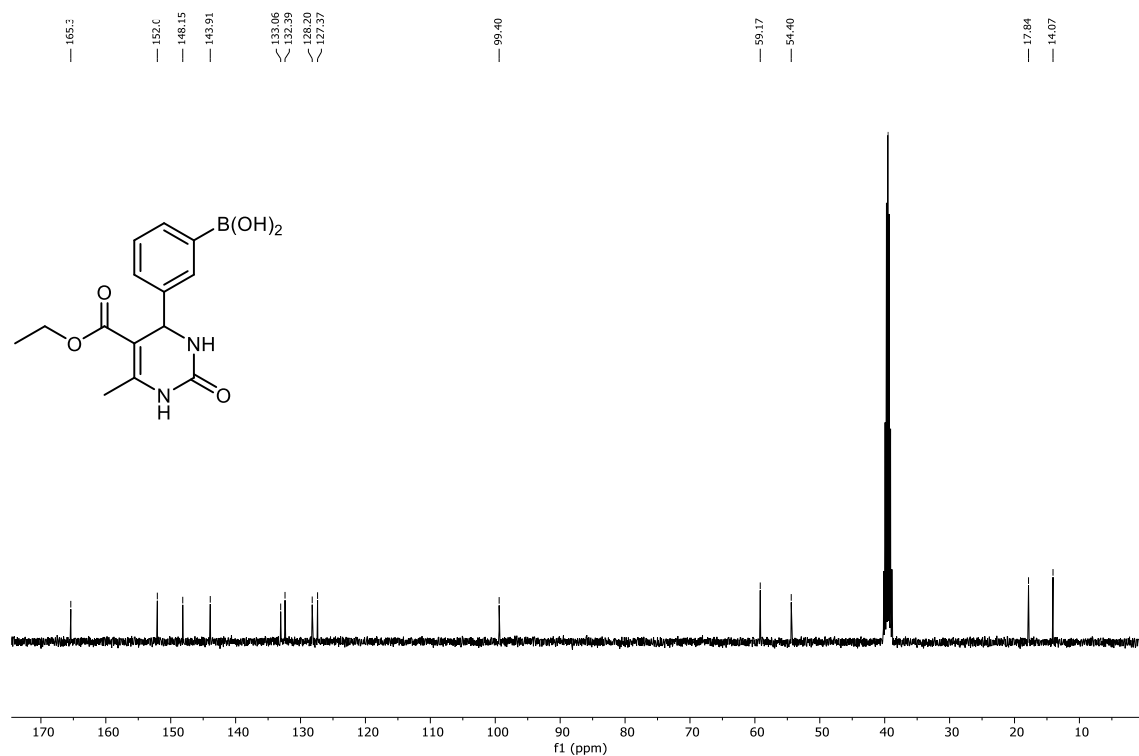


Figura S54 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto AcB-b.

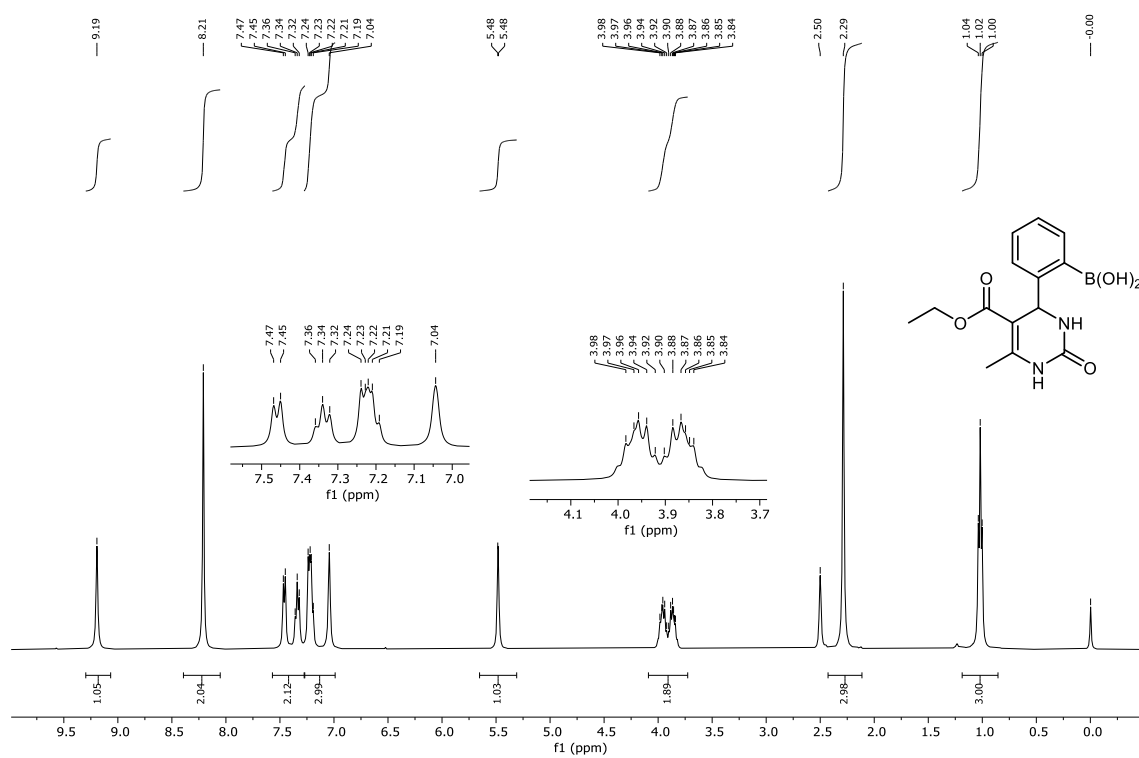


Figura S55 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto AcB-c.

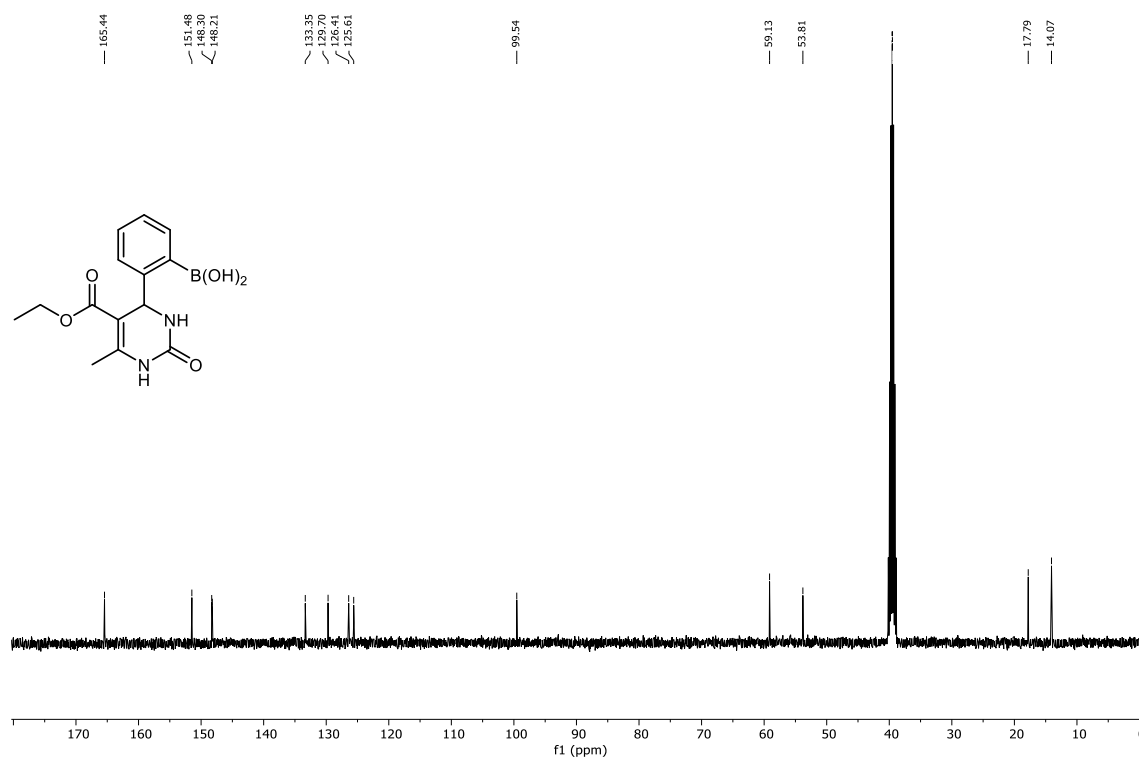


Figura S56 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto AcB-c.

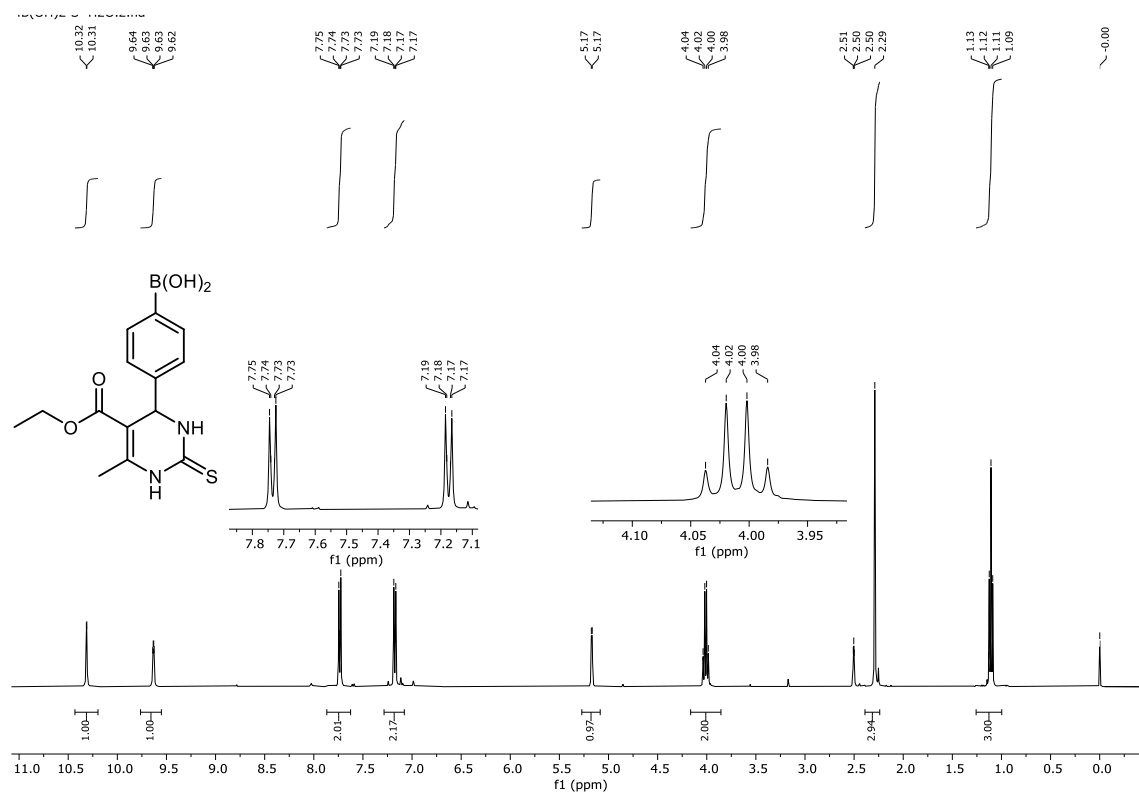


Figura S57 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto AcB-d.

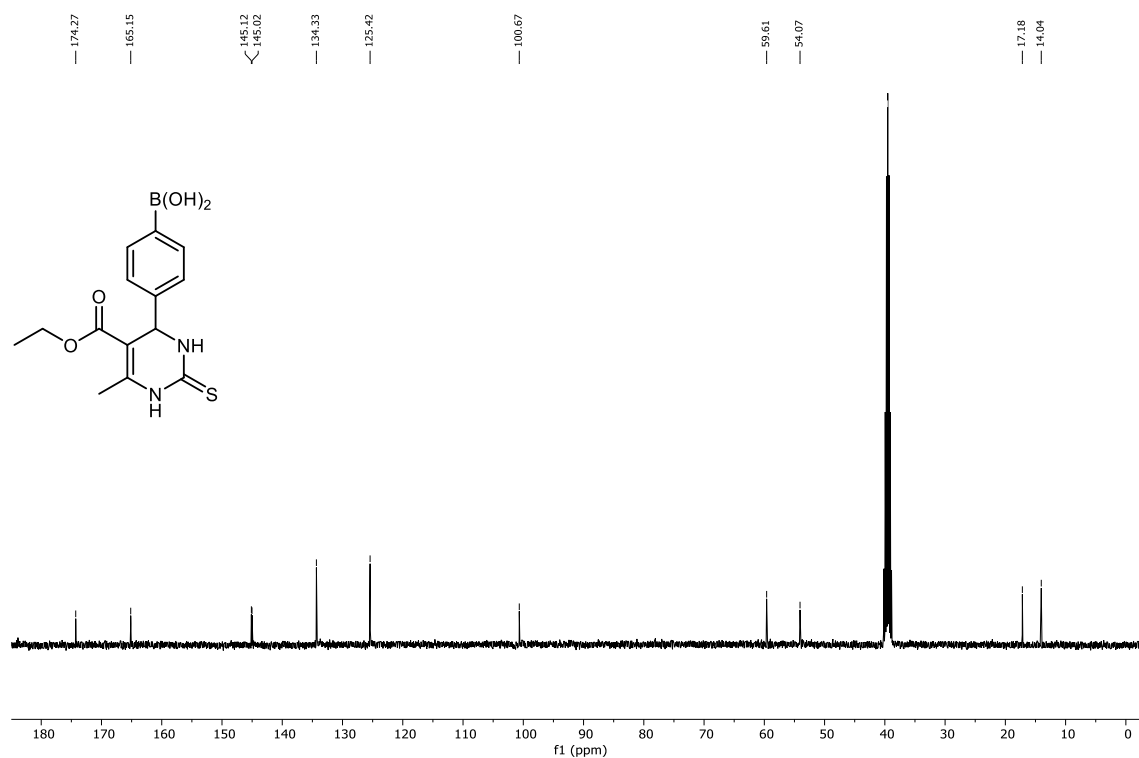


Figura S58 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto AcB-d.

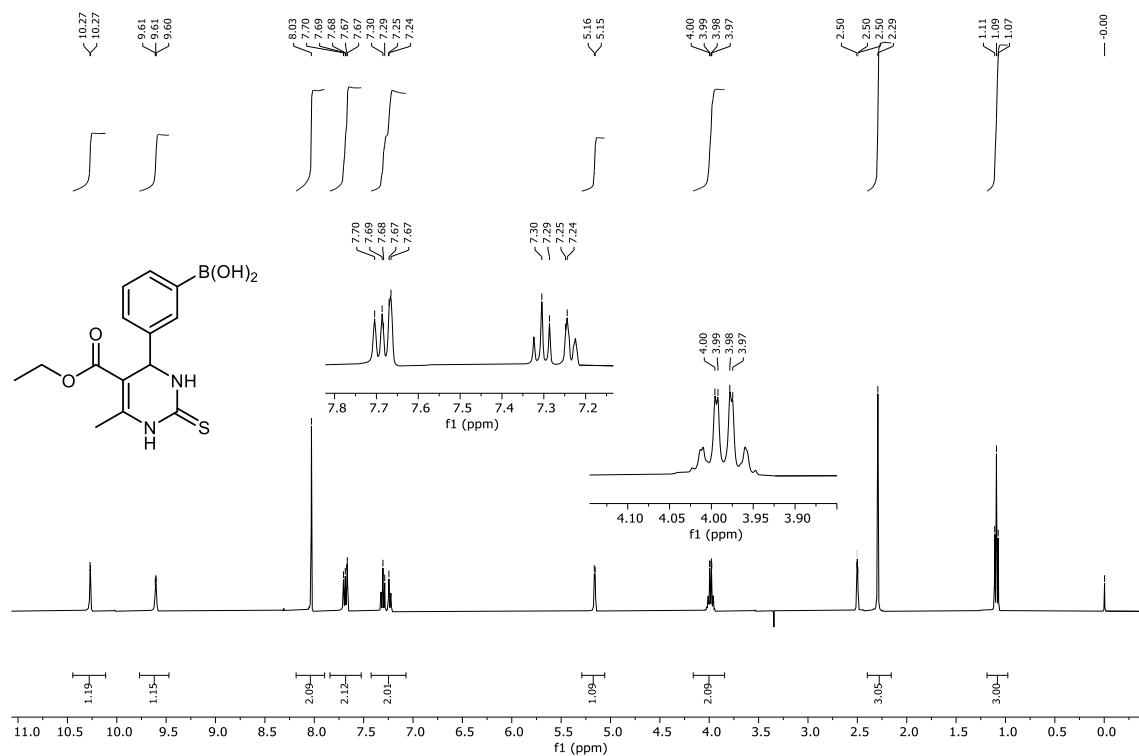


Figura S59 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto AcB-e.

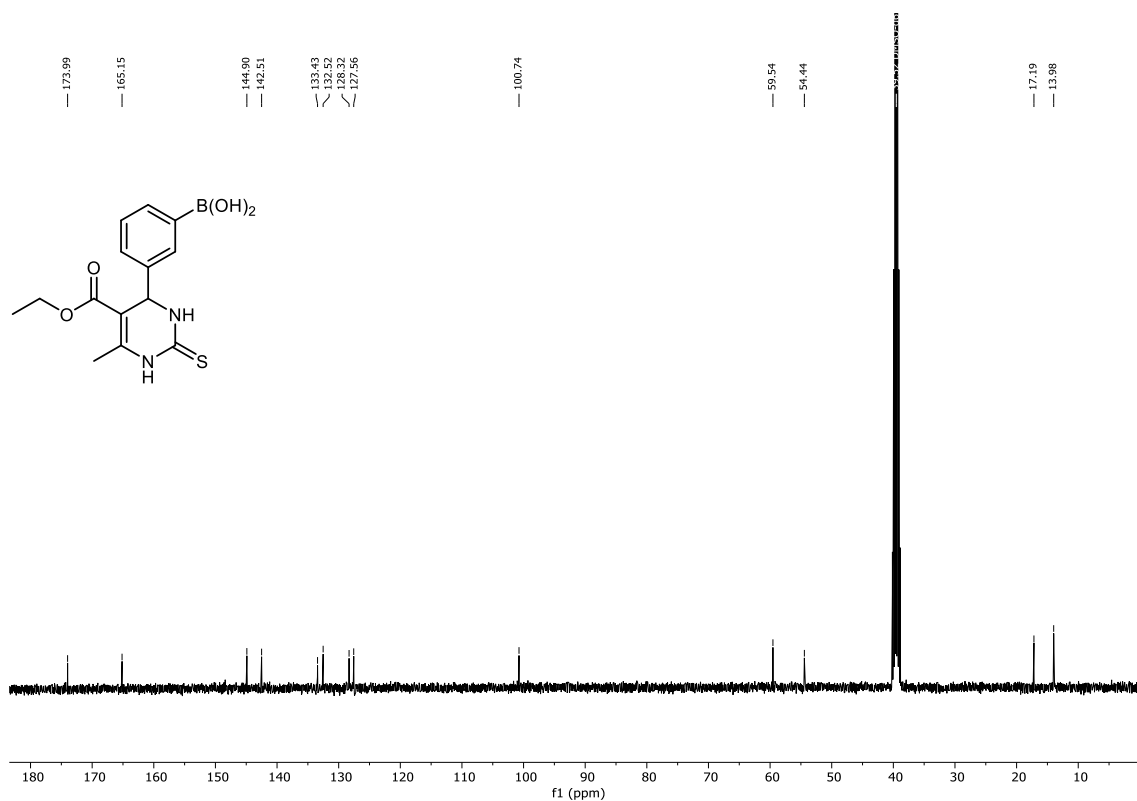


Figura S60 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto AcB-e.

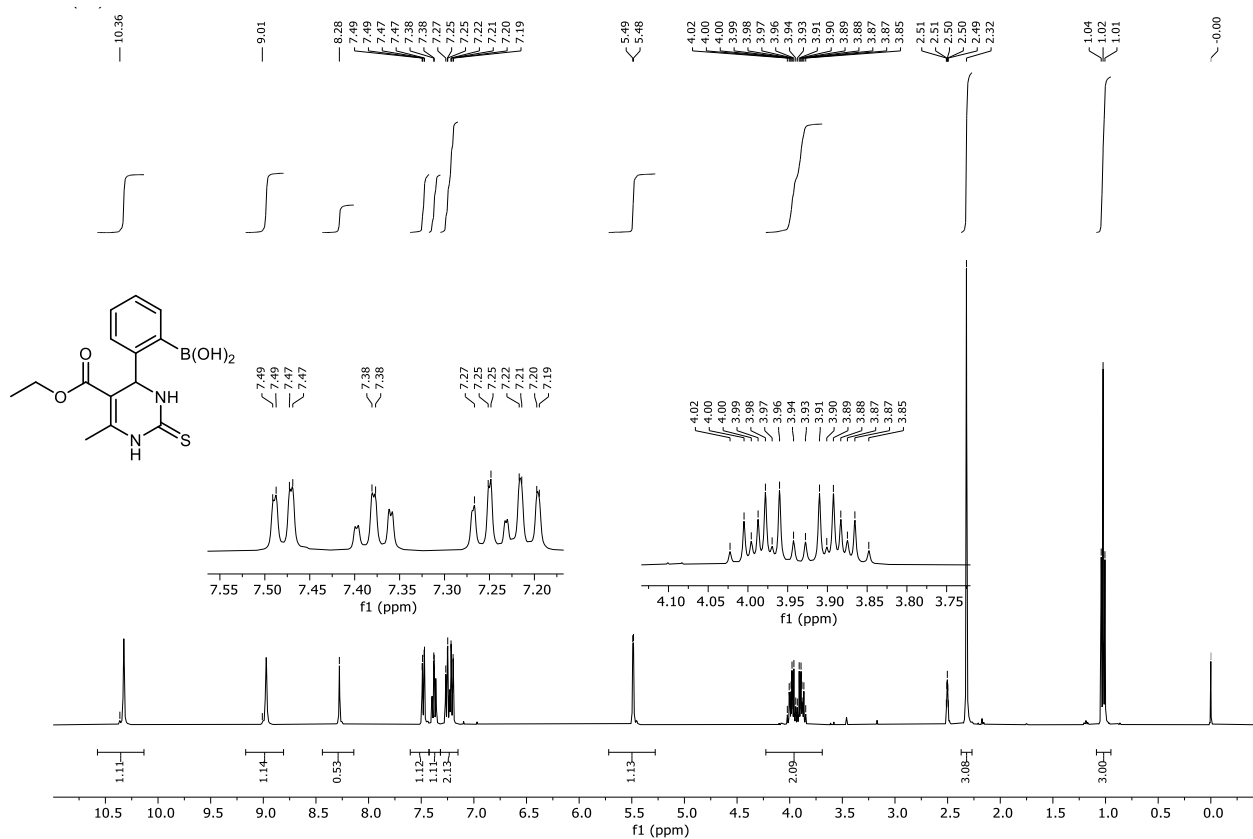


Figura S61 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto AcB-f.

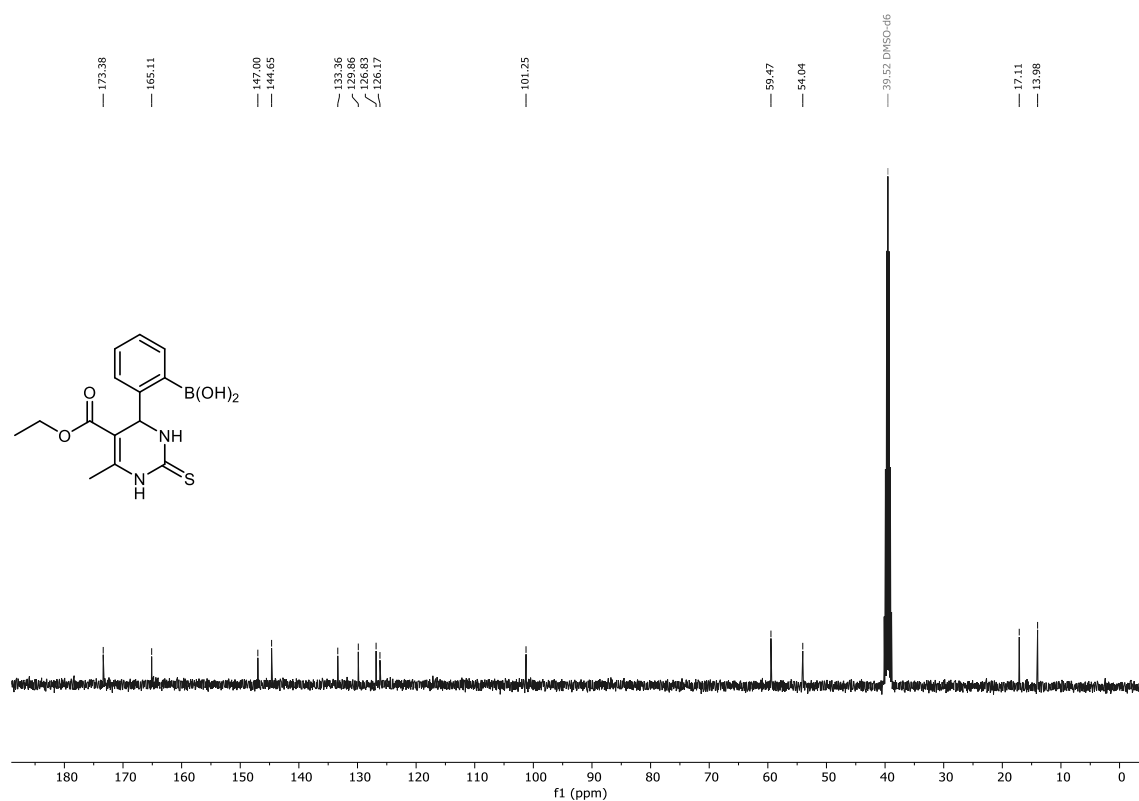


Figura S61 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto AcB-f.

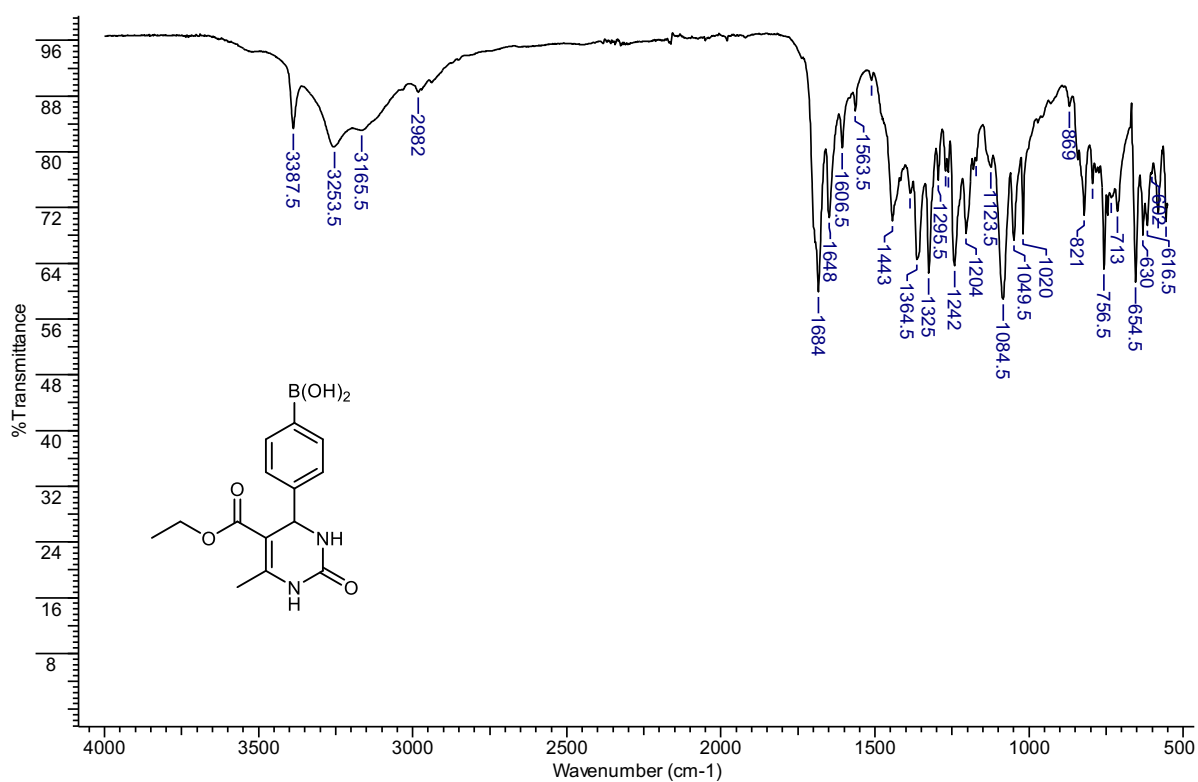


Figura S62 – Espectro na região de infravermelho do composto AcB-a.

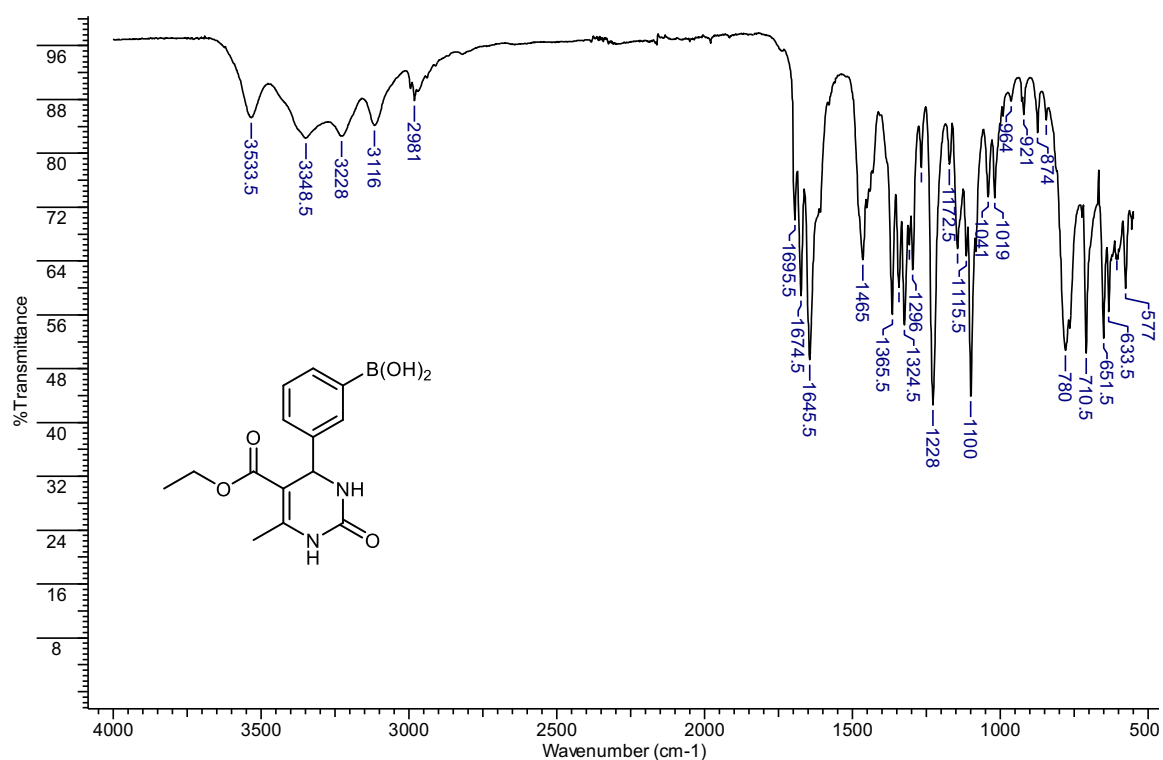


Figura S63 – Espectro na região de infravermelho do composto AcB-b.

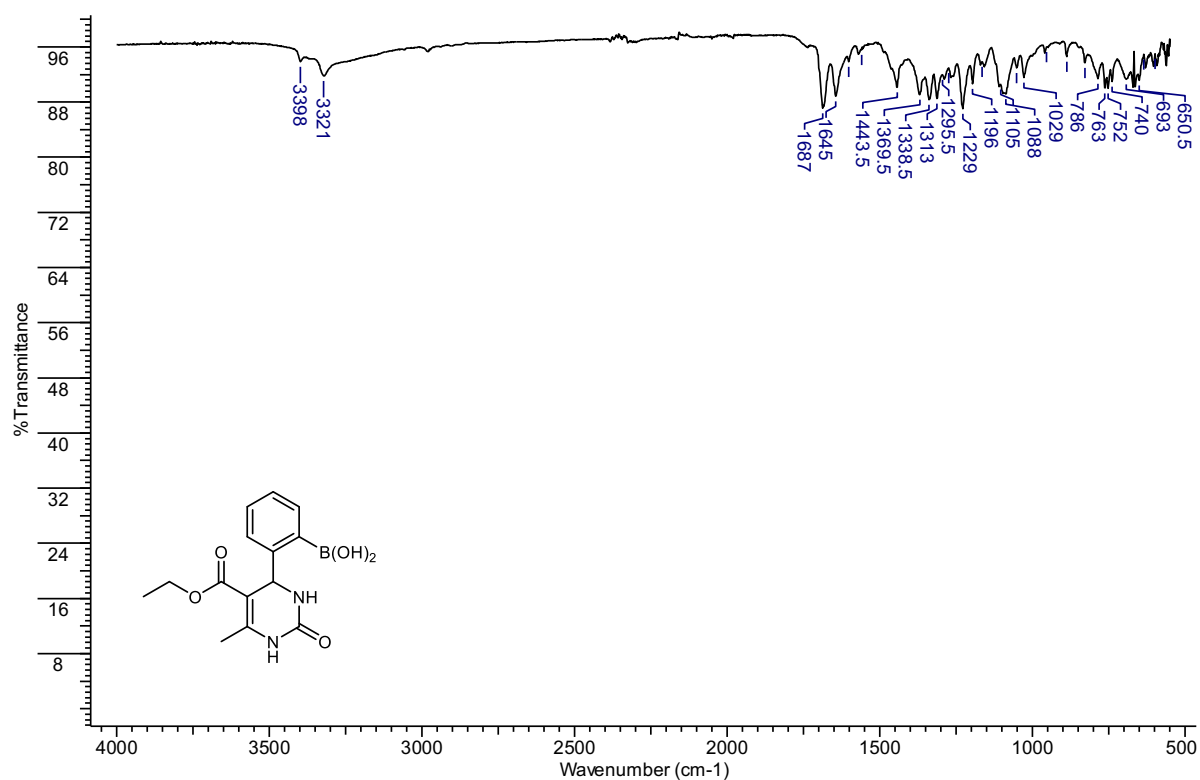


Figura S64 – Espectro na região de infravermelho do composto AcB-c.

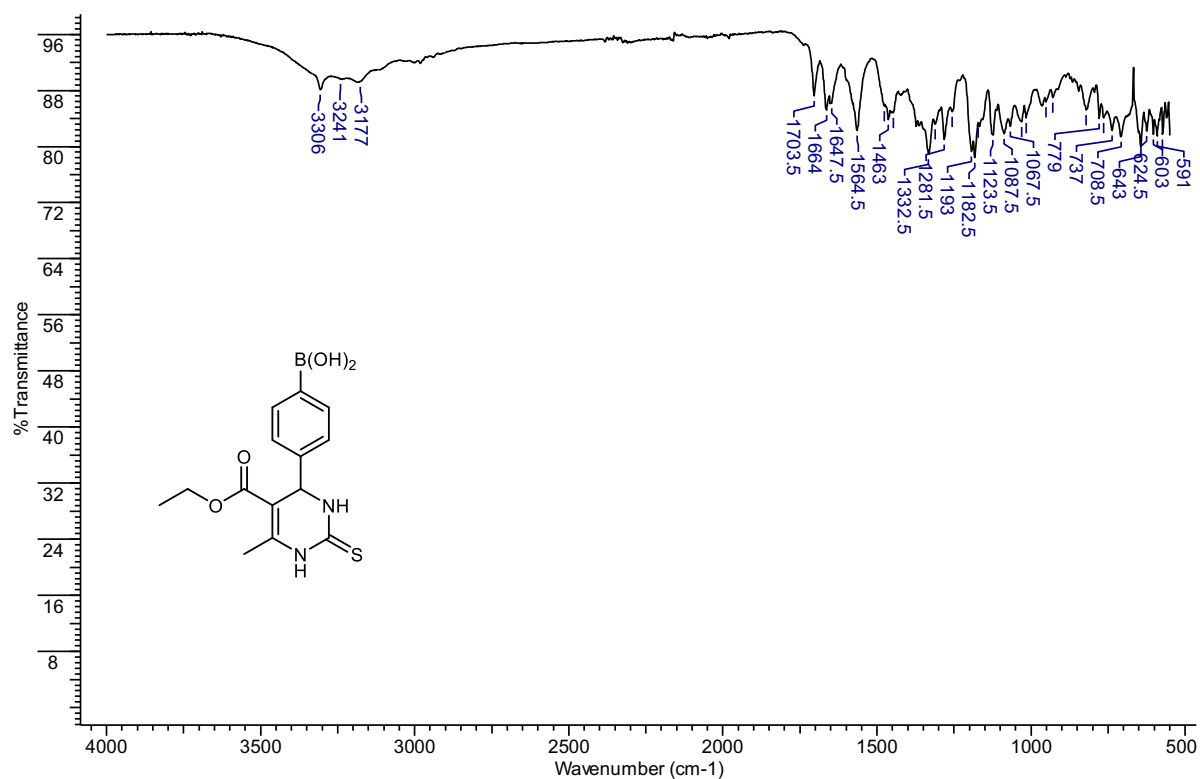


Figura S65 – Espectro na região de infravermelho do composto AcB-d.

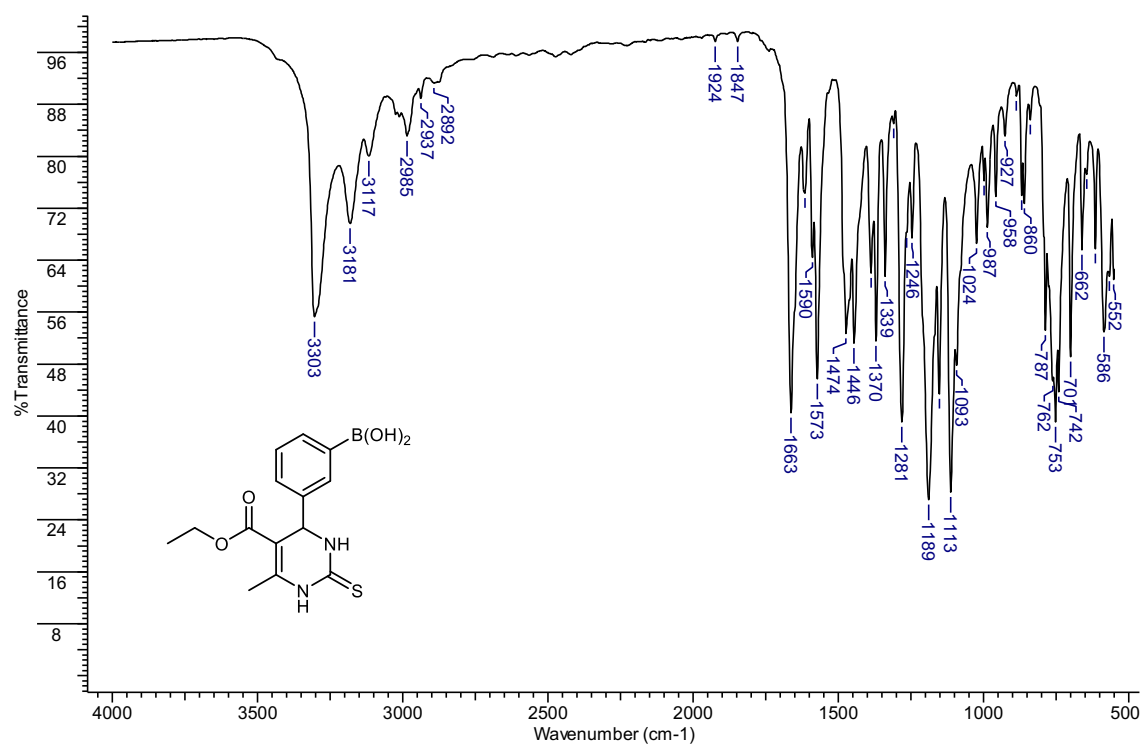


Figura S66 – Espectro na região de infravermelho do composto AcB-e.

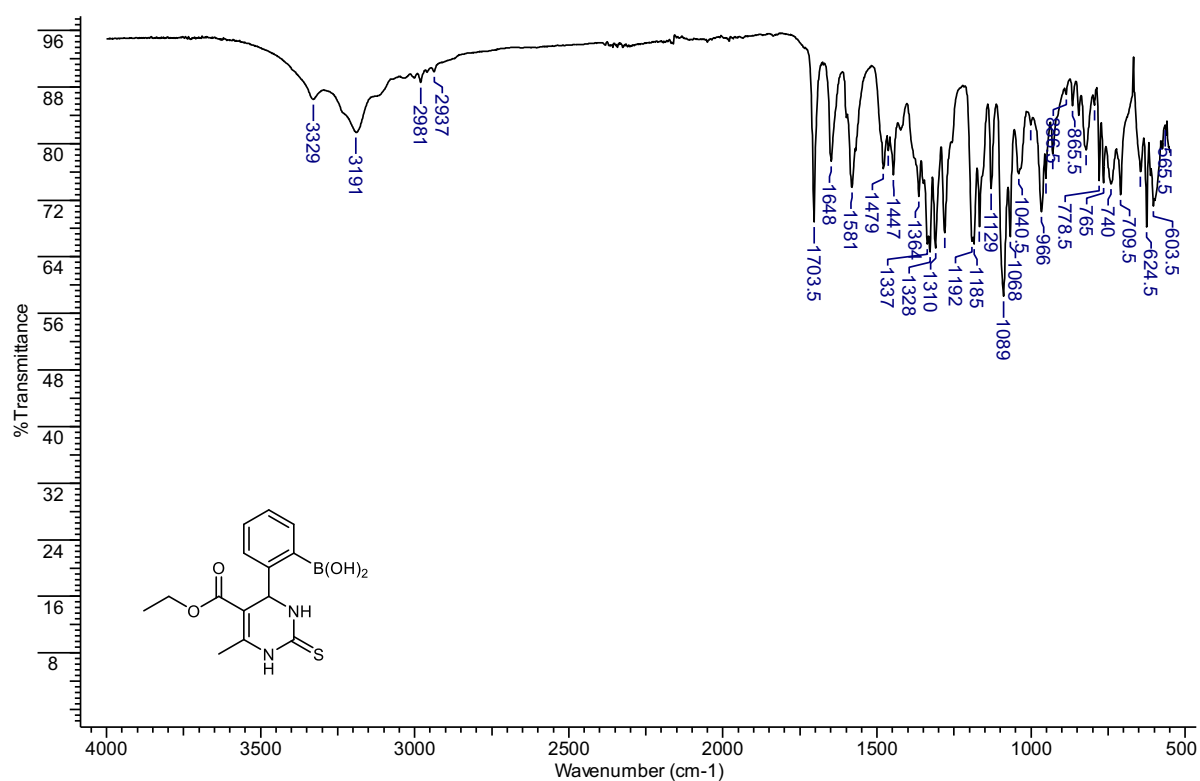


Figura S67 – Espectro na região de infravermelho do composto AcB-f.

Capítulo III – Benzoilselenoureias (BSUs)

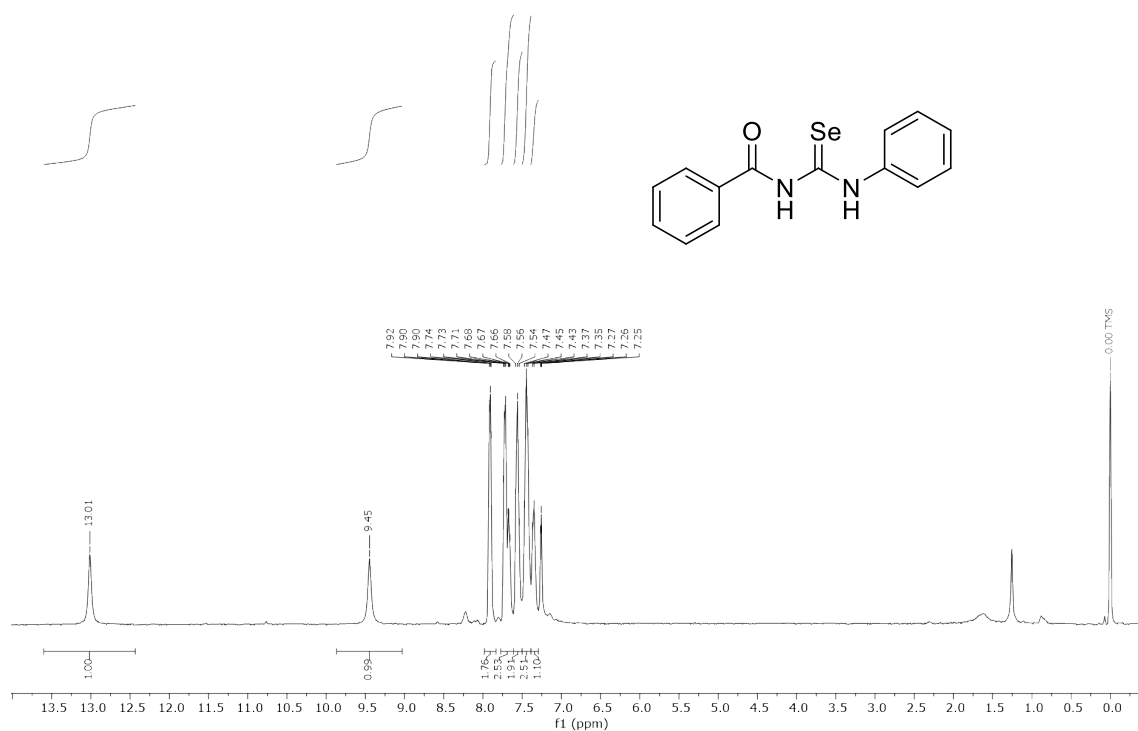


Figura S68 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto BSU 1.

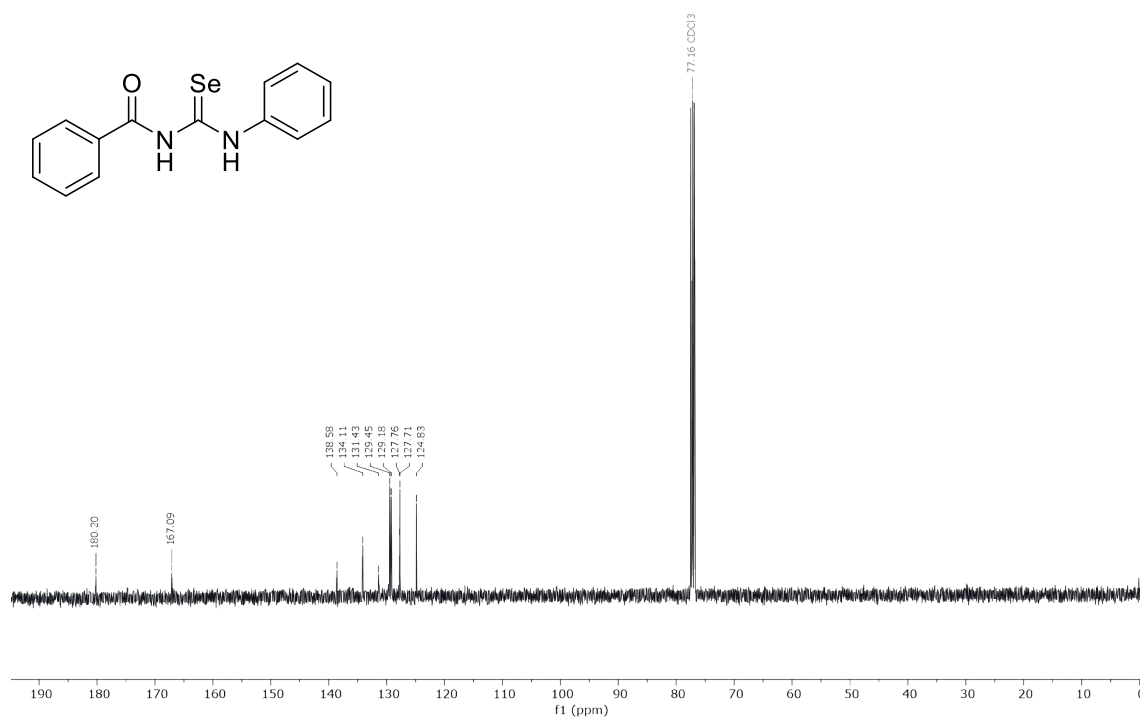


Figura 69: Espectros de RMN de ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) do composto BSU 1.

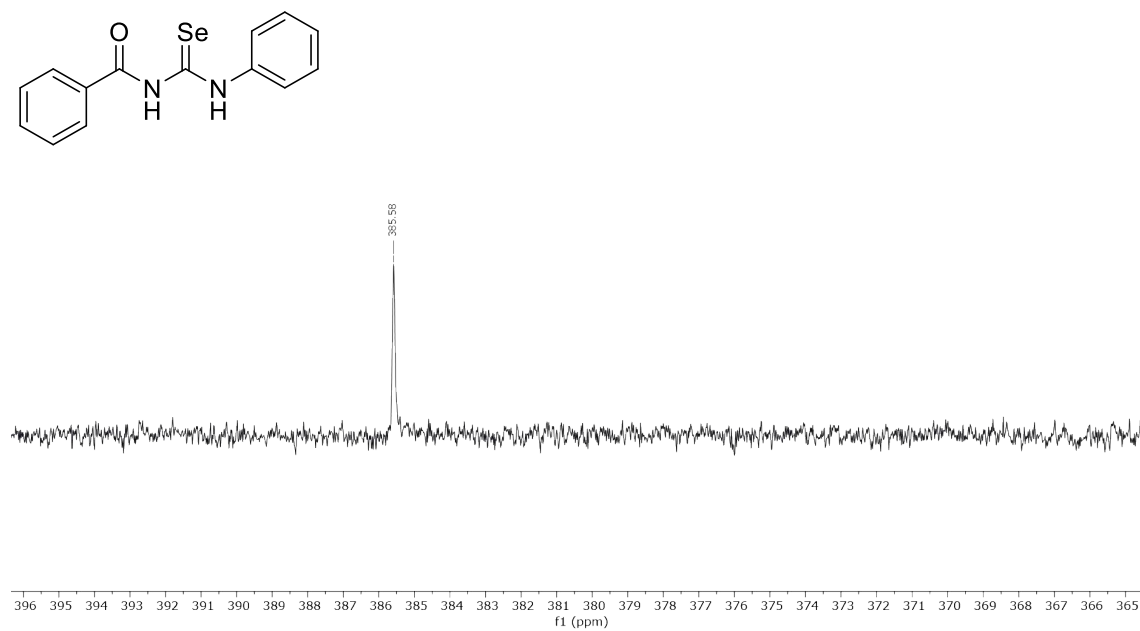


Figura 70: Espectros de RMN de ^{77}Se RMN (51.5 MHz, CDCl_3) do composto BSU 1

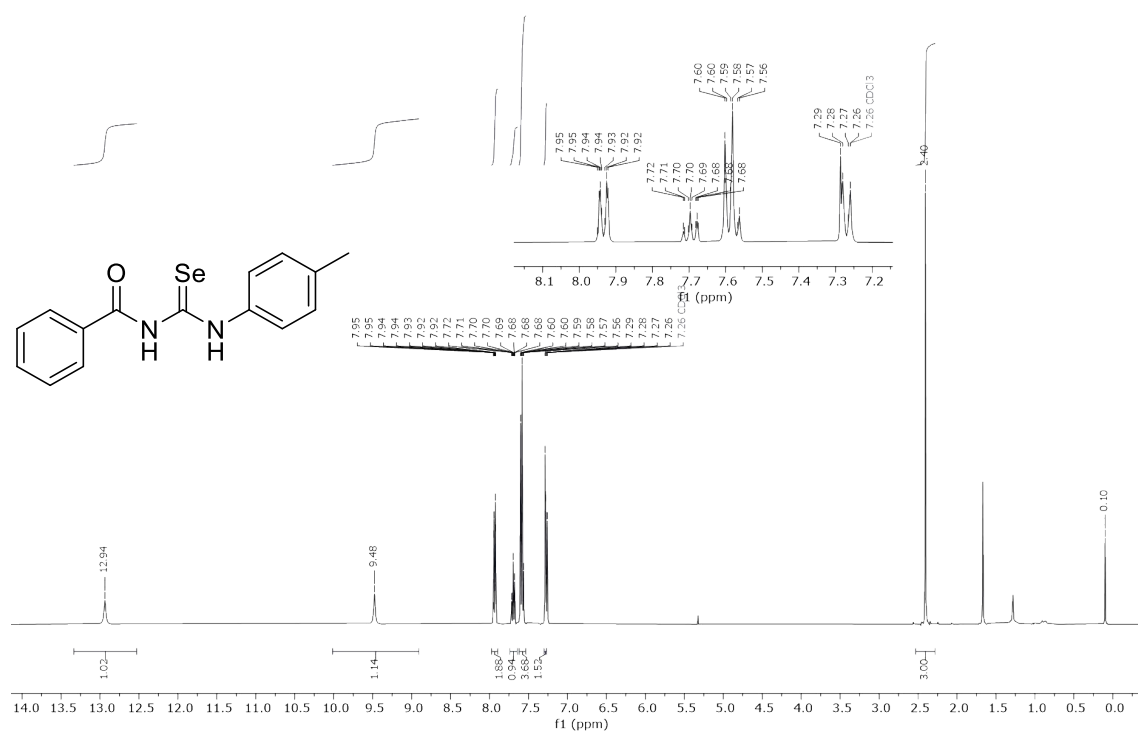


Figura S71 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto BSU 2.

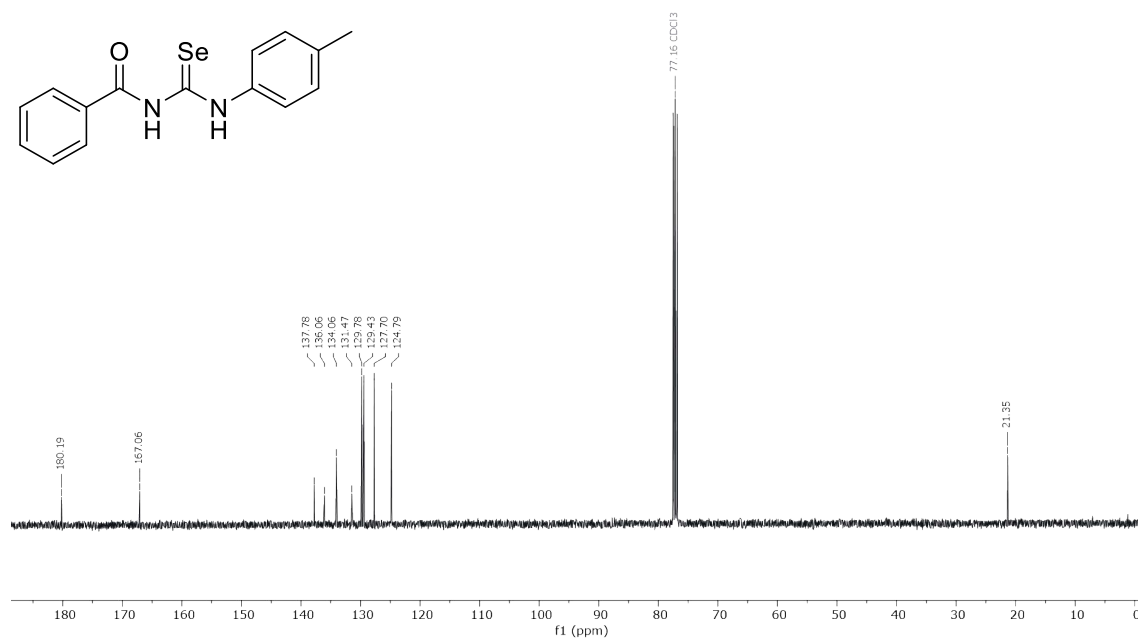


Figura 72: Espectros de RMN de ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) do composto BSU 2.

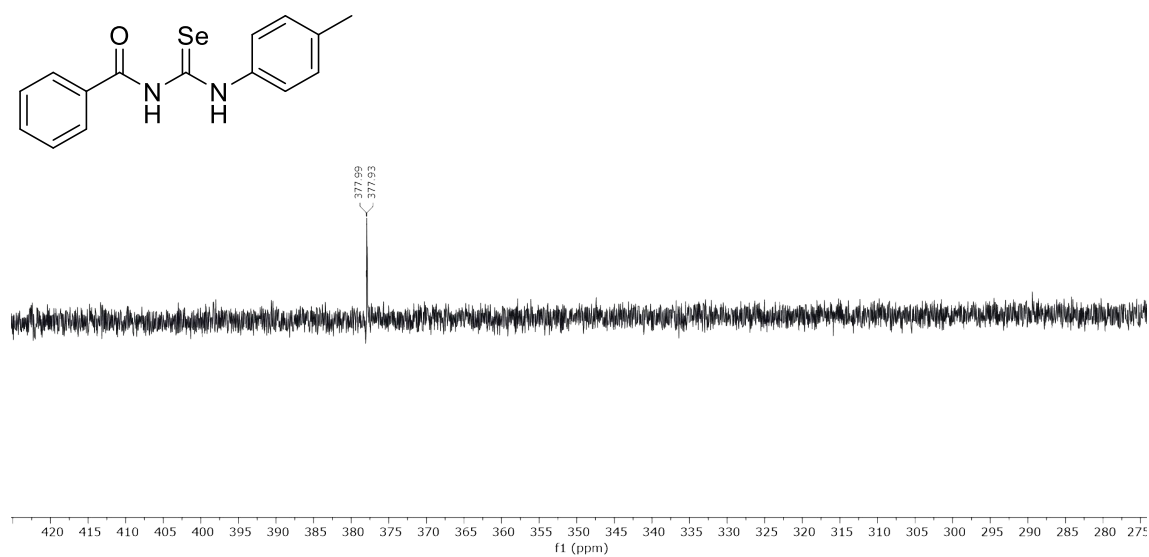


Figura 73: Espectros de RMN de ^{77}Se RMN (51.5 MHz, CDCl_3) do composto BSU 2.



Figura S74 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto BSU 3.

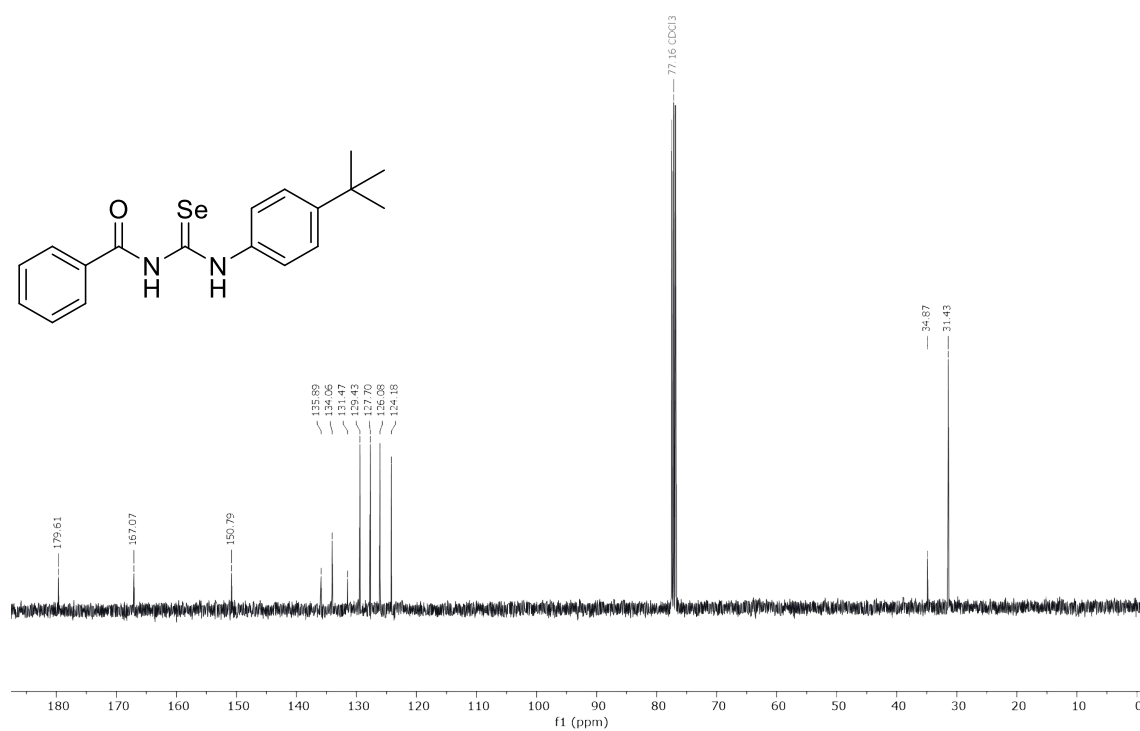


Figura 75: Espectros de RMN de ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) do composto BSU 3.

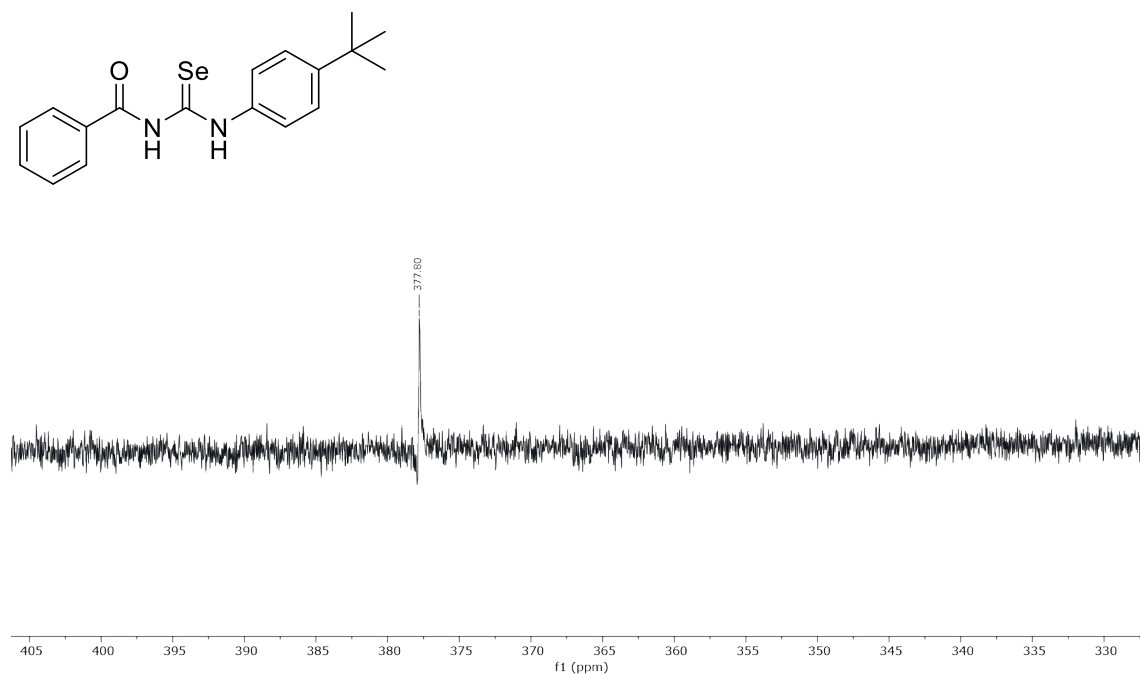


Figura 76: Espectros de RMN de ⁷⁷Se RMN (51.5 MHz, CDCl₃) do composto BSU 3.

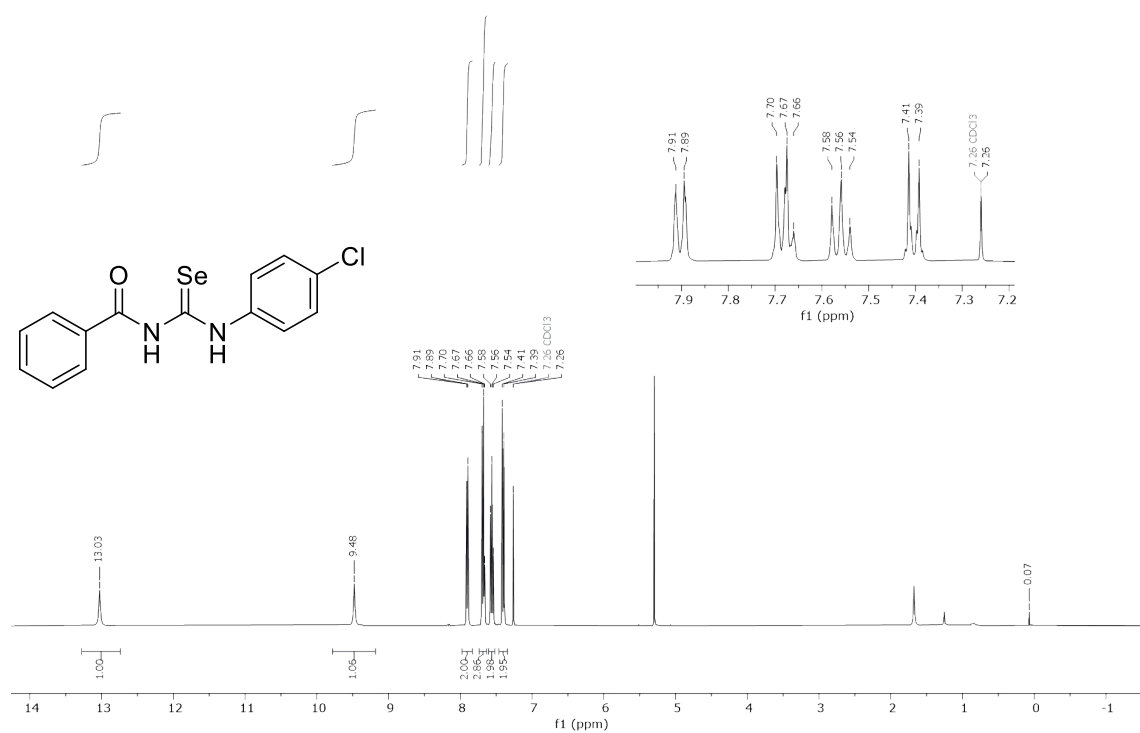


Figura S77 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto BSU 4.

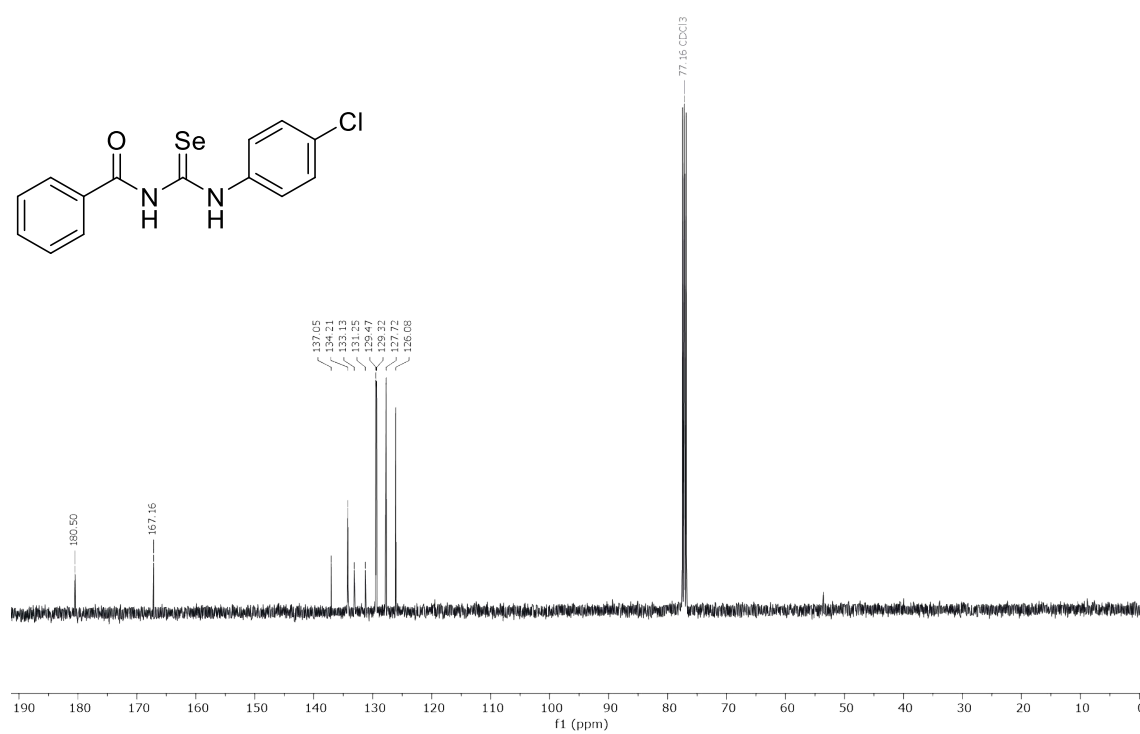


Figura 78: Espectros de RMN de ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) do composto BSU 4.

[illegible]

Figura S80 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto BSU 5.

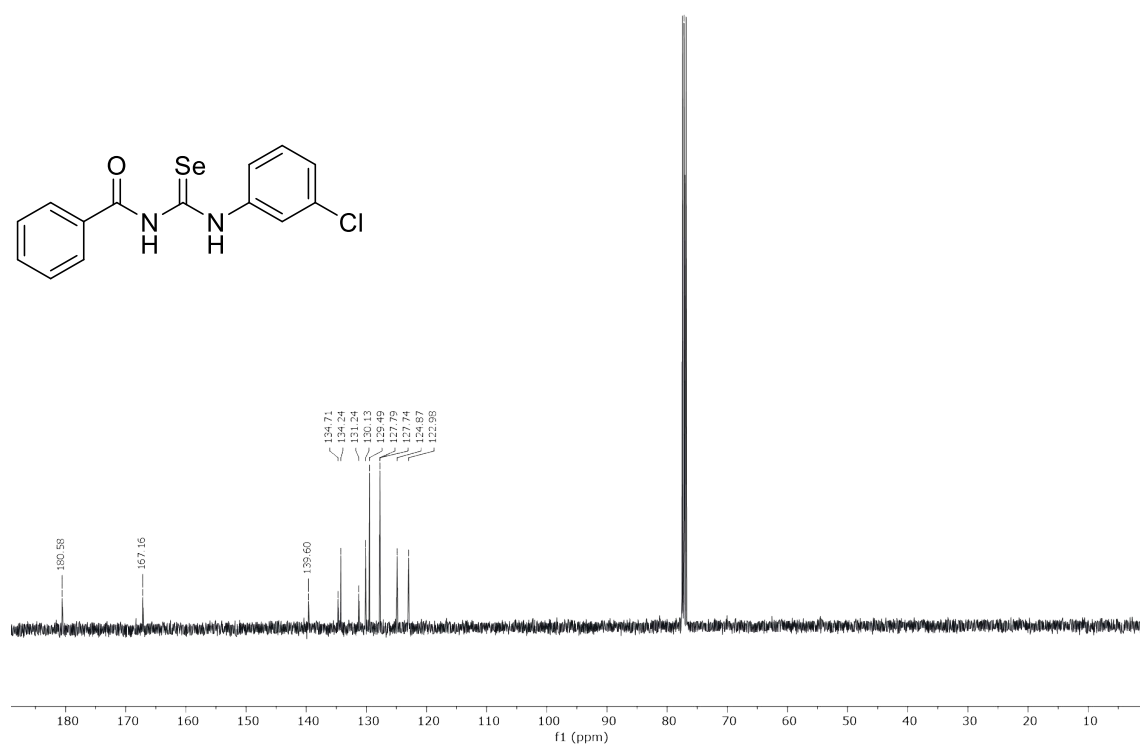


Figura 81: Espectros de RMN de ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) do composto BSU 5.

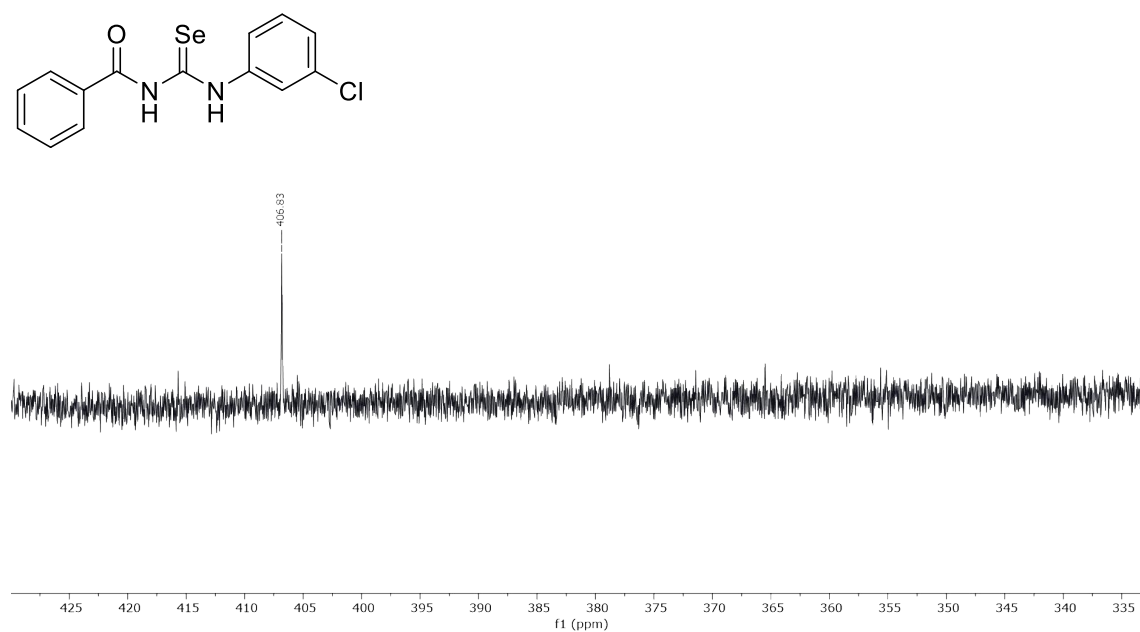


Figura 82: Espectros de RMN de ⁷⁷Se RMN (51.5 MHz, CDCl₃) do composto BSU 5.

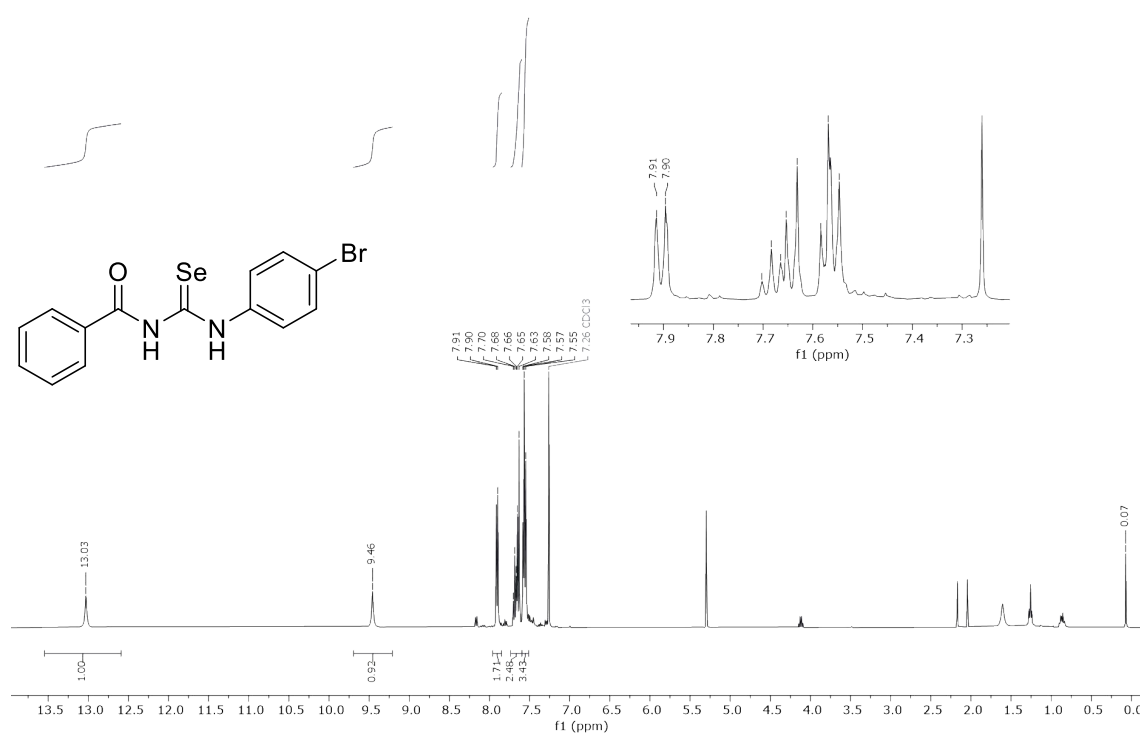


Figura S83 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto BSU 6.

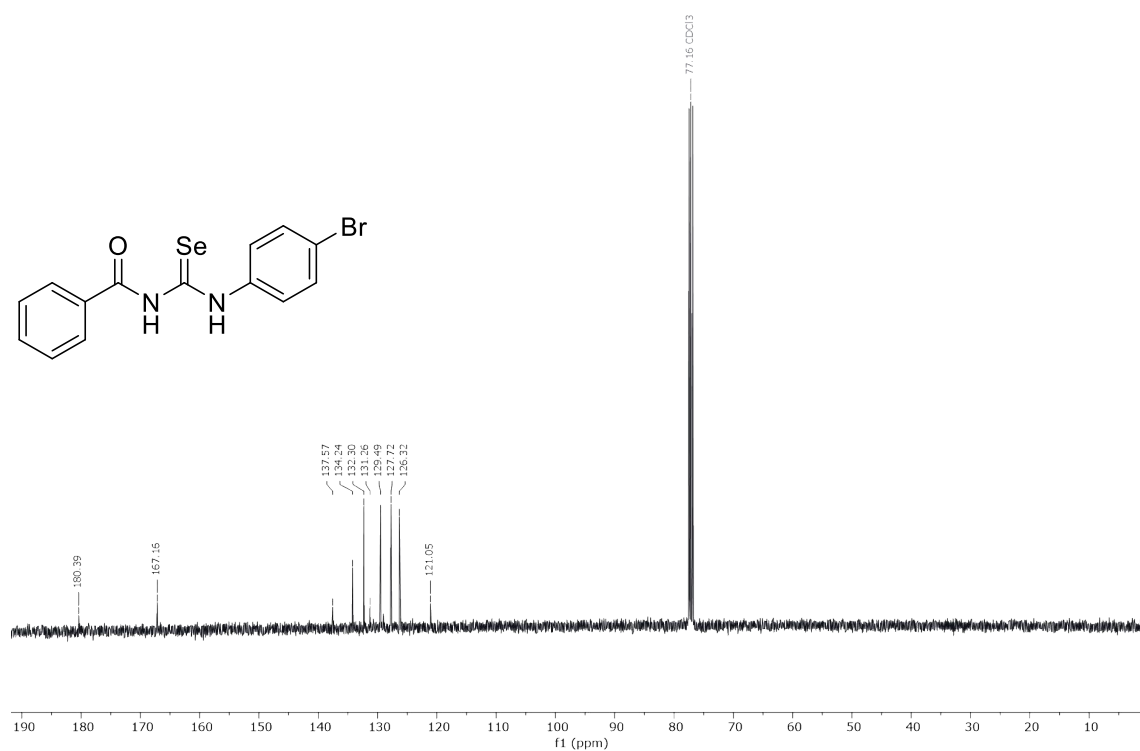


Figura 84: Espectros de RMN de ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) do composto BSU 6.

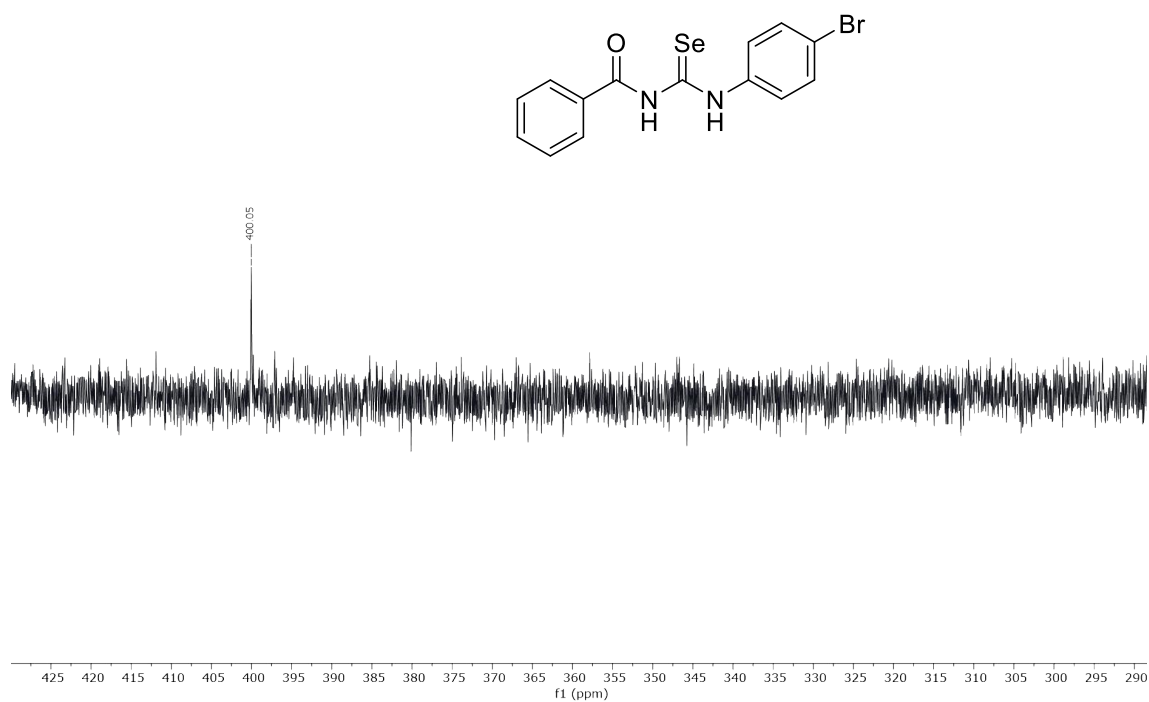


Figura 85: Espectros de RMN de ⁷⁷Se RMN (51.5 MHz, CDCl₃) do composto BSU 6.

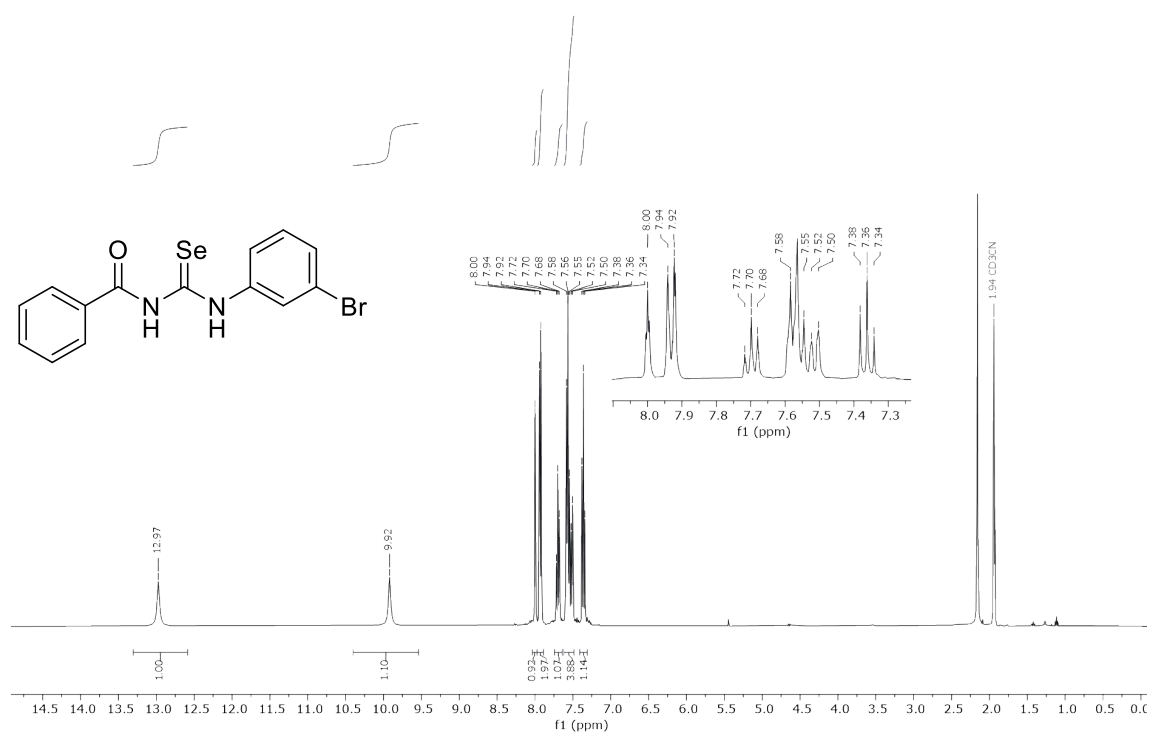


Figura S86 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto BSU 7.

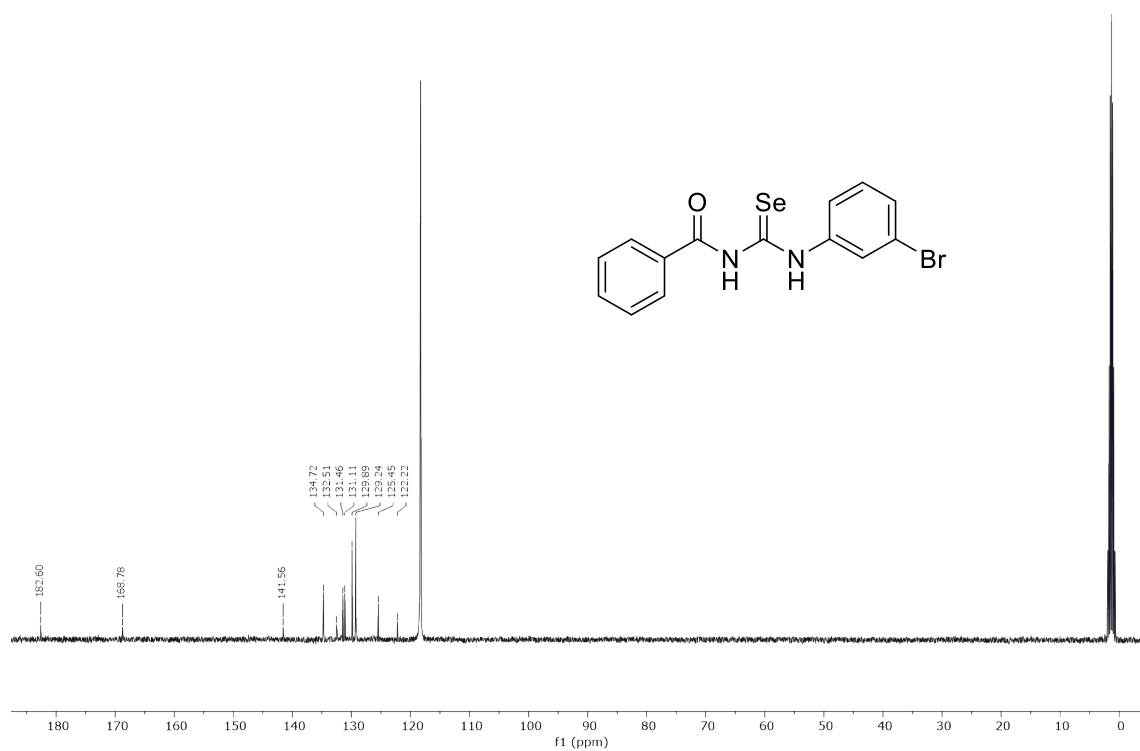


Figura 87: Espectros de RMN de ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) do composto BSU 7.

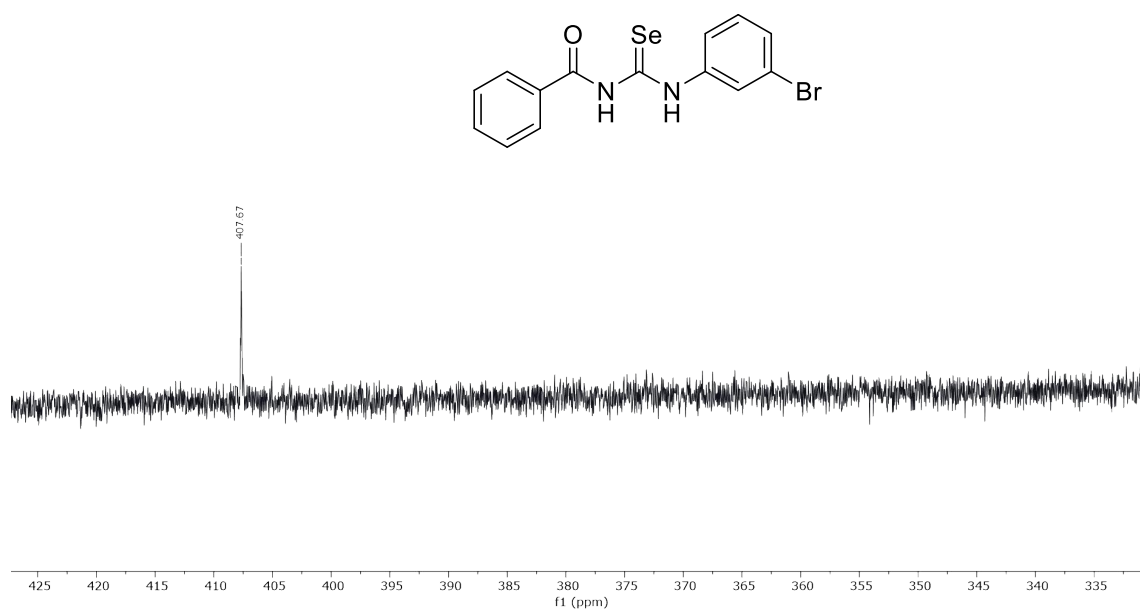


Figura 88: Espectros de RMN de ^{77}Se RMN (51.5 MHz, CDCl_3) do composto BSU 7.

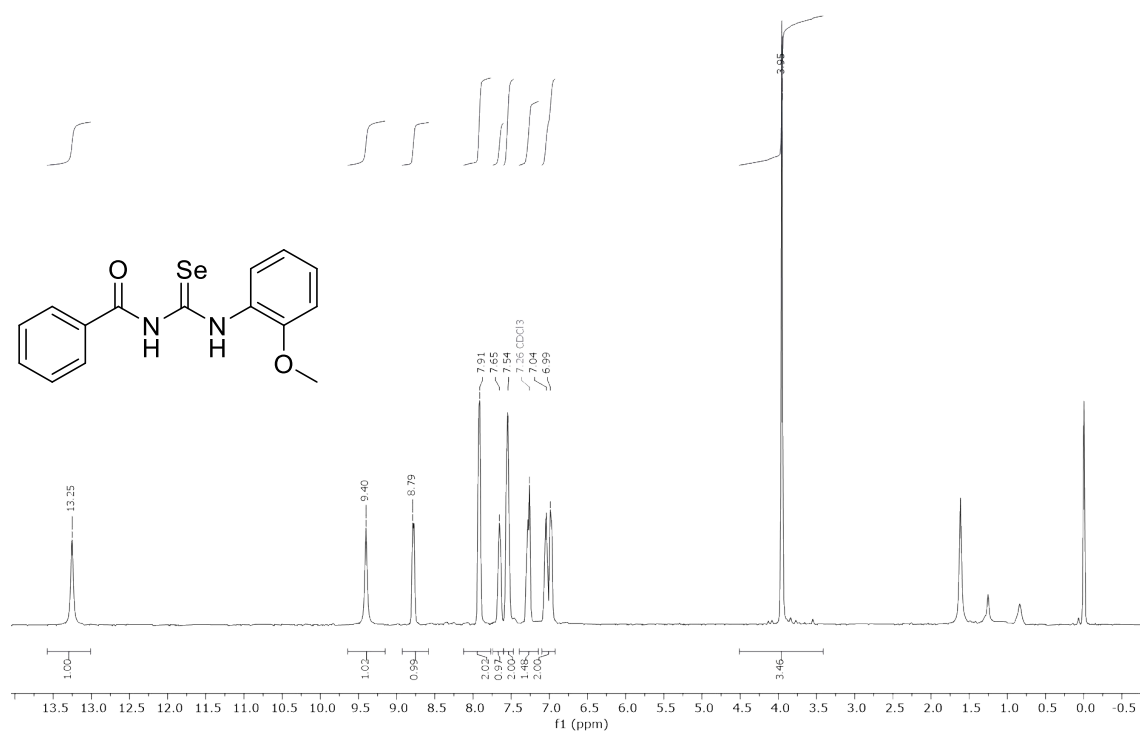


Figura S89 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto BSU 8.

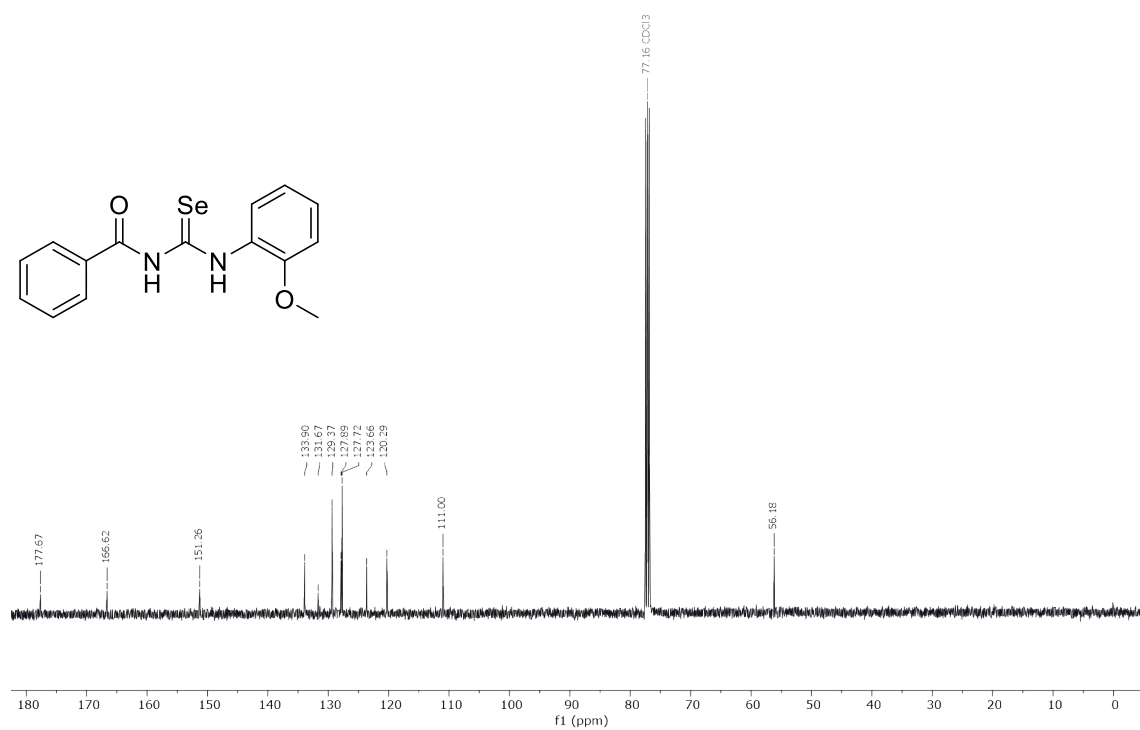


Figura 90: Espectros de RMN de ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) do composto BSU 8.

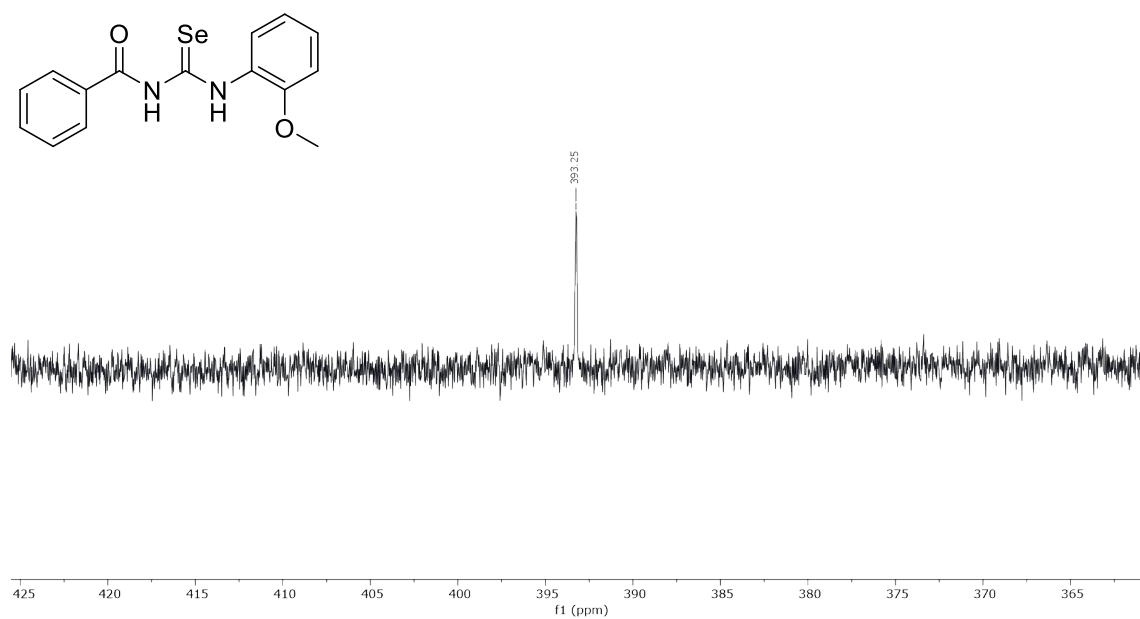


Figura 91: Espectros de RMN de ^{77}Se RMN (51.5 MHz, CDCl_3) do composto BSU 8.

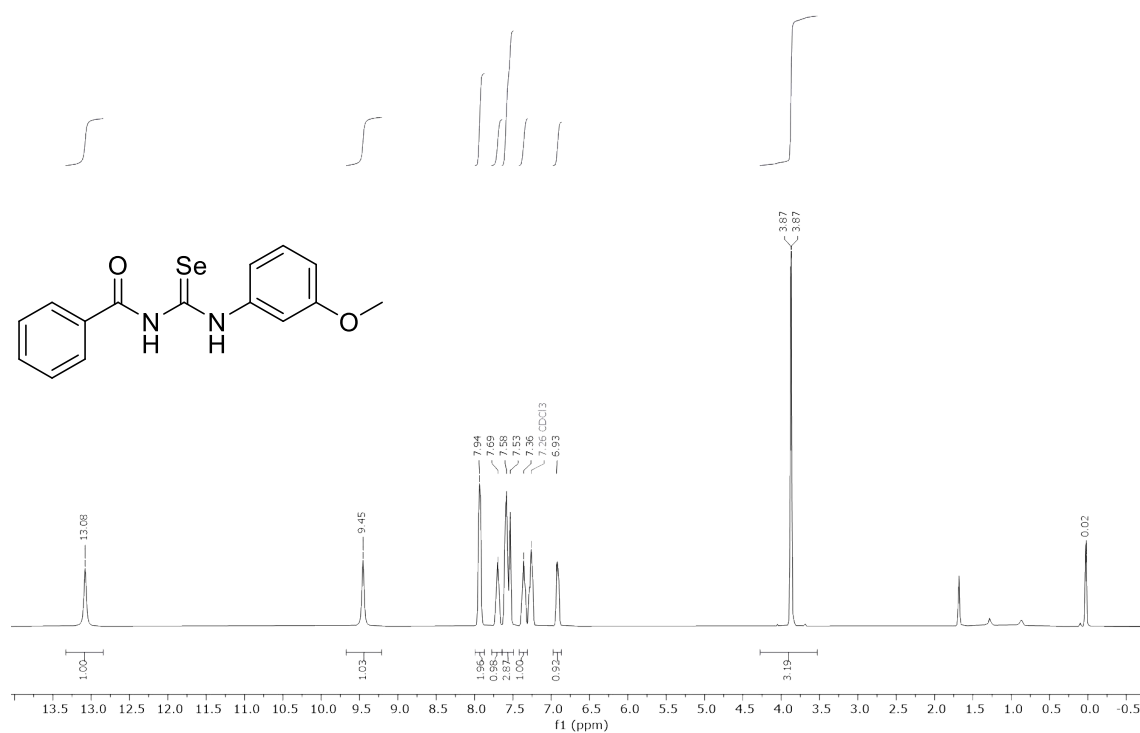


Figura S92 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto BSU 9.

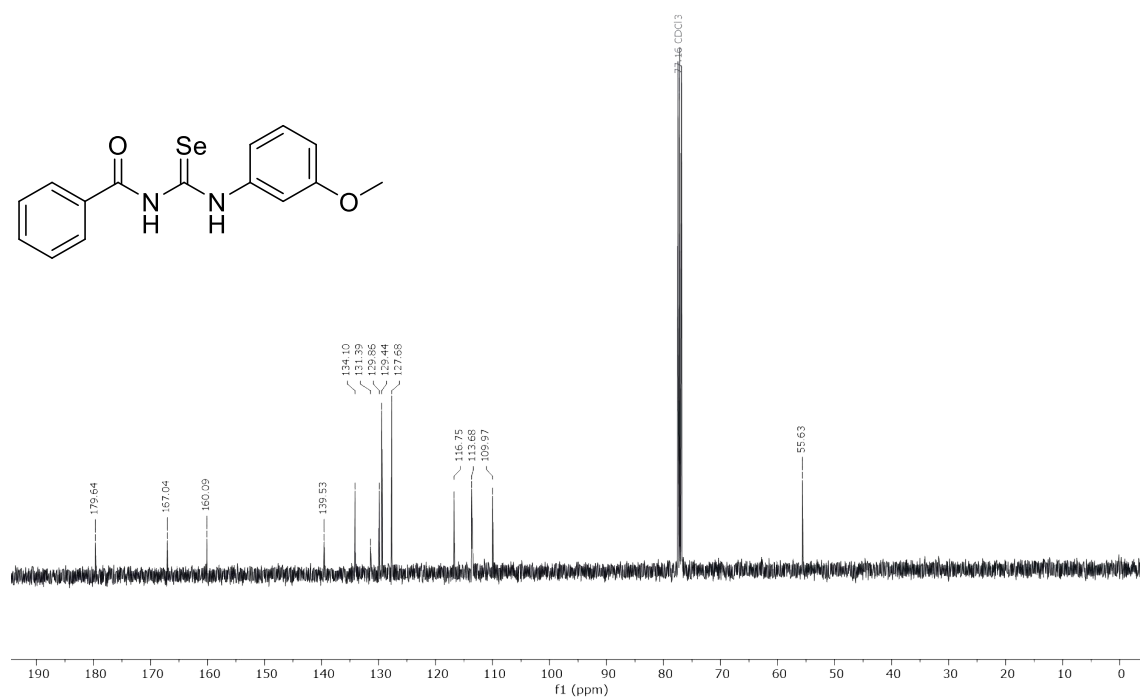


Figura S93: Espectros de RMN de ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) do composto BSU 9.

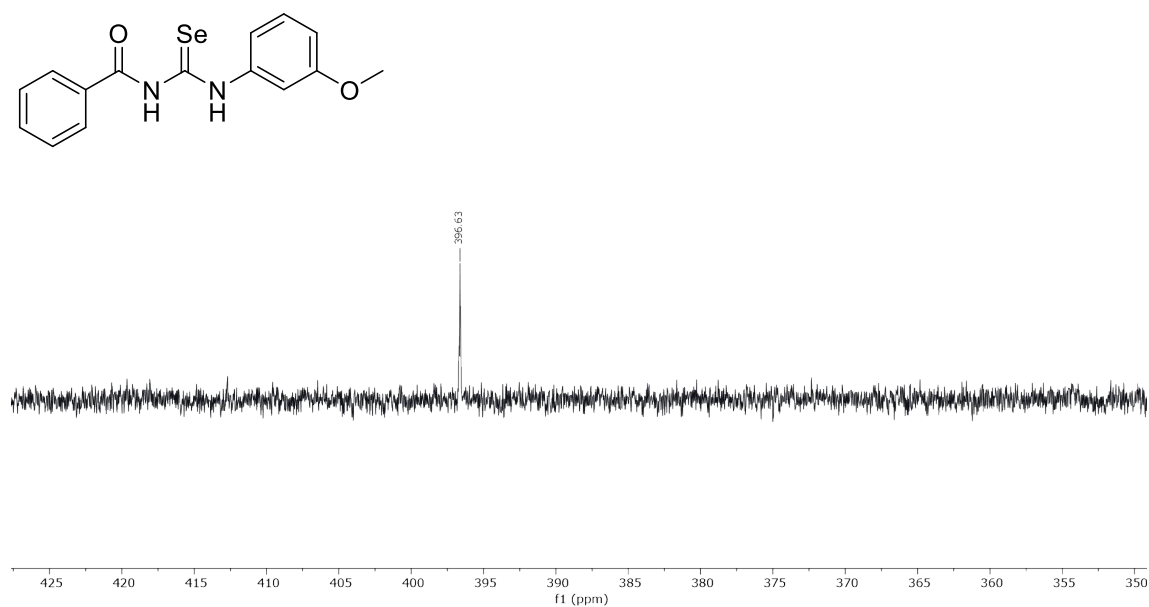


Figura S94: Espectros de RMN de ⁷⁷Se RMN (51.5 MHz, CDCl₃) do composto BSU 9.

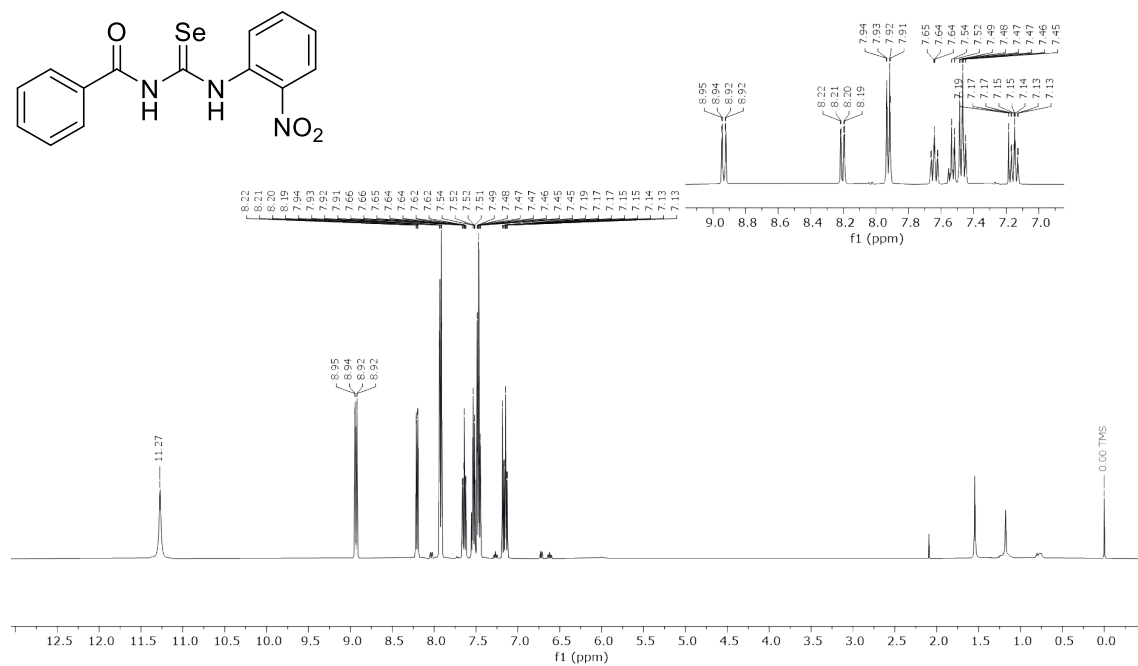


Figura S95 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto BSU 10.

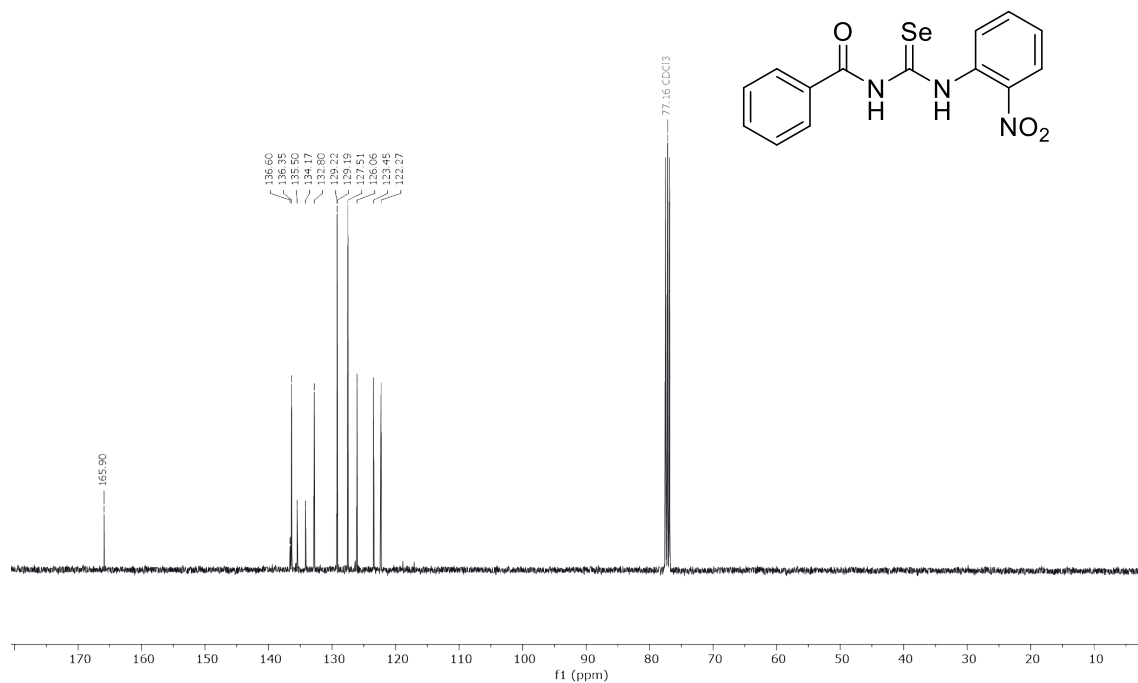


Figura S96: Espectros de RMN de ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) do composto BSU 10.

O=[N+]([O-])c1ccc(NC(=O)N(C(=O)c2ccccc2)S(=O)(=O)c3ccccc3)cc1

Chemical structure: O=[N+]([O-])c1ccc(NC(=O)N(C(=O)c2ccccc2)S(=O)(=O)c3ccccc3)cc1

¹³C NMR peaks (ppm):

Peak Label	Chemical Shift (ppm)
181.40	181.40
167.32	167.32
148.53	148.53
139.63	139.63
134.42	134.42
130.69	130.69
129.91	129.91
129.55	129.55
127.79	127.79
122.25	122.25
119.93	119.93

Figura S98: Espectros de RMN de ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) do composto BSU 11.

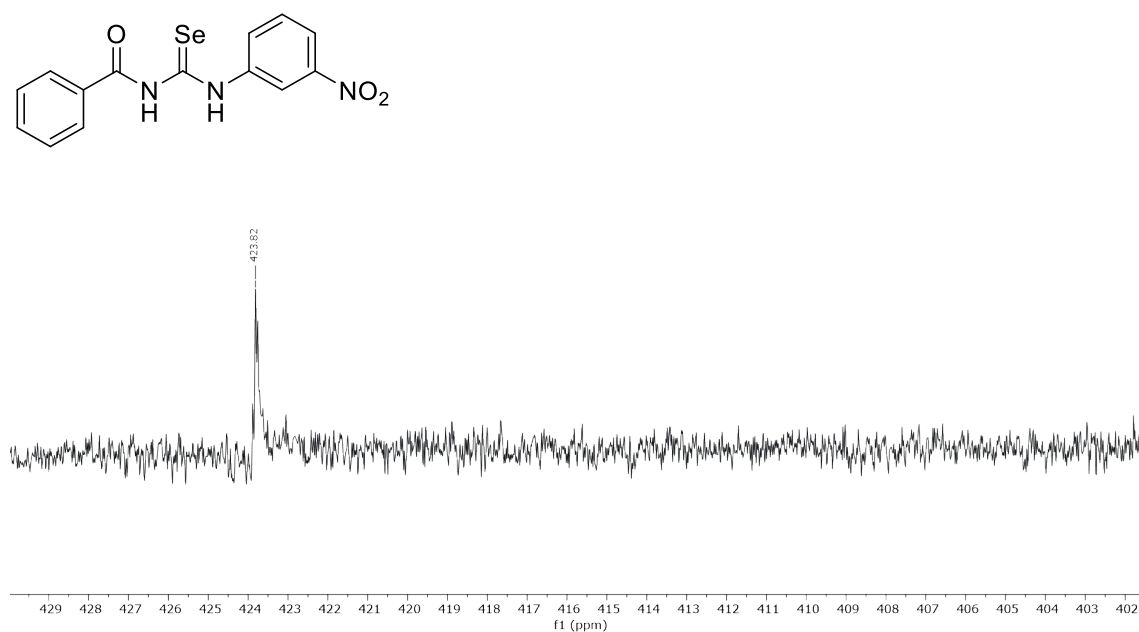


Figura S99: Espectros de RMN de ^{77}Se RMN (51.5 MHz, CDCl_3) do composto BSU 11.

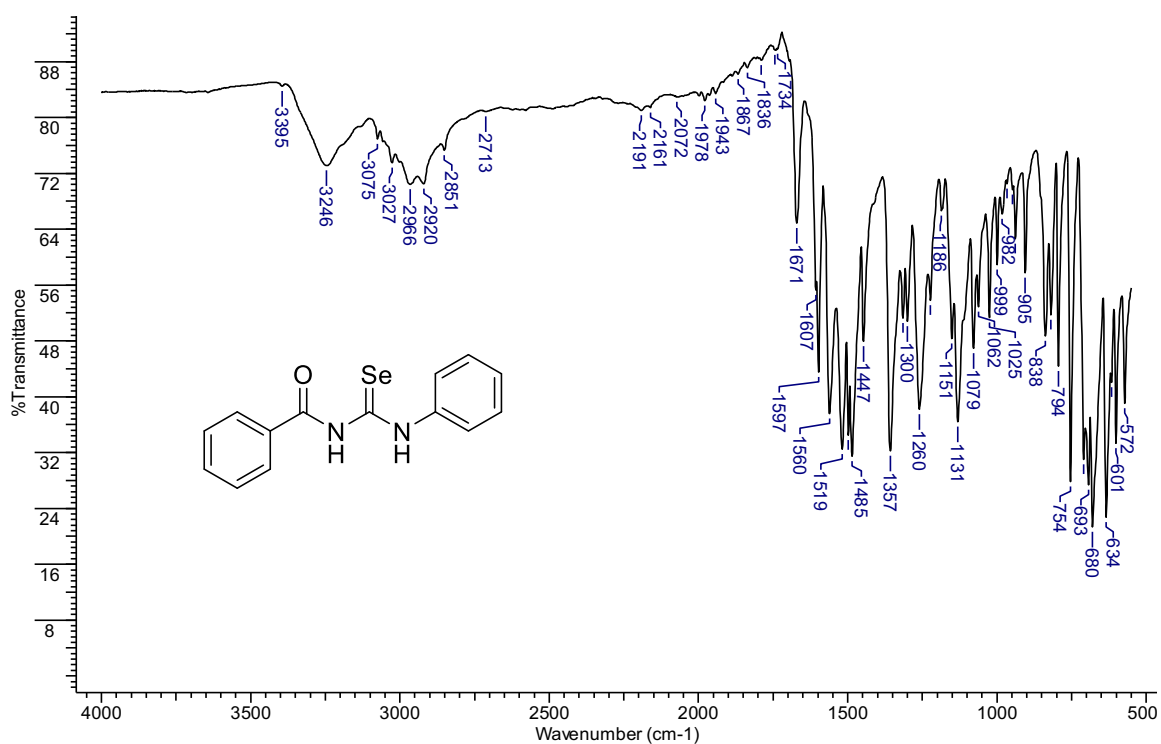


Figura S100: Espectro na região de infravermelho do composto BSU 1.

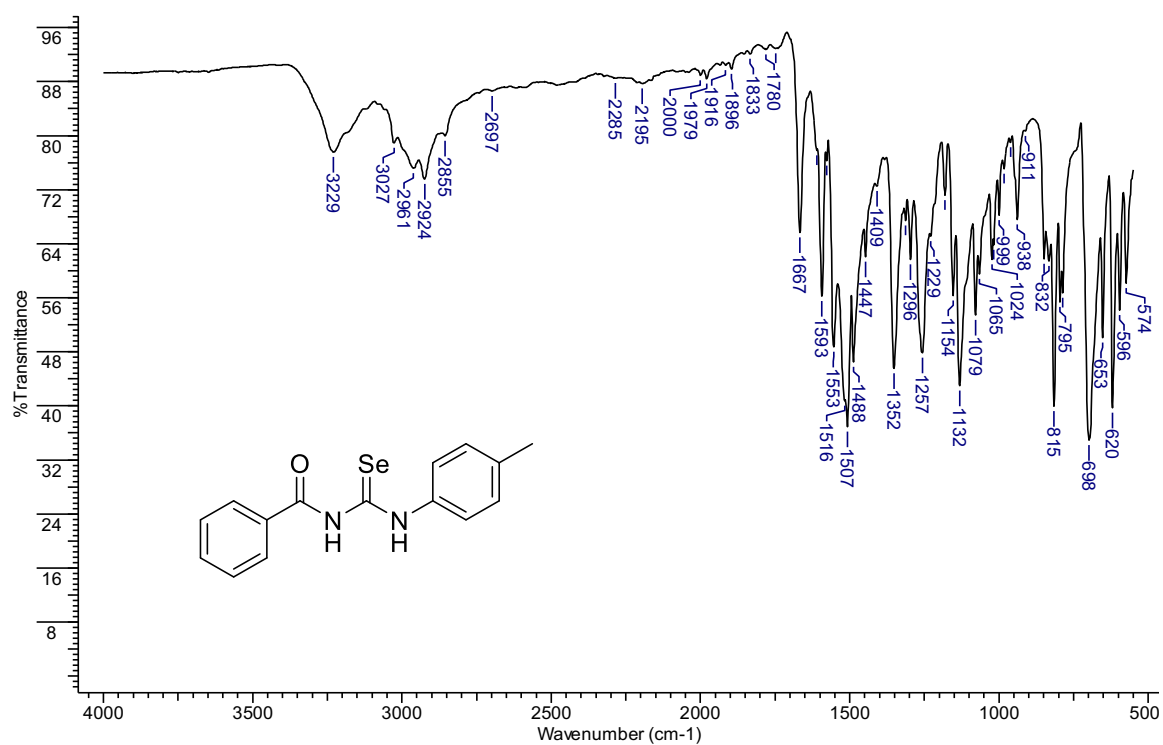


Figura S101: Espectro na região de infravermelho do composto BSU 2.

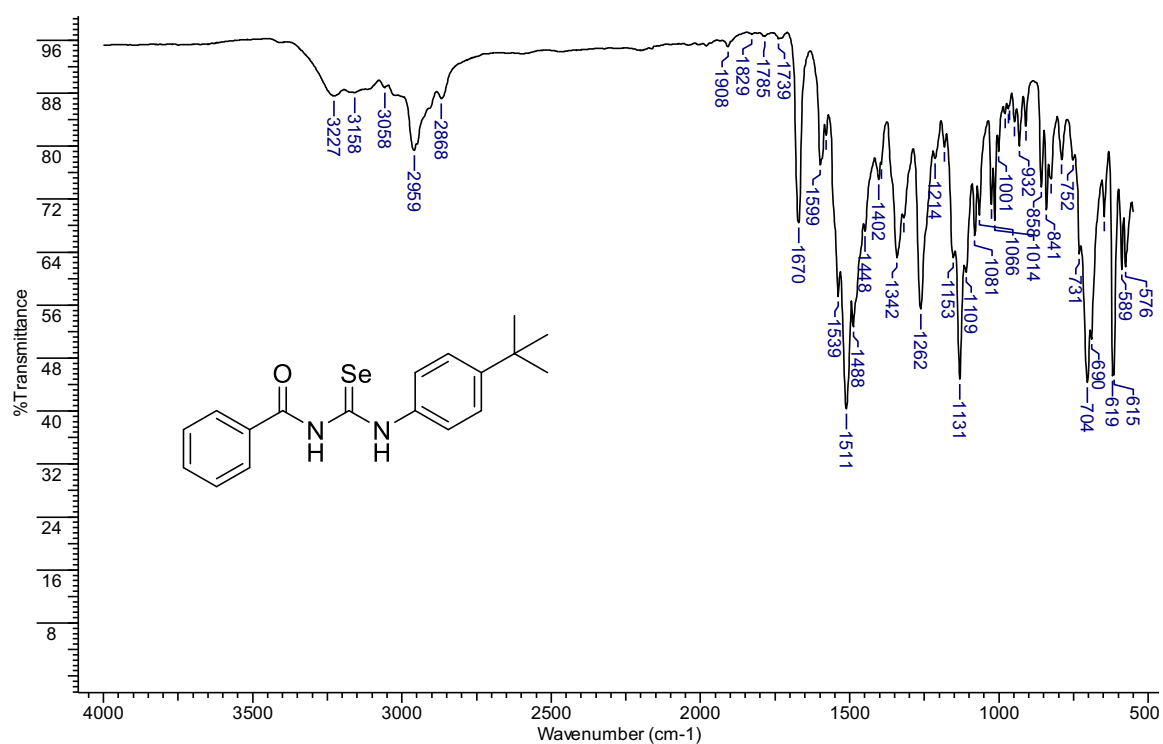


Figura S102: Espectro na região de infravermelho do composto BSU 3.

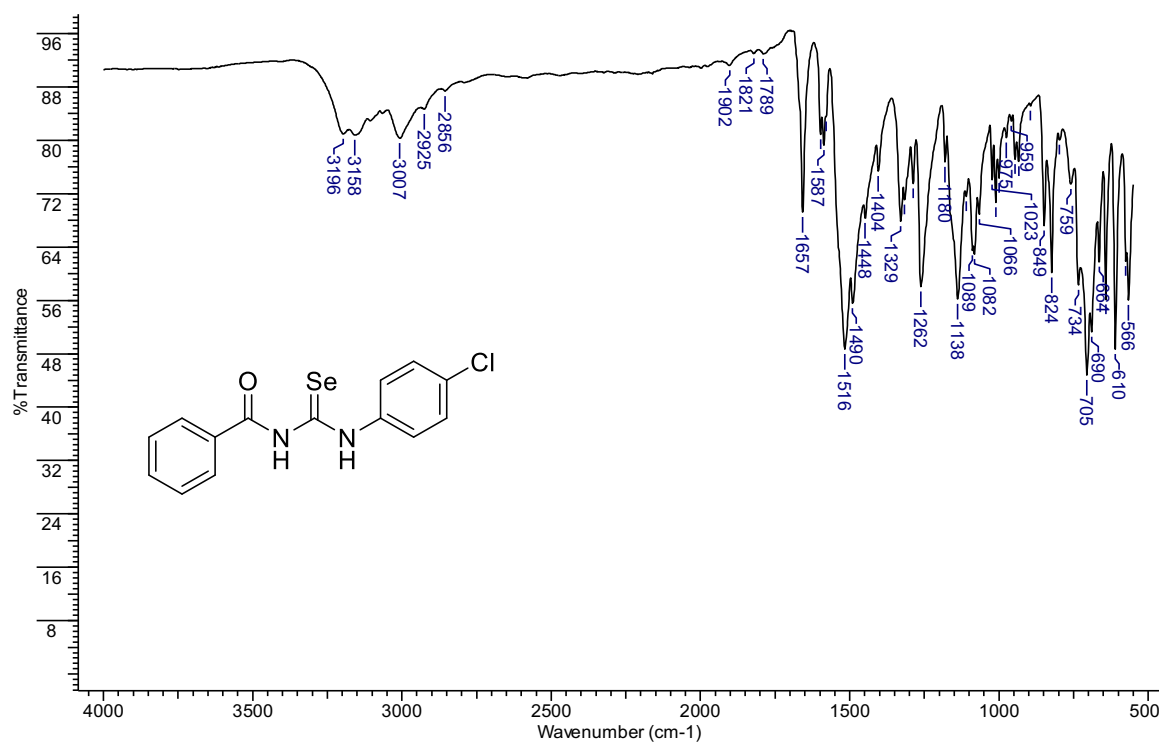


Figura S103: Espectro na região de infravermelho do composto BSU 4.

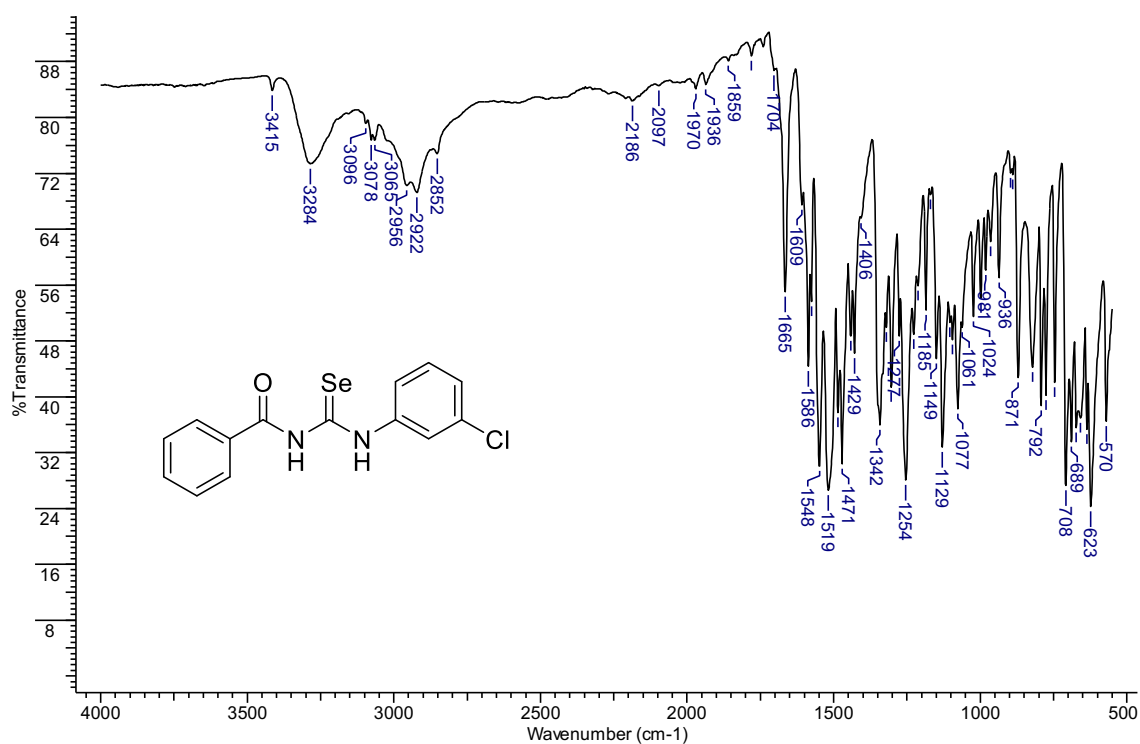


Figura S104: Espectro na região de infravermelho do composto BSU 5.

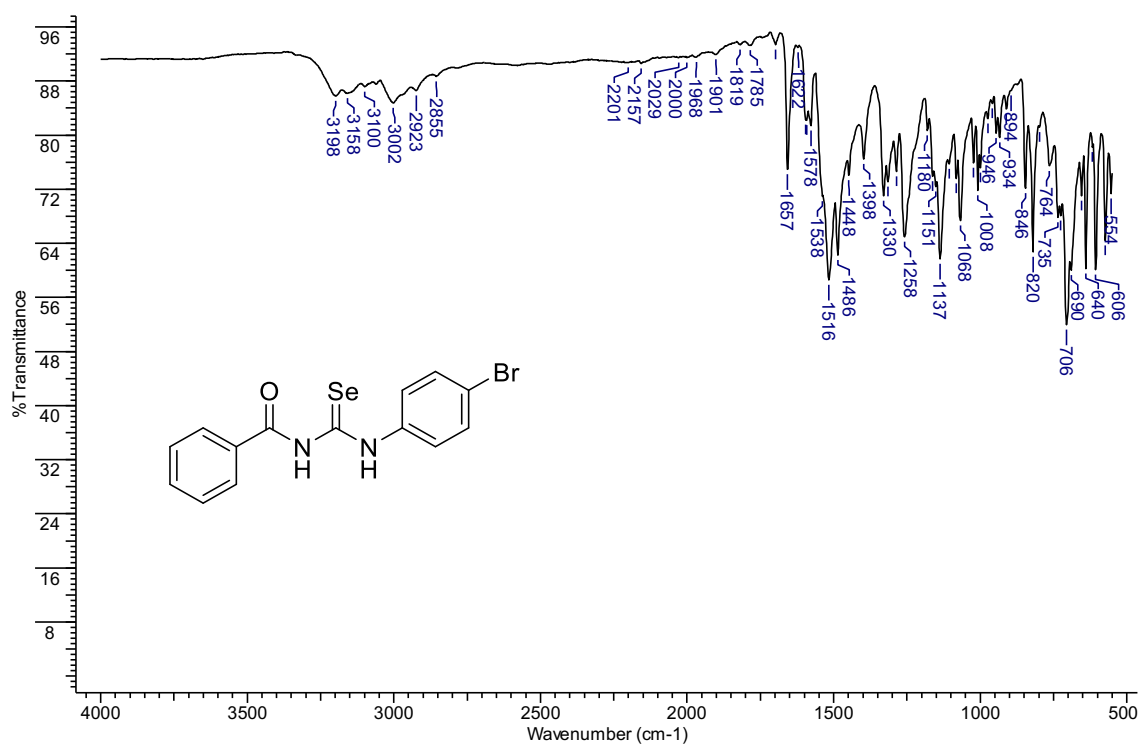


Figura S105: Espectro na região de infravermelho do composto BSU 6.

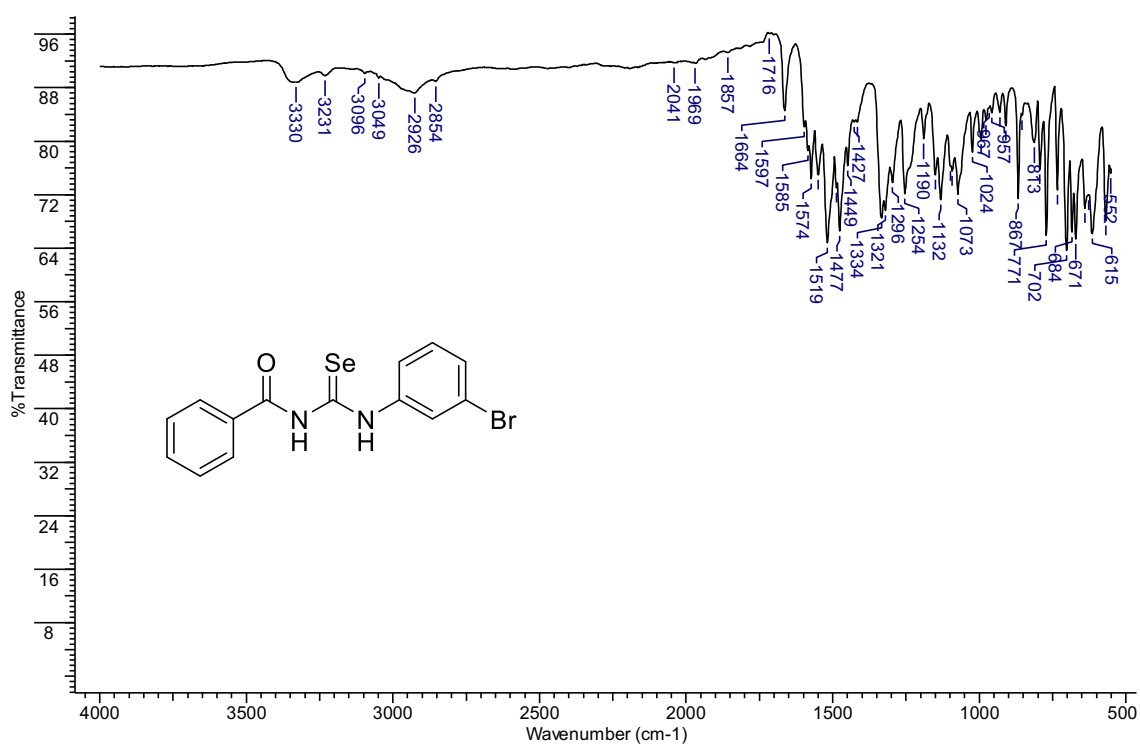


Figura S106: Espectro na região de infravermelho do composto BSU 7.

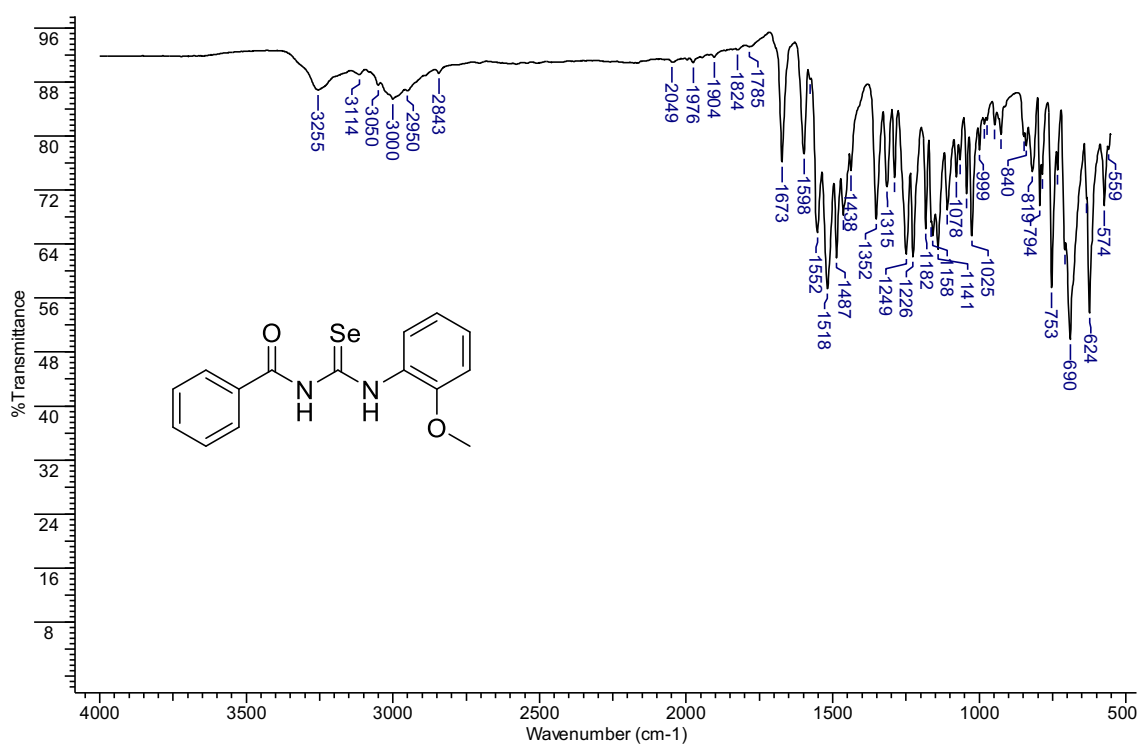


Figura S107: Espectro na região de infravermelho do composto BSU 8.

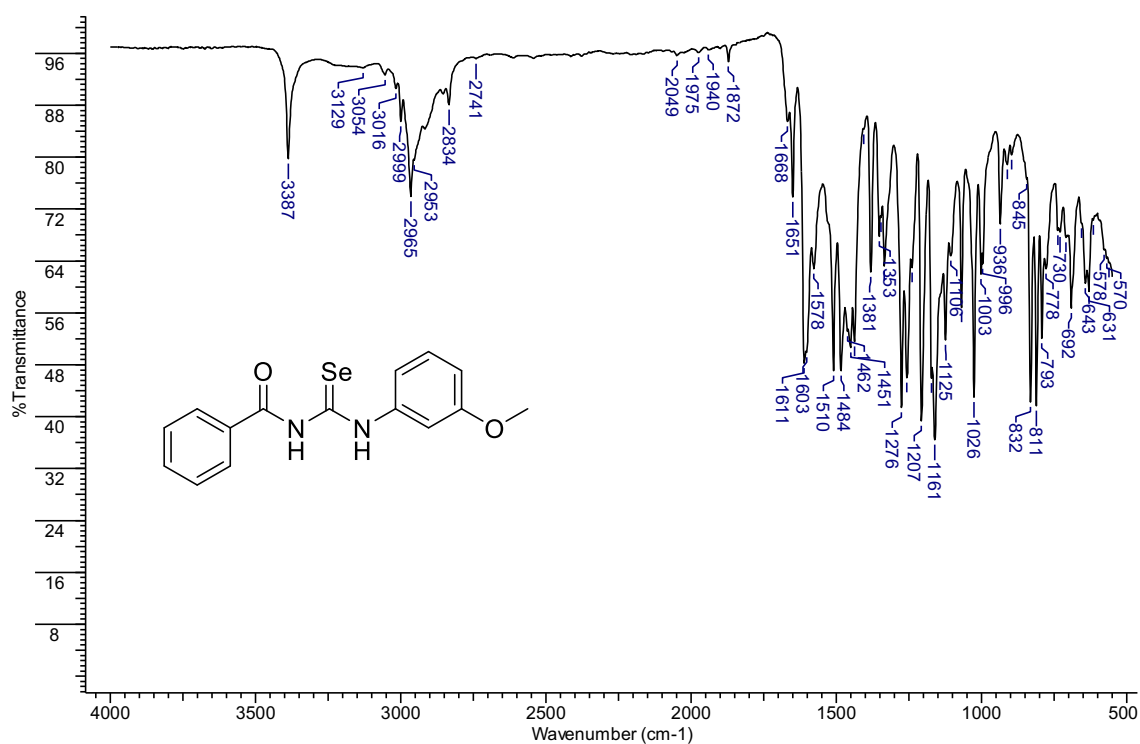


Figura S108: Espectro na região de infravermelho do composto BSU 9.

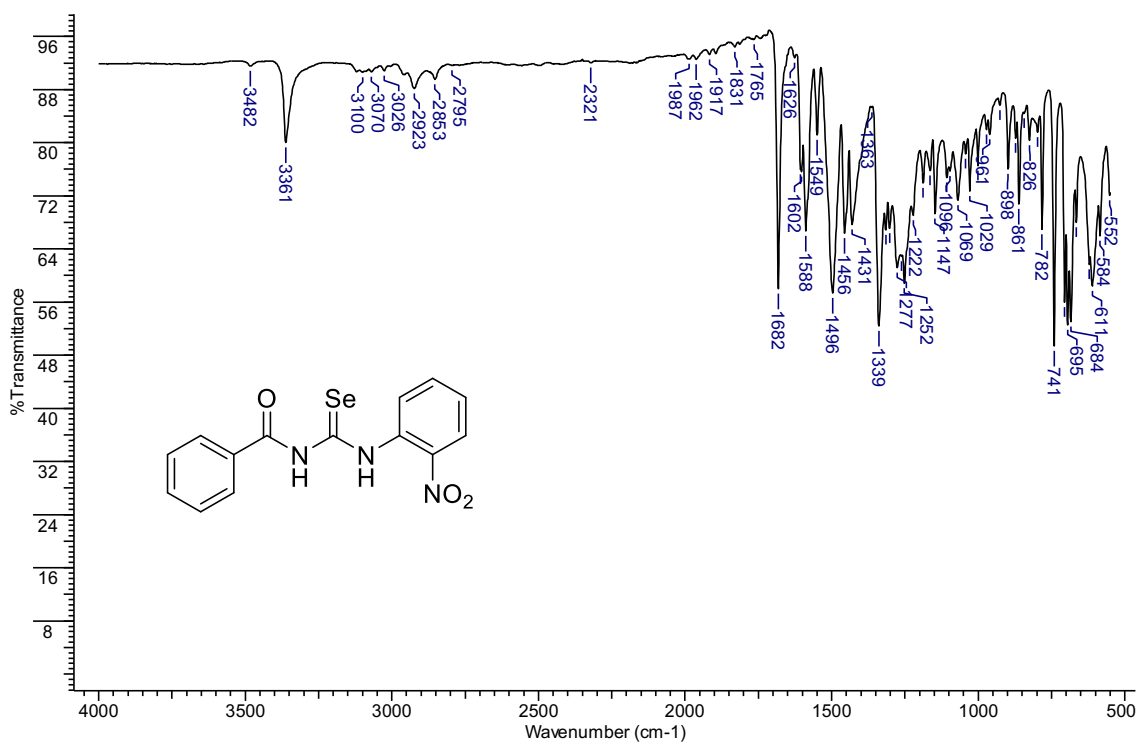


Figura S109: Espectro na região de infravermelho do composto BSU 10.

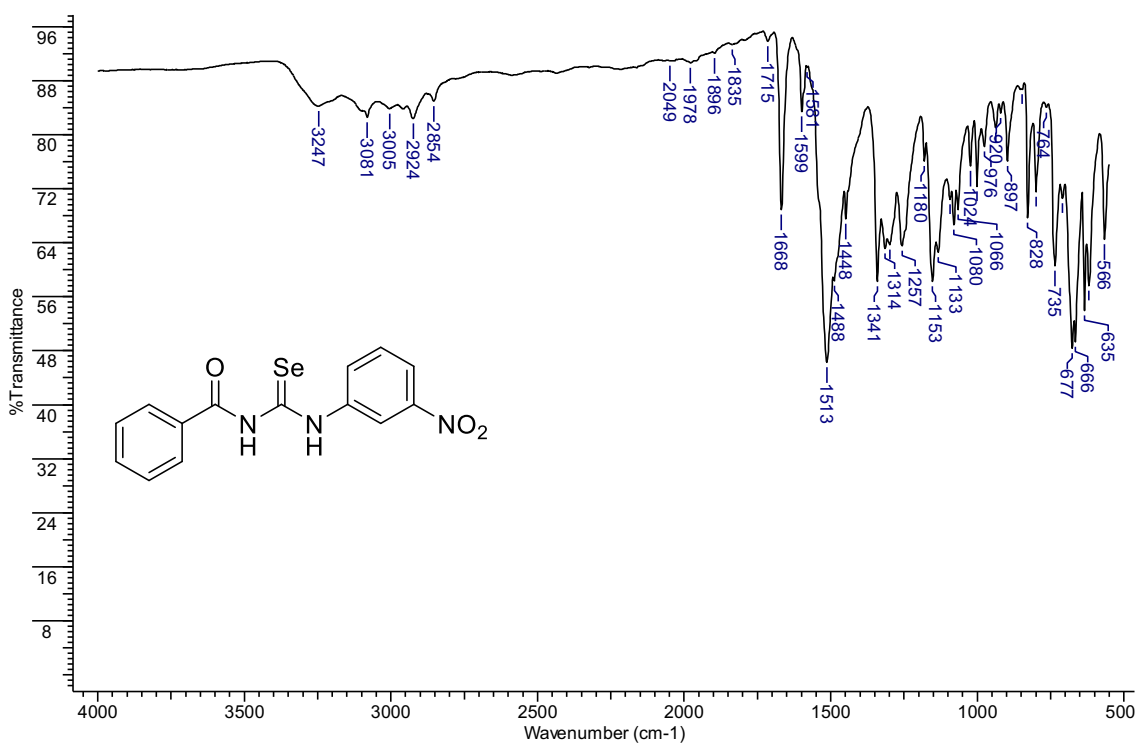


Figura S110: Espectro na região de infravermelho do composto BSU 11.