Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química

TRIAGEM *IN VITRO* DE PRODUTOS NATURAIS E DERIVADOS SINTÉTICOS EM BUSCA DE INIBIDORES DE UREASE

TAINARA DA FONSECA ROSA

Catalão-GO

Novembro de 2020

UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE QUÍMICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

[X] Dissertação [ ] Tese

2. Nome completo do autor

Tainara da Fonseca Rosa

3. Título do trabalho

"Triagem in vitro de produtos naturais e derivados sintéticos em busca de inibidores de urease."

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concordа com a liberação total do documento [X] SIM [ ] NÃO[1]

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:
a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.
Casos de embargo:
- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.

Documento assinado eletronicamente por **Lorena Ramos Freitas De Sousa**, **Professor do Magistério Superior**, em 17/12/2020, às 17:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **TAINARA DA FONSECA ROSA**, **Discente**, em 18/12/2020, às 16:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1753852** e o código CRC **3BF56021**.

Referência: Processo nº 23070.053781/2020-69 SEI nº 1753852

Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química

TRIAGEM *IN VITRO* DE PRODUTOS NATURAIS E DERIVADOS SINTÉTICOS EM BUSCA DE INIBIDORES DE UREASE

TAINARA DA FONSECA ROSA*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão, como requisito final à obtenção do título de mestre em química.

Orientadora: Profa. Dra. Lorena Ramos Freitas de Sousa

*Bolsista CAPES

Catalão-GO

Novembro de 2020

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

Rosa, Tainara da Fonseca
TRIAGEM IN VITRO DE PRODUTOS NATURAIS E DERIVADOS SINTÉTICOS EM BUSCA DE INIBIDORES DE UREASE [manuscrito] / Tainara da Fonseca Rosa. - 2020.
113 f.

Orientador: Prof. Dra. Lorena Ramos Freitas de Sousa.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade Acadêmica Especial de Física e Química, Catalão, Programa de Pós Graduação em Química, Catalão, 2020.
Bibliografia.
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Urease. 2. Helicobacter pylori. 3. Inibidores. I. Sousa, Dra. Lorena Ramos Freitas de, orient. II. Título.

CDU 54

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE QUÍMICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 07 da sessão de Defesa de Dissertação de Tainara da Fonseca Rosa, que confere o título de Mestre(a) em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química da UFG - Regional Catalão

Ao/s vinte e sete dias do mês de novembro de dois mil e vinte, a partir da(s) 14:00 horas, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada "TRIAGEM IN VITRO DE PRODUTOS NATURAIS E DERIVADOS SINTÉTICOS EM BUSCA DE INIBIDORES DE UREASE" na área de concentração em Química. Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Professora Doutora Lorena Ramos Freitas de Sousa (UAEQ/UFCAT) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora Caridad Noda Pérez (UFG), membro titular externo; Professora Doutora Richele Priscila Severino (UAEQ/UFG-RC), membro titular interno cujas participações ocorreram por meio de videoconferência. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestões de pequenas alterações e complementações no trabalho final. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sida a candidata aprovada pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Professora Doutora Lorena Ramos Freitas de Sousa, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos vinte e sete dias do mês de novembro de dois mil e vinte.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Não houve alteração no título

Documento assinado eletronicamente por **Richele Priscila Severino**, **Professora do Magistério Superior**, em 27/11/2020, às 18:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **Lorena Ramos Freitas De Sousa**, **Professor do Magistério Superior**, em 29/11/2020, às 20:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **Caridad Noda Pérez**, **Professor do Magistério Superior**, em 30/11/2020, às 10:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1711192** e o código CRC **081B4F0A**.

Agradecimentos

A Profa. Dra. Lorena Ramos Freitas de Sousa, pela orientação, confiança, dedicação, apoio e por todo o conhecimento transmitido durante esses anos.

Ao Prof. Dr. Rodrigo R. Kitagawa pela realização dos experimentos *in vitro* em *H. pylori* e de *docking* molecular.

A Profa. Dra. Caridad N. Perez por disponibilizar os compostos sintéticos para os ensaios.

Ao Prof. Dr. Paulo C. Vieira por ceder o extrato e os compostos do fungo *F. proliferatum*.

A Profa. Dra. Elaine Rosechrer Carbonero, pelas amostras oriundas do fungo *Pholiota nameko*, dentre as quais foi possível purificar e identificar um composto ativo neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alberthmeiry Teixeira de Figueiredo por disponibilizar o espectrofotômetro ultravioleta e visível.

Ao programa de Pós-Graduação em Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão, bem como todos os professores e técnicos, que de maneira direta e indireta fizeram parte desses anos de mestrado.

A CAPES pela bolsa concedida, cujo suporte financeiro foi primordial para a dedicação neste trabalho de forma integral.

Aos meus pais, Eliana e Wanderluiz, a quem devo a maioria das minhas conquistas, pois sempre me incentivaram nessa caminhada e fizeram muito esforço para que pudesse me dedicar aos estudos.

A minha irmã, Thais, por sempre estar ao meu lado torcendo pelo meu sucesso e me guiar nos momentos difíceis, e meu sobrinho Arthur, por tanta alegria.

Aos meus amigos, Nathália e José Guilherme, pelo apoio e incentivo, fazendo me sentir mais forte e preparada para concluir essa jornada. A Priscilla pelo apoio e momentos de descontração, e a Léia por sempre escutar minhas preocupações/reclamações e me mostrar o lado positivo, além das inúmeras discussões produtivas.

A Deus, por ter me guiado pelo caminho até atingir esse objetivo.

Índice de figuras

Figura 1. Estruturas dos fármacos utilizados no tratamento de infecção caudados pela *H. pylori.* Amoxicilina (**1**), metronidazol (**2**), claritromicina (**3**) e omeprazol (**4**), lansoprazol (**5**), rabeprazol (**6**).....21

Figura 2. Representação simplificada da hidrólise da ureia catalisada por urease.....23

Figura 3. Sítio ativo da urease. **A)** Representação espacial do sítio ativo da urease (PDB ID: 4GY7). **B)** Representação bidimensional do sítio ativo da urease (adaptado de LAGE et al., 2018).....24

Figura 4. Proposta de mecanismo da hidrólise da ureia, adaptado de IBRAR et al., 2013.....25

Figura 5. Núcleo básico das chalconas.....32

Figura 6. Mecanismo de condensação de Claisen-Schmidt.....32

Figura 7. Chalconas com atividade anti-*H. pylori.* Licochalcona A (**36**), estruturas **37**, **38** e **39** são análogos da 3′,4′,5′-trimetoxichalcona. Fonte: LAI et al., 2010.....33

Figura 8. Estrutura de fármacos oriundos de fungos. Penicilina G (benzilpenicilina) (**40**), Taxol (paclitaxel) (**41**), Vincristina (**42**). Fonte: ALY et al., 2011; CHAPLA et al., 2013; JALGAONWALA et al., 2011.....35

Figura 9. Compostos isolados do fungo *Fusarium proliferatum.* Ergosta-5,7,22-trien-3β-ol (**43**), fusarubina (**44**), moniliformina (**45**), beauvericina (**46**), fumonisina B1 (**47**), fumonisina B2 (**48**), fumonisina B3 (**49**) e ácido fusárico (**50**). Fonte: DAME et al., 2015; RHEEDER et al., 2002.....36

Figura 10. Gráficos ilustrativos de Lineweaver-Burk. **A)** Gráfico de um inibidor competitivo; **B)** Gráfico de um inibidor não-competitivo; **C)** Gráfico de um inibidor incompetitivo. (Adaptado de COPELAND, 2000).....38

Figura 11. Etapas reacionais do ensaio enzimático de UJB.....55

Figura 12. Curva de calibração. **A)** gráfico: ABS *versus* concentração de ureia (mmol/L); **B)** Coloração observada após as etapas reacionais, sendo a cor proporcional a formação de azul de indofenol.....56

Figura 13. Gráfico de Lineweaver-Burk utilizado para determinação experimental dos valores de K_m e $V_{máx}$ da UJB. 57

Figura 14. Gráfico da atividade (%) da UJB *versus* a concentração da tioureia, usado para determinar a concentração molar da urease. 58

Figura 15. Inibição dos compostos **1a-1h**, **2a-2q**, **3a-3i** e **4a-4c** frente à enzima UJB na concentração de 5 µmol/L.....59
Figura 16. Estruturas da chalconas que apresentaram maior inibição frente a UJB e foram determinados os valores de $IC_{50.}$ 60
Figura 17. Principais características das chalconas (**1a-1h**) que influenciaram na inibição da UJB. Destacado em vermelho os substituintes que favoreceram a atividade inibitória e em azul os grupos que causaram a diminuição do potencial inibitório. 61
Figura 18. Principais características das estruturas das chalconas **2a-2q**, que influenciaram na inibição da UJB.....61
Figura 19. Percentual de inibição dos compostos **5a-5e** testados frente à UJB na concentração de (5 µmol/L).....62
Figura 20. Sítio catalítico das enzimas UHP e UJB. **A)** Sítio da UHP evidenciando o carboxilato e os resíduos de His responsáveis por coordenar os átomos de níquel (representados na forma de esferas, na cor cinza). **B)** Sobreposição das enzimas UHP e UJB, evidenciando a conservação do sítio catalítico entre estas duas enzimas.....65
Figura 21. Resultado do *docking* para o composto **1h**. **A)** Pose de *docking* no sítio ativo da UHP demostrando as interações entre a molécula **1h** e os íons de níquel. **B)** Detalhe da estabilização do grupamento hidrofóbico pelos aminoácidos mais externos do sítio ativo. 67
Figura 22. Resultado do *docking* para o composto **2a**. **A)** Pose de *docking* de **2a** no sítio catalítico da enzima UHP. **B)** Detalhe das interações favoráveis nesta região.....68
Figura 23. Sobreposição das poses de docking de **1h** e **2a** no interior do sítio ativo de UHP.....68
Figura 24. Resultado do *docking* para o composto **1c**. **A)** Sobreposição das poses consensuais de **1c** no sítio ativo da UHP. **B)** Estabilização da chalcona **1c** no sítio ativo por meio de contribuições hidrofóbicas. 69
Figura 25. Sobreposição das poses de docking de **1c** e **1h** no interior do sítio ativo de UHP. 69
Figura 26. Resultado de *docking* para os compostos **2c** e **2m. A)** Pose do *docking* para a chalcona **2c**; **B)** Pose do *docking* para a chalcona **2m**.....70
Figura 27. Gráfico representando os dados cinéticos do composto **1h** pelo método de Lineweaver-Burk, indicando um inibidor competitivo. 71
Figura 28. Gráfico representando os dados cinéticos do composto **2a** pelo método de Lineweaver-Burk, indicando um inibidor competitivo.....71

Figura 29. Gráfico representando os dados cinéticos do composto **2c** pelo método de Lineweaver-Burk, indicando um inibidor competitivo.....72
Figura 30. Gráfico representando os dados cinéticos do composto **2m** pelo método de Lineweaver-Burk, indicando um inibidor competitivo.....72
Figura 31. Gráfico representado os dados cinéticos pelo método de método de Lineweaver-Burk do composto **1c**, indicando um inibidor não competitivo.....73
Figura 32. Reação de redução da resazurina.....72
Figura 33. Avaliação da atividade Anti-*H. Pylori*. **A)** placa do teste dos compostos **1a-1h, 2a-2c**, **2e-2l**, **2n-2q**, **3a-3c** e **4a-4c**, utilizando o método colorimétrico com a redução da resazurina, em vermelho o resultado da chalcona **2c. B)** Estrutura do composto **2c** que apresentou CIM e CBM de 0,97 mmol/L.....72
Figura 34. Gráfico representando os dados cinéticos pelo método de Lineweaver-Burk do composto **5a**, indicando um inibidor competitivo.....79
Figura 35. Gráfico representando os dados cinéticos pelo método de método de Lineweaver-Burk do composto **5b**, indicando um inibidor competitivo.....80
Figura 36. Resultado de *docking* para o composto **5b. A)** Pose do evidenciando *docking* para o composto **5b**, demostrando seu modo de interação na região do sítio ativo. **B)** Representação da superfície de van der Waals dos aminoácidos envolvidos na estabilização da molécula, evidenciando a complementaridade de **5b**.....83
Figura 37. Resultado de *docking* para **5c**. **A)** As principais interações com os aminoácidos Lys219, His221, Asp223, His322, Arg338 e Met366. **B)** Representação da superfície de van der Waals dos aminoácidos envolvidos na estabilização da molécula, evidenciando a complementaridade de **5c** com o sítio ativo.....80
Figura 38. Resultado de *docking* para o composto **5d**. **A)** Interações com os aminoácidos Asp32, Met366, Cys321, His322. **B)** Representação da superfície de van der Waals dos aminoácidos envolvidos na estabilização da molécula, demonstrando a complementaridade de **5d** com o sítio ativo.....84
Figura 39. Resultado de *docking* para o composto **5e**. **A)** Localização do sítio ativo (destacado em azul), da região de interação no sítio (destacado em vermelho) e do modo de ligação da estrutura **5e**, mais à superfície (destacada em amarelo). **B)** Principais interações hidrofóbicas da estrutura na região mais externa ao sítio ativo.....85
Figura 40. Resultado de *docking* para o composto **5a**, a sua estabilização ocorre na região mais externa à superfície da UHP. **A)** Localização do sítio ativo (destacado em azul), da região de interação no sítio (destacado em vermelho) e do modo de ligação da estrutura

5a, mais à superfície (destacada em amarelo). **B)** principais interações com os resíduos de aminoácidos Cys321, Met366, Met317, Ala365 e Arg368.....86
Figura 41. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d6, 400 MHz) do composto **6a**.....87
Figura 42. Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d6, 400 MHz) do composto **6a**.....88
Figura 43. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-d6, 200 MHz) do composto **6a**.....88
Figura 44. Experimento de DEPT 135 (DMSO-d6, 200 MHz) do composto **6a**.....89
Figura 45. Mapa de contorno COSY (DMSO-d6, 400 MHz) do composto **6a**.....89
Figura 46. Mapa de contorno HSQC (DMSO-d6, 400 MHz) do composto **6a**.....90
Figura 47. Mapa de contornos HMBC (DMSO-d6 400 MHz) do composto **6a**.....91
Figura 48. Precipitado (**6a**) obtido do extrato do fungo *Pholiota nameko***. A)** Composto **6a** antes do processo de purificação por recristalização. **B)** Composto **6a** após a recristalização.....92
Figura 49. Espectros de RMN ^{1}H do composto **6a** antes e após o procedimento de recristalização.....92
Figura 50. Ampliação dos espectros de RMN ^{1}H do composto **6a** antes e após a purificação por recristalização. **A)** RMN ^{1}H do precipitado obtido do fungo; **B)** RMN ^{1}H obtido após a recristalização do D-manitol contido no precipitado.....93
Figura 51. Representação dos gráficos de *Bioavailability radar*. Limites da area rosa: LIPO (lipofilicidade) -0,7 < XLogP3 < 5,0; SIZE (tamanho da molécula) 150 g/mol < MM < 500 g/mol; POLAR (polaridade) 20 $Å^2$ < PSA < 130 $Å^2$; INSOLU (insolubilidade) 0 < LogS < 6; INSATU (insaturação) 0 < fração Csp^2 ou Csp < 0,25; FLEX (flexibilidade) 0 < nLR < 9.....99

Índice de tabelas

Tabela 1. Estruturas e os respectivos valores de IC_{50} dos compostos com potencial inibitório superior ao padrão listado na literatura, tioureia (IC_{50} 13 – 26 µmol/L).....26
Tabela 2. Estruturas dos compostos testados frente a UJB.....46
Tabela 3. Valores de IC_{50} das chalconas expressos em µmol/L.....63
Tabela 4. Resultados do ensaio *in silico* para as chalconas **1c**, **1h**, **2a, 2c** e **2m**……65
Tabela 5. Dados cinéticos enzimáticos dos compostos **1h, 2a**, **2c**, **2m** e **1c**, respectivamente.....75
Tabela 6. Valores de IC_{50} expressos em µmol/L dos compostos **5a – 5e**.....78
Tabela 7. Dados cinéticos enzimáticos dos compostos **5a** e **5b**.....81
Tabela 8. Resultados do ensaio *in silico* para os compostos de **5a** a **5e**.....82
Tabela 9. Dados espectroscópicos de RMN (400 MHz, DMSO-d6) do composto **6a** comparado com dados da literatura (δ em ppm).....91
Tabela 10. Ensaio *in silico* para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos dos compostos **1a-6a**.....95

Lista de abreviaturas e siglas

ABS	Absorbância
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
IARC	Agência Internacional de Pesquisa do Câncer
Ala	Alanina
PSA	Área de superfície polar
Arg	Arginina
Asp	Aspartato
BHI	*Brain heart infusion*
LogP	Coeficiente de partição em n-octanol e água
λ	Comprimento de onda (nm)
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
IC_{50}	Concentração necessária para inibir em 50% do alvo
J	Constante de acoplamento
K_i	Constante de dissociação de complexo enzima-inibidor
K_{cat}	Constante catalítica
K_M	Constante de Michaelis Menten
[E]	Concentração de enzima
[I]	Concentração de inibidor
[S]	Concentração de substrato
COSY	*Correlation Spectroscopy*
Cys	Cisteína
DEPT	*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*
DMSO	dimetilsulfóxido
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DMSO-d_6	dimetilsulfóxido deuterado

HMBC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
H. pylori	*Helicobacter pylori*
His	Histidina
IBP	Inibidor da bomba de prótons
Lys	Lisina
MM	Massa Molar
Met	Metionina
m	Multipleto
MALT	*Musoca-associated lymphoid tissue*
nALH	Número de grupos aceptores de ligação hidrogênio
nDLH	Número de grupos doadores de ligação hidrogênio
nLR	Número de ligações rotáveis
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde/*World Health Organization*
PBP	*Penicillin-Binding Proteins*
PN	Produto Natural
PDB	*Protein Data Bank*
RM	Refratatividade Molar
RO5	Regra dos cinco/*Rule of five*
UHP	Urease de *H. pylori*
UJB	Urease de *jack bean*
Val	Valina
V	Velocidade
V_0	Velocidade Inicial
$V_{máx}$	Velocidade máxima
WDI	*World Drug Índex*

Resumo

A *Helicobacter pylori* é uma bactéria que reside no estômago e está associada a diversas doenças do sistema gastrointestinal. Sua sobrevivência e replicação está relacionada à atividade enzimática da urease, permitindo a bactéria resistência à acidez gástrica. Fármacos antimicrobianos são usados frente à *H. pylori*, no entanto existem casos de resistência antibiótica. Diante da necessidade por novos agentes antibacterianos este estudo teve como objetivo a investigação de compostos de origem natural e sintética frente a urease de *Canavalia gladiata* (UJB). A triagem *in vitro* dos compostos e Produtos Naturais (PNs) foi realizada utilizando o método espectrofotométrico de medição do produto reacional azul de indofenol à $\lambda = 600$ nm. A padronização do ensaio foi realizada pelo estudo de cinética enzimática da UJB e os dados de K_m, $V_{máx}$ e K_{cat} foram determinados (4,25 ± 0,62 mmol/L, 44,34 ± 1,33 mmol/L/min e 2062,3 s^{-1}, respectivamente) sendo similares aos valores da literatura. Dentre as 37 chalconas avaliadas nove apresentaram inibição significativa (**1a**, **1c**, **1g**, **1h**, **2a**, **2b**, **2c**, **2d** e **2m**) com potência inibitória variando entre IC_{50} = 5,7 e 18,8 µmol/L. O mecanismo de inibição foi determinado por ensaios *in vitro* e *in silico*, sendo as chalconas **1h (**K_i = 2,98 µmol/L), **2a (**K_i = 6,19 µmol/L), **2c (**K_i = 1,87 µmol/L) e **2m (**K_i = 3,13 µmol/L) inibidores competitivos e a chalcona **1c (**K_i = 17,3 µmol/L) inibidor não-competitivo. As chalconas **2c** e **2m** apresentaram os melhores valores de CIM (250 e 128 µg/mL, respectivamente) anti-*H. pylori* em ensaios *in vitro*. Dentre os PNs avaliados, cinco compostos oriundos do fungo *Fusarium proliferatum* (**5a–5e**) também foram inibidores de UJB, dentre os quais os compostos **5a** e **5b** foram os mais potentes, sendo inibidores competitivos de urease (K_i de 0,55 e 1,1 µmol/L). Cristais obtidos do extrato ativo do cogumelo *Pholiota nameko* foram analisados por RMN 1D e 2D e o composto foi identificado como manitol, o qual apresentou um valor de IC_{50} de 35,5 µmol/L frente à urease. A atividade inibitória enzimática do manitol poderia ser uma explicação para a atividade gastroprotetora e anti-*H. pylori* encontrada em trabalhos anteriores. Através de triagem *in silico* as propriedades farmacocinéticas de todos os compostos foram investigadas. Além de investigar a biodisponibilidade desses compostos, foi possível aliar esses resultados para entender o comportamento das chalconas nos ensaios *in vitro* em *H. pylori*. Através dos ensaios *in vitro* e *in silico* foi possível encontrar novos e promissores inibidores de UJB.

Palavras chaves: Urease, *Helicobacter pylori,* Inibidores.

Abstract

Helicobacter pylori is a bacteria living in the stomach and it's associated with several diseases in the gastrointestinal system. The survival and replication of *H. pylori* is related to the enzymatic activity of urease, which allow the resistance of bacteria to gastric acidity. Antimicrobial drugs are used against *H. pylori*, but there are occurrence of antibiotic resistance. In the view of the need for new antibacterial agents, this study aimed to investigate new compounds, of natural and synthetic source against urease. *In vitro* screening of compounds and Natural Products (NPs) was performed using the spectrophotometric method by measuring the reaction product (indophenol blue) at λ = 600 nm. The enzyme kinetics study of urease (*Canavalia gladiata*) (UJB) was performed for assay standard and the K_m, V_{max} and K_{cat} data (4.25 ± 0.62 mmol/L, 44.34 ± 1.33 mmol/L/min and 2062.3 s^{-1}, respectively) were found similar to literature. Among the 37 chalcones assessed, nine showed significant inhibition (**1a**, **1c**, **1g**, **1h**, **2a**, **2b**, **2c**, **2d** and **2m**) with inhibitory potency ranging between IC_{50} = 5.7 and 18.8 µmol/L. The inhibition mechanism was determined for the most potent compounds by *in vitro* and *in silico* assays, which chalcones **1h** (K_i = 2.98 µmol/L), **2a** (K_i = 6.19 µmol/L), **2c** (K_i = 1.87 µmol/L), and **2m** (K_i = 3.13 µmol/L) showed competitive behavior and **1c** non-competitive (K_i = 17.3 µmol/L). Chalcones **2c** and **2m** revealed the best MIC values (250 and 128 µg/mL, respectively) anti-*H. pylori in vitro*. Among NPs evaluated, five compounds from the fungus *Fusarium proliferatum* (**5a-5e**) were also inhibitors of UJB, which compounds **5a** and **5b** showed lower IC_{50} values with competitive behavior on urease (K_i of 0.55 and 1.1 µmol/L). Crystals obtained from the active extract of *Pholiota nameko* mushroom were analysed by 1D and 2D NMR experiments, and the compound was characterized as mannitol, which showed an IC_{50} value of 35.5 µmol/L on UJB. The inhibitory enzymatic activity by mannitol could be a clue for the gastroprotective action and anti-*H. pylori* potential found in previous work. By *in silico* screening, the pharmacokinetic properties of all compounds were investigated using Lipinski's Rule of Five (RO5) as the main parameter. In addition to bioavailability study of these compounds, it was possible to use the obtained results to understand better the chalcones behavior (**2c** and **2m**) revealed on *H. pylori in vitro* assay. By using *in vitro* and *in silico* tests it was possible to find new and promising UJB inhibitors.

Key words: Urease, *Helicobacter pylori*, Inhibitors.

Sumário

1. Introdução 19
1.1 *Helicobacter pylori* 19
1.1.1 Sobrevivência da *H. pylori* 20
1.1.2 Tratamento utilizado em infecções causadas por *H. pylori* 21
1.2 Enzima urease 22
1.2.1 Inibidores de urease 26
1.3 Chalconas 32
1.4 Bioatividade de compostos oriundos de produtos naturais 34
1.4.1 *Fusarium proliferatum* 35
1.5 Mecanismo de inibição enzimática *in vitro* e uso de ferramentas computacionais para o planejamento de compostos *Hits* 37
1.5.1 Ensaios *in vitro* e mecanismo de inibição enzimática 37
1.5.2 Estudo *in silico* no planejamento de compostos *Hits* 39
1.5.2.1 *Docking* ou docagem molecular 39
1.5.2.2 Estudo de parâmetros farmacocinéticos *in silico* 40
1.5.2.3 Regra dos cinco (*Rule of five – RO5*) 41
2. Objetivos 43
2.1 Objetivo Geral 43
2.2 Objetivos específicos 43
3. Parte experimental 44
3.1 Reagentes e solventes 44
3.2 Procedimentos experimentais 44
3.2.1 Preparo dos reagentes 44
3.2.2 Curva padrão de ureia 45
3.2.3 Determinação dos parâmetros cinéticos: constante de Michaelis Menten (K_m) e a Velocidade máxima ($V_{máx}$) 45
3.2.4 Determinação da concentração molar da enzima UJB 46
3.2.5 Triagem das amostras 46
3.2.6 Determinação dos valores de IC_{50} 50
3.2.7 Determinação do mecanismo de inibição 51

3.2.8 Procedimento de recristalização do manitol e análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 52
3.2.9 Avaliação da atividade anti *H. pylori* 52
3.2.9.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) 53
3.2.10 *Docking* molecular 53
3.2.11 Avaliação da biodisponibilidade oral *in silico* 53
4. Resultados e Discussões 55
4.1 Parâmetros de cinética enzimática da UJB 56
4.2 Triagem das amostras 57
4.3 Potência inibitória, mecanismo, docking e atividade anti-*H. pylori* das chalconas 61
4.3.1 Determinação do valor de IC_{50} para as chalconas 61
4.3.2 *Docking* molecular das chalconas 63
4.3.3 Mecanismo de inibição das chalconas 69
4.3.4 Avaliação da atividade anti-*H. pylori* das chalconas 74
4.4 Potência inibitória, mecanismo e docking dos compostos oriundos do fungo *F. proliferatum* 76
4.4.1 Determinação do valor de IC_{50} para o extrato (EFp) e compostos isolados do fungo F. proliferatum 76
4.4.2 Mecanismo de inibição dos compostos oriundos do fungo F. proliferatum 78
4.4.3 *Docking* molecular dos compostos isolados do fungo *F. proliferatum* 80
4.5 Identificação do composto **6a** de *Pholiota nameko* por técnicas espectroscópicas e determinação da potência inibitória enzimática 85
4.5.1 Identificação do composto **6a** por RMN de ^{1}H, ^{13}C e RMN 2D 85
4.5.2 Potência inibitória do composto **6a** de *Pholiota nameko* 92
4.6 Triagem *in silico* de parâmetros farmacocinéticos 93
5. Conclusões 100
6. Referências Bibliográficas 102

1. Introdução

1.1 *Helicobacter pylori*

A *Helicobacter pylori* é uma bactéria em forma espiral, gram-negativa, microaerófila (ZHOU et al., 2017). Esse microrganismo mede aproximadamente de 3 a 5 μm de comprimento por 0,5 μm de largura, parede celular externa lisa e possui de quatro a seis flagelos unipolares e com bulbo terminal (SIQUEIRA et al., 2007).

Essa bactéria reside no estômago e no duodeno e está associada a diversas doenças, tais como, gastrite crônica, uma das infecções mais comuns na espécie humana, comprometendo cerca de metade da população mundial (BRUSCKY et al., 2013; LADEIRA et al., 2003). As úlceras duodenais e gástricas causadas por *H. pylori* se desenvolvem em 1 a 10% dos pacientes infectados, e o câncer gástrico em cerca de 0,1 a 3% dos casos, sendo considerado pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como agente carcinógeno do tipo I para a eclosão do câncer gástrico em humanos e em menor incidência (0,01% dos casos) é a causa do linfoma tipo MALT (*Musoca-associated lymphoid tissue*) (FOLLMER, 2010; O'CONNOR et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2007; ZHANG, M. et al., 2014).

O patologista Robin Warren e o médico gastroenterologista Barry Marshall, entre 1979 e 1981, foram responsáveis por identificar, caracterizar e isolar pela primeira vez a *H. pylori,* na mucosa gástrica de um indivíduo com gastrite crônica (WARREN; MARSHALL, 1983). No entanto, somente em 1985 que foi constatada a relação causa-efeito entre a presença da bactéria e gastrite ou úlcera, por Barry Marshall que ingeriu um inoculo bacteriano e contraiu a infecção experimental, demonstrando que a *H. pylori* é o agente etiológico da gastrite e úlcera péptica em humanos (GOMES et al., 2014).

Logo, o ser humano é considerado o principal hospedeiro desse agente, sendo a infecção adquirida predominantemente na infância. A via de transmissão da *H. pylori* tem sido um dos assuntos mais estudados e discutidos. As vias de infecção mais citadas na literatura é a transmissão mediante o contato entre os indivíduos, considerada a mais provável, e pela ingestão de alimentos ou água contaminados, possuindo duas possíveis rotas de infecção a fecal-oral e a oral-oral (TEIXEIRA et al., 2016).

A prevalência dessa infecção está principalmente vinculada às condições socioeconômicas, havendo altos índices em países em desenvolvimento e com condições sanitárias restritas, segundo a OMS (1999). Estima-se que metade da população mundial está

infectada por esta bactéria, aproximadamente 80% desses indivíduos permanecem com a doença de forma assintomática e somente uma pequena percentagem desenvolve a patologia (AMIEVA et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2007). No Brasil, ainda não foi realizado uma pesquisa de base populacional, mas os estudos com populações específicas mostram índices elevados, variando entre 59,5% e 96% a prevalência da infecção causada por *H. pylori* (INCA, 2014; TEIXEIRA et al., 2016).

1.1.1 Sobrevivência da *H. pylori*

A capacidade que a *H. pylori* têm de provocar lesão na mucosa gastroduodenal está essencialmente relacionada à sua habilidade de adaptar-se ao ambiente gástrico, as principais características que conferem ao microrganismo essa enorme capacidade é a resistência a um meio hostil pela produção de urease e adaptação genética (TEIXEIRA et al., 2016). A sobrevivência da *H. pylori* na mucosa gástrica é facilitada pela presença da enzima urease, a qual atua promovendo a hidrólise da ureia, presente em condições fisiológicas no suco gástrico, levando à produção de amônia (NH_3) e dióxido de carbono (CO_2). A amônia atua como receptor de íons H^+, prótons liberados pelas células parietais presentes nas glândulas gástricas, tornando o pH do interior da bactéria neutro, o que confere a *H. pylori* resistência à acidez gástrica (LADEIRA et al., 2003; MOON et al., 2013).

A enzima urease produzida pela bactéria fica armazenada no citoplasma bacteriano, e uma determinada quantidade é liberada para o meio extracelular para iniciar o processo de hidrólise. A quantidade de enzima armazenada e liberada é controlada pelo gene *ureI*. A partir do momento que a bactéria é exposta a acidez do estômago ocorre uma alta expressão desse gene aumentando a permeabilidade de ureia. A ureia é utilizada como substrato pela a urease e na medida em que o pH do interior da bactéria vai aumentando a expressão do gene *ureI* reduz evitando a alcalinização do interior da bactéria (COELHO et al., 2013; JADHAV et al., 2013).

Ao entrar em contato com a camada do muco, a morfologia da bactéria é de extrema importância para a colonização, as formas espirais com os flagelos atuam promovendo a mobilidade da bactéria auxiliando na passagem por essa camada compostas por eletrólitos, água e glicoproteínas. O formato helicoidal da célula bacteriana junto aos flagelos atua promovendo movimentos circulares permitindo penetrar na camada do muco. Outras enzimas também são liberadas, tais como lipases e mucinases, capazes de degradar a parede mucosa facilitando o acesso para a camada epitelial, e dessa forma provocando reações inflamatórias que perduram por toda a vida, se não for erradicada. (COELHO et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2016).

1.1.2 Tratamento utilizado em infecções causadas por *H. pylori*

Para o tratamento de doenças gastroduodenais causadas pela *H. pylori* são empregados desde 1989 fármacos antimicrobianos, como a amoxicilina (**1)**, metronidazol (**2**) e claritromicina (**3)**, as estruturas são demostradas na Figura 1.

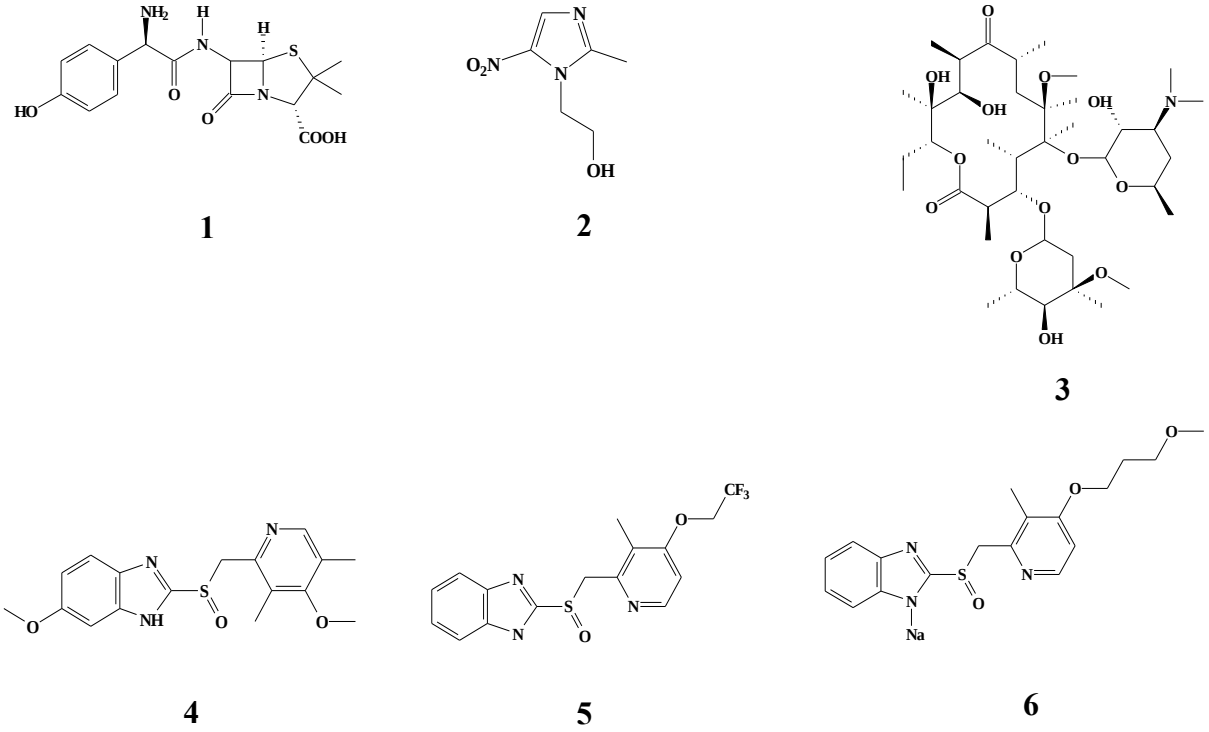


Figura 1. Estruturas dos fármacos utilizados no tratamento de infecção caudados pela *H. pylori.* Amoxicilina (**1**), metronidazol (**2**), claritromicina (**3**) omeprazol (**4**), lansoprazol (**5**) e rabeprazol (**6**).

O mecanismo de ação frente a *H. pylori* do metronidazol (classe dos nitroimidazólicos) consiste na redução dos grupos nitro na bactéria, formando metabólitos tóxicos, como a hidroxilamina (NH_2OH), que rompem o DNA bacteriano. Os macrolídeos, como a claritromicina, inibem a síntese proteica bacteriana ao se ligarem ao ribossomo bacteriano, impedindo a transpeptidação e translocações das próximas proteínas. A amoxicilina, pertencente a classe dos β-lactânicos, os quais atuam se ligando à PBP (*Penicillin-Binding Proteins*), dessa forma interfere na síntese adequada de peptidioglicano, com isso gera uma parede celular instável (ANVISA, 2014; GOODWIN et al., 1998).

Para o tratamento contra essa infecção é utilizado a terapia tripla que consiste na administração de dois antibióticos, como a claritromicina, amoxicilina/metronidazol e um

inibidor da bomba de prótons (IBP), esse último, suprime a secreção de ácido gástrico por meio de inibição específica da enzima H^+/K^+-Adenosina Tri-Fosfatase na superfície secretora da célula parietal gástrica, alguns fármacos utilizados são o omeprazol (**4**), lansoprazol (**5**), rabeprazol (**6**) (Figura 1) (COELHO et al., 2013; EGAN et al., 2007).

Esses compostos também podem atuar na inibição da enzima urease. Um estudo realizado por Tsuchiya e colaboradores (1995), demostram IC_{50} frente a urease de *H. pylori* de 5,4 µmol/L para o omeprazol, o lansoprazol com 9,3 µmol/L e o rabeprazol de 0,29 µmol/L, sendo o último com potencial inibitório cerca de 10 vezes maior em comparação com os demais IBP. Uma explicação possível é a interação no sítio ativo da enzima, formando pontes de dissulfeto (BARTH; HAHNE, 2002; BRAGA et al., 2011).

O período dessa terapia varia de 7 a 14 dias, duas vezes por dia. Estudos relatam que a eficácia na erradicação de *H. pylori* por terapias triplas com duração de 7 dias varia entre 70 a 77%, enquanto que a administração por 14 dias tem sucesso entre 80 a 84% dos casos (MALFERTHEINER et al., 2012; O'CONNOR et al., 2017).

As percentagens mundiais de erradicação de *H. pylori* têm diminuído, e por outro lado, a prevalência de taxas de resistência a antibióticos aumentaram significativamente (MALFERTHEINER et al., 2017). A eficácia do tratamento pode ser reduzida por uma série de problemas como o elevado número de medicamentos e o alto custo da terapia. Além disso amoxicilina e claritromicina são degradados pelo ácido gástrico, necessitando o uso de doses mais elevadas para alcançarem doses efetivas, porém podem gerar diversos efeitos colaterais, ocasionando a dificuldade na adesão ao tratamento e o aumento do número de cepas resistentes (TALEBI BEZMIN ABADI, 2014).

Há no mercado variados fármacos com potencial de eliminar a bactéria, porém o aumento dos casos de resistência a esses antibióticos, se faz necessário a busca de novas alternativas para o tratamento de doenças ocasionadas por *H. pylori*. E como citado anteriormente, a enzima urease tem um papel primordial na sobrevivência desse microrganismo. Assim, o uso de inibidores de urease associado a outras terapias medicamentosas é uma possível estratégia para inibir o crescimento de *H. pylori* (BRAGA et al., 2011; O'CONNOR et al., 2017).

1.2 Enzima urease

A urease (ureia amidohidrolase, EC 3.5.1.5) é classificada como uma metaloenzima, devido a presença de íons de níquel (Ni^{2+}), que catalisa a reação de hidrólise da ureia em amônia e dióxido de carbono (Figura 2).

Figura 2. Representação simplificada da hidrólise da ureia catalisada por urease.

Essa enzima apresenta ampla distribuição entre plantas, fungos, bactérias e alguns invertebrados (KRAJEWSKA, 2009; MODOLO et al., 2015). Ureases de plantas e fungos são proteínas formadas por seis subunidades idênticas de 90 kDa, organizadas como trímeros e hexâmetros, enquanto as ureases bacterianas são multímeros de três subunidades distintas, uma α (de 60-76 kDa), β (de 8-21 kDa) e γ (de 6-14 kDa), com massa molar entre 190 e 300 kDa (BALASUBRAMANIAN, PONNURAJ, 2010). Por mais que existam diferentes origens, as ureases são constituídas de uma estrutura terciária altamente conservada (sequência de aminoácidos comuns no sítio ativo). Estas enzimas atuam sob o mesmo mecanismo de catálise durante a hidrólise da ureia, mostrando que elas descendem de uma mesma proteína ancestral, dessa forma, permite que dados obtidos para ureases de origens vegetais sejam extrapolados para as enzimas bacterianas (CARLINI; LIGABUE-BRAUN, 2016).

Entre numerosas ureases, a fonte mais comum dessa enzima é a obtida da *Canavalia gladiata*, conhecida como feijão-de-porco ou *jack bean*. A urease de *jack bean* (UJB), foi a primeira a ser isolada na forma cristalina por James B. Sumner, em 1926, e cerca de 50 anos depois foi identificada como uma metaloenzima, demostrando a presença de átomos de níquel. A UJB tem sido amplamente empregada em estudos que buscam inibidores enzimáticos (BALASUBRAMANIAN, PONNURAJ, 2010; WEEKS et al., 2000).

A UJB possui uma cadeia polipeptídica com 840 aminoácidos, seu sítio ativo, como citado anteriormente, apresenta dois átomos de níquel separados por 3,5 - 3,7 Å, ligados em ponte por oxigênios contidos no resíduo de aminoácido de lisina carbamilada (Lys) e por um íon hidróxido. Cada íon metálico também está ligado a dois resíduos de histidina (His) e a uma molécula de água terminal. Observando a Figura 3, o Ni_a possui um arranjo penta-coordenado com uma geometria piramidal de base quadrada distorcida, e para o Ni_b, que está ligado a um resíduo de aspartato (Asp), um arranjo hexa-coordenado com uma geometria octaédrica distorcida (KAFARSKI; TALMA, 2018; LAGE et al., 2018).

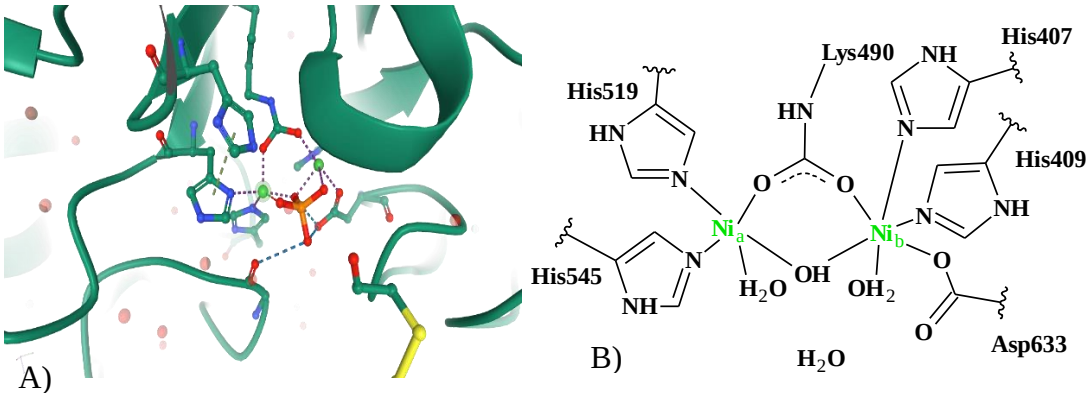


Figura 3. Sítio ativo da urease. **A)** Representação espacial do sítio ativo da urease (PDB ID: 4GY7). **B)** Representação bidimensional do sítio ativo da urease (adaptado de LAGE et al., 2018).

O mecanismo de catálise da ureia pela urease, é apresentado na Figura 4, inicialmente ocorre a abstração de um hidrogênio da molécula de água ligada ao Ni_b através de um resíduo de histidina presente na enzima. Com a entrada do substrato, ocorre a polarização do grupo carbonila pelo átomo de Ni_a, facilitando o ataque nucleofílico no carbono carbonílico da ureia. Nesta etapa existem algumas divergências, a proposta de mecanismo citada acima, uma das mais difundidas na literatura, foi elaborada por Benini e colaborados em 1999. Porém, Karplus e colaboradores, em 1997, propuseram que o ataque seria via o oxigênio da hidroxila coordenada como molécula de água ligada ao Ni_a (IBRAR et al., 2013; KAPPAUNA et al., 2018).

Na próxima etapa reacional, a ureia se liga ao íon Ni_a por meio de um de seus átomos de nitrogênio amino, estabelecendo uma ligação bidentada com a urease, e em ambas as propostas é formado um intermediário tetraédrico. Após, ocorre a protonação do grupo NH_2 da ureia que, com a restauração da dupla ligação da carbonila, libera NH_3. A partir de duas moléculas de água presentes no meio, ocorre a reidratação, e reestabelece o sítio ativo com a liberação de ácido carbâmico, que se decompõe espontaneamente na segunda molécula de NH_3 e CO_2, Este processo resulta no aumento de pH, por conta do caráter básico da amônia (BALASUBRAMANIAN; PONNURAJ, 2010; IBRAR et al., 2013; KAPPAUNA et al., 2018; LAGE et al., 2018).

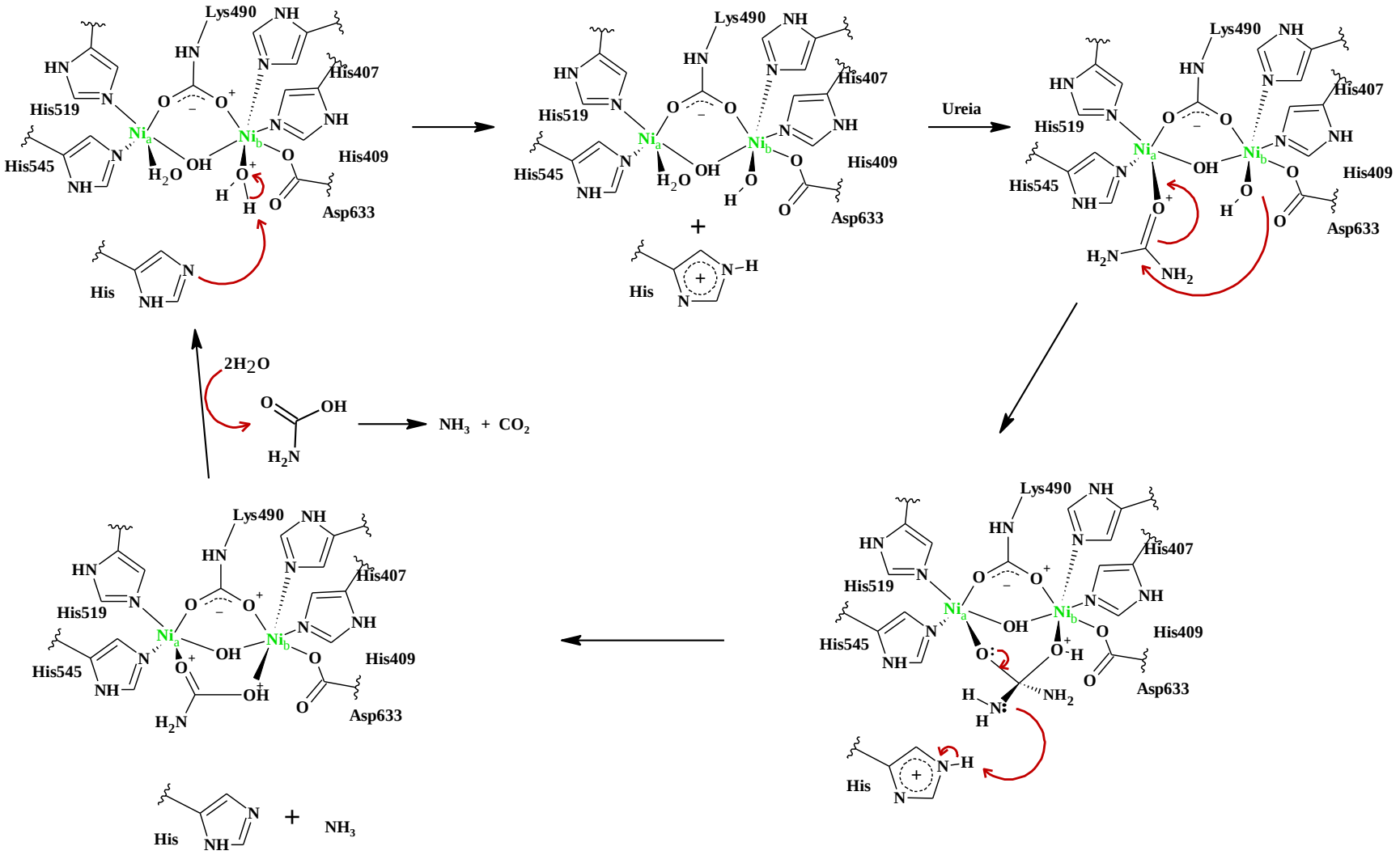


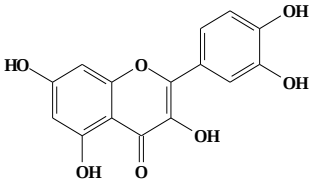
Figura 4. Proposta de mecanismo da hidrólise da ureia, adaptado de IBRAR et al., 2013.

1.2.1 Inibidores de urease

As ureases podem atuar na proteção e no metabolismo de plantas e fungos que utilizam o nitrogênio da ureia como fonte de nutrientes, além de ser essencial para a sobrevivência de alguns microrganismos. Por isso são de extrema importância tanto para saúde, quanto para a agronomia. Sendo alvo de diversos estudos por ser o principal causador das patologias induzidas por *H. pylori* (IBRAR et al., 2013; KAPPAUNA et al., 2018).

Na literatura há diversos relatos de classes de compostos capazes de inibir a enzima urease, tais como flavonoides (**7**), isoflavanas (**8**), chalconas (**9**), cumarinas e derivados (**10** e **11**), alcaloides (**12**), derivados de cetonas β-aril-β-mercapto (**13**), derivados de triazol (**14**-**20**), tiazolidinas (**21**), benzimidazois (**22**), oxadiazoles (**23**), derivados de tiofênicos (**24**), benzotiazepínico (**25**), quinonas (**26** e **27**), derivados de barbitúricos e tio barbitúricos (**28** e **29**), derivados sintéticos de sulfanilamida tioureia (**30**), derivados de ureia e tioureia (**31** e **32**), derivados de organofosforados (**33**) e derivados de ácido hidroxâmico (**34** e **35**) (AHARI-MOSTAFAVI et al., 2014; AHMAD et al., 2008; ANSARI et al., 2005; DOMÍNGUEZ et al., 2008; IBRAR et al,. 2013; KHAN et al., 2006; KHAN et al., 2010; RAUF et al., 2015; REGO et al., 2018; SAEED et al., 2017; SAIFY et al., 2014; SHI et al., 2016; XIAO et al., 2013; XIAO et al., 2007). Exemplos de compostos sintéticos e oriundos de produtos naturais (PNs) com alta atividade inibitória da enzima urease, seja referente a UJB ou a urease de *H. pylori*, podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Estruturas e os seus respectivos valores de IC_{50} dos compostos com potencial inibitório superior ao padrão listado na literatura, tioureia (IC_{50} 13 – 26 µmol/L).

Classes	Compostos	IC_{50} (µmol/L)	Ref.
Flavonoides	 **7**	11,2	XIAO et al., 2013

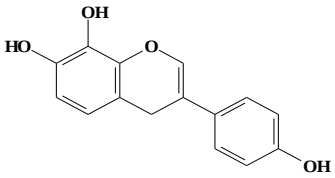
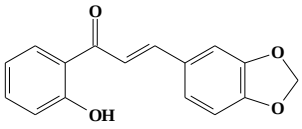
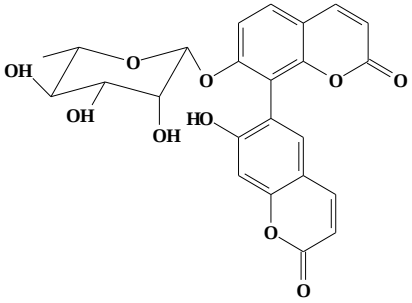
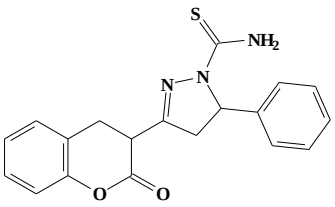
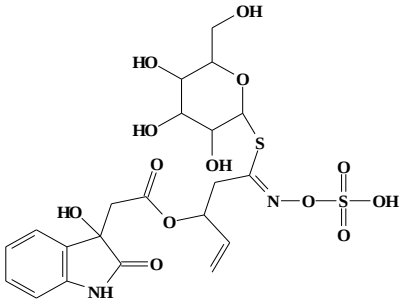
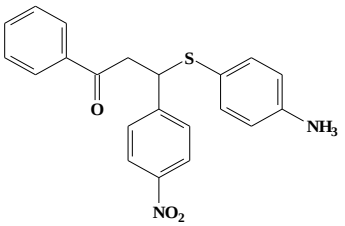
	 **8**	0,85	XIAO et al., 2007
Derivado de chalcona	 **9**	32,51	ANSARI et al., 2005
Cumarinas e derivados	 **10**	22,05	IBRAR et al., 2013
	 **11**	0,000358	SAEED et al., 2017
Alcaloides	 **12**	25,63	AHMAD et al., 2008
Derivados de cetonas β-aril-β-mercapto	 **13**	6,0	AHARI-MOSTAFAVI et al., 2014

Tabela 1. Continuação.

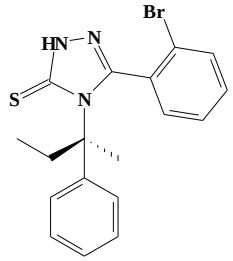
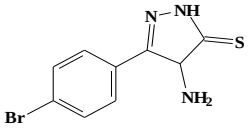
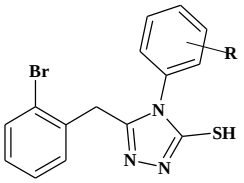
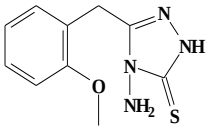
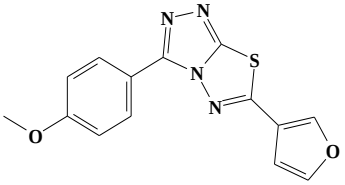
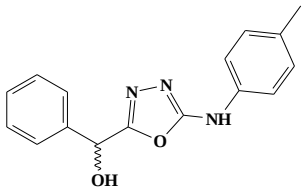
Classes	Compostos	IC_{50} (µmol/L)	Ref.
Derivados de triazol	 **14**	7,8	IBRAR et al., 2013
	 **15**	4,3	
	 **16** R = 3-OCH_3 **17** R = 4-CH_3	10,66 18,10	
	 **18**	0,85	IBRAR et al., 2013
	 **19**	0,764	
	 **20**	16,1	

Tabela 1. Continuação.

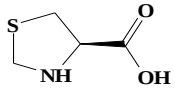
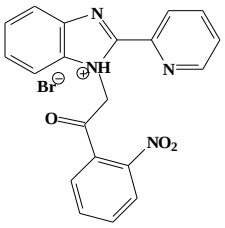
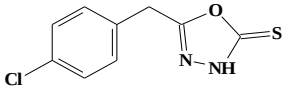
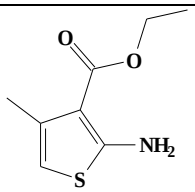
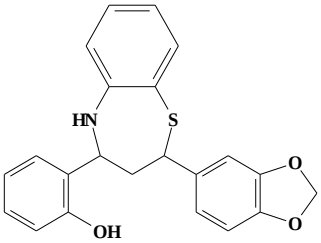
Classes	Compostos	IC_{50} (µmol/L)	Ref.
Tiazolidinas	 **21**	3,03	KHAN et al., 2006
Benzimidazois	 **22**	19,2	SAIFY et al., 2014
Oxadiazois	 **23**	1,15	IBRAR et al., 2013
Derivados de tiofênicos	 **24**	2,81	
Benzotiazepínico	 **25**	19,07	REGO et al., 2018

Tabela 1. Continuação.

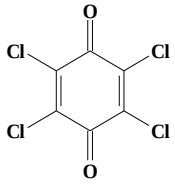
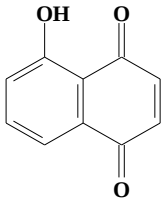
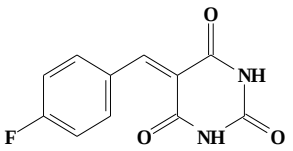
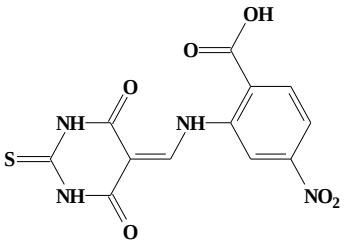
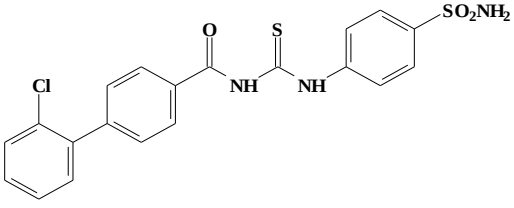
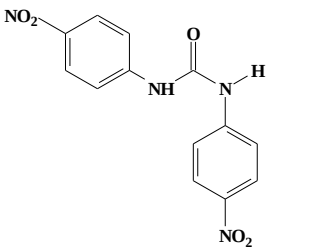
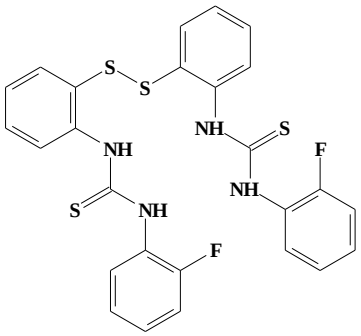
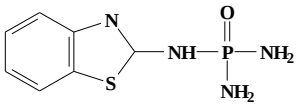
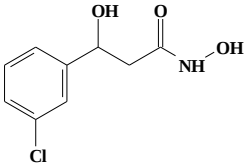
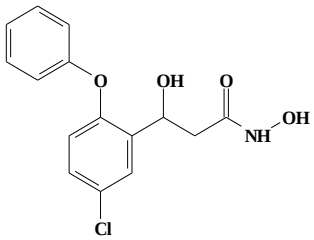
Classes	Compostos	IC_{50} (µmol/L)	Ref.
Quinonas	 **26**	0,6	IBRAR et al., 2013
	 **27**	0,025	
Derivados de barbitúricos e tio barbitúricos	 **28**	13,0	KHAN et al., 2010
	 **29**	8,53	RAUF et al., 2015
Derivados sintéticos de sulfanilamida tioureia	 **30**	0,20	SAEED et al., 2017

Tabela 1. Continuação.

Classes	Compostos	IC_{50} (µmol/L)	Ref.
Derivados de ureia e tioureia	 **31**	1,25	REGO et al., 2018
	 **32**	0,70	
Derivados de organofosforados	 **33**	0,002	DOMINGUEZ et al., 2008
Derivados de ácido hidroxâmico	 **34**	1,10	SHI et al., 2016
	 **35**	0,15	

1.3 Chalconas

Chalconas são classificadas como precursoras da via de biossíntese de flavonoides, definidas como cetonas α, β – insaturadas, sendo caracterizadas pela abertura do terceiro anel, presente nas classes de flavonoides, levando à formação de uma ligação dupla com os carbonos α e β em função da carbonila (Figura 5) (ROZMER; PERJÉSI, 2016).

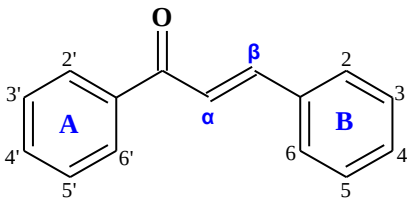


Figura 5. Núcleo básico das chalconas.

Também podem ser obtidas sinteticamente através da reação de condensação de Claisen-Schmidt na presença de um catalisador de caráter básico ou ácido, sendo comumente utilizada a catalise básica. A reação ocorre entre uma cetona e um aldeído aromático, com é demostrado na Figura 6.

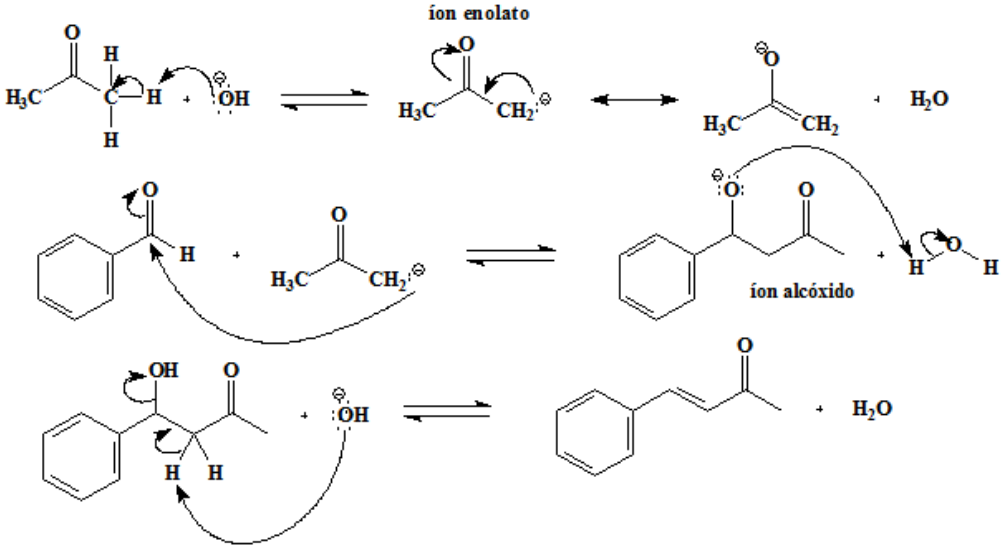


Figura 6. Mecanismo de condensação de Claisen-Schmidt.

A reação de condensação se inicia a partir da abstração de um próton do carbono α da cetona para formar o íon enolato, que é estabilizado por ressonância. O íon enolato funciona como nucleófilo atacando o carbono da carbonila do aldeído formando um íon alcóxido que

remove um próton da molécula de água, formado uma hidroxicetona. Dessa forma, ocorre a desidratação da hidroxicetona promovendo à formação do produto da reação, uma cetona α, β-insaturada (SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

A busca de formas eficientes de sintetizar chalconas se deve ao fato destes compostos possuírem estruturas relativamente simples e um amplo espectro de atividades biológicas, como, anti-inflamatória, antioxidante, antimalária, antibacteriana, anticâncer, citotóxica e leishmanicida (ASIRI; KHAN, 2011; LIMA et al., 2016).

Com base no levantamento bibliográfico, as chalconas possuem atividade inibitória frente a enzima urease e atividade antimicrobiana. Em um estudo realizado por Tristão e colaboradores (2012), essa classe de metabólitos apresentou atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli, Staphylococcus aureus,* o gênero *Bacillus* e *Clostridium sporogenes* apresentando valores de CIM (concentração inibitória mínima) entre 2-15 µg/mL. Há relatos da chalcona licochalcona A (**36**) inibir o crescimento *H. pylori*, com CIM de 25 µg/mL. Três compostos análogos a 3′,4′,5′-trimetoxichalcona (**37**, 3**8** e **39**) também demostraram ser excelentes inibidores desta bactéria, apresentando CBM (concentração bactericida mínima) de 12,5 µmol/L, 25 µmol/L e 100 µmol/L, respectivamente (Figura 7) (LAI et al., 2010).

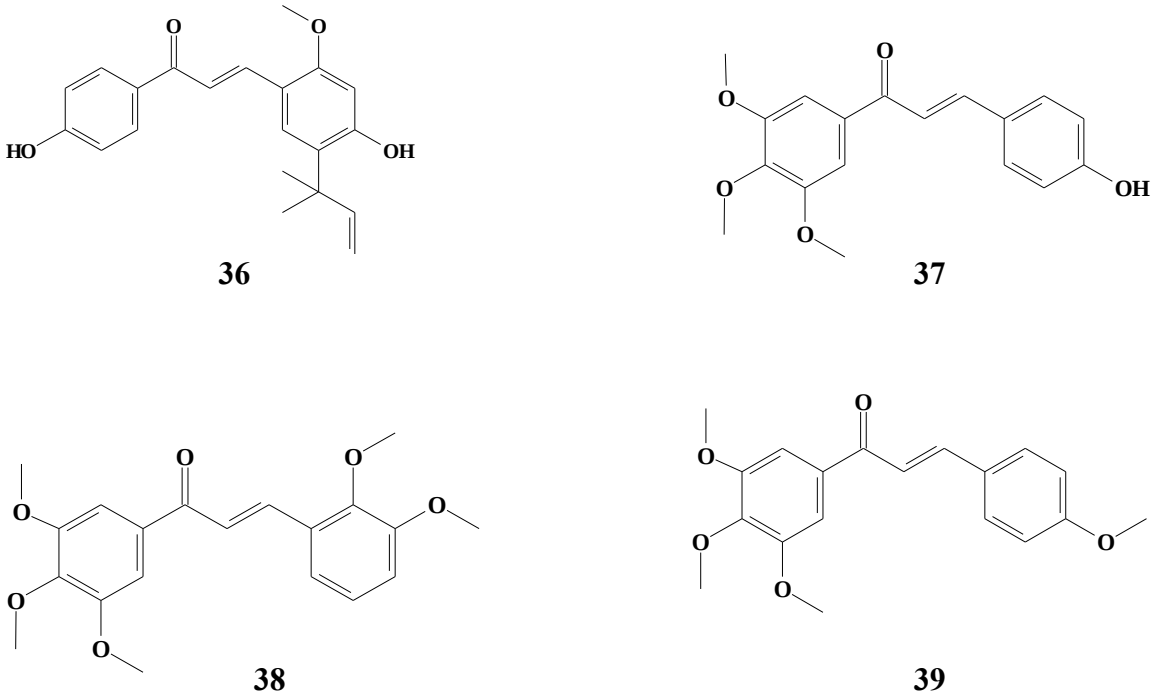


Figura 7. Chalconas com atividade anti-*H. pylori.* Licochalcona A (**36**), estruturas **37**, **38** e **39** são análogos da 3′,4′,5′-trimetoxichalcona. Fonte: LAI et al., 2010.

Visto a diversidade de propriedades biológicas dessa classe, além de apresentar atividade anti-*H. pylori* e inibir moderadamente a enzima urease, essa classe se torna relevante para estudos enzimáticos frente a enzima urease.

1.4 Bioatividade de compostos oriundos de produtos naturais

A utilização de Produtos Naturais (PNs) com propósitos terapêuticos vem sendo aplicada desde tempos pré-históricos (ASSIS et al., 2015). Atualmente existe diversas pesquisas envolvendo PNs, com o intuito de obter novos compostos com propriedades medicinais. De 1981 a 2019 foram aprovados 1881 fármacos, dentre esses 356 são derivados de produtos naturais (NEWMAN; GRAGG, 2020).

Metabólitos isolados de fungos vêm ganhando destaque, devido as diversas atividades biológicas, que iniciou-se com a descoberta acidental da penicilina G (**40**) por Fleming em 1928, isolada do *Penicillium notatum*. Diversos antibióticos da classe das penicilinas e cefalosporinas, anticancerígenos, imunossupressores (ciclosporina e rapamicina) e agentes redutores do colesterol sanguíneo (mevastatina e lovastatina), entre outros, têm suas origens em produtos naturais microbianos. Logo, os fungos apresentam uma vasta capacidade de produzir substâncias químicas com elevada potência biológica (CHAPLA et al., 2013; KHARWAR et al., 2011).

Os produtos naturais de fungos endófitos, fungos que colonizam os tecidos internos das plantas sem causar prejuízos imediatos no hospedeiro, apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, tais como antimicrobiana, antiparasitária, antioxidante, antidiabética, imunossupressora e antiviral. Estes fungos produzem metabólitos secundários de diversas classes, tais como, alcaloides, esteroides, terpenos, isocumarinas, quinonas, fenilpropanoides, lignanas, ácidos fenólicos, entre outros (ALY et al., 2011; CHAPLA et al., 2013; ZHANG et al., 2006). Destacando-se um importante fármaco isolado do fungo *Taxomyces andreanae*, o Taxol (paclitaxel) (**41**) que é um anticancerígeno. Outro importante anticancerígeno é a vincristina (**42**) isolada da planta *Catharanthus roseus*, e recentemente isolada do *Fusarium oxysporum* obtido da mesma planta (ALY et al., 2011; JALGAONWALA et al., 2011).

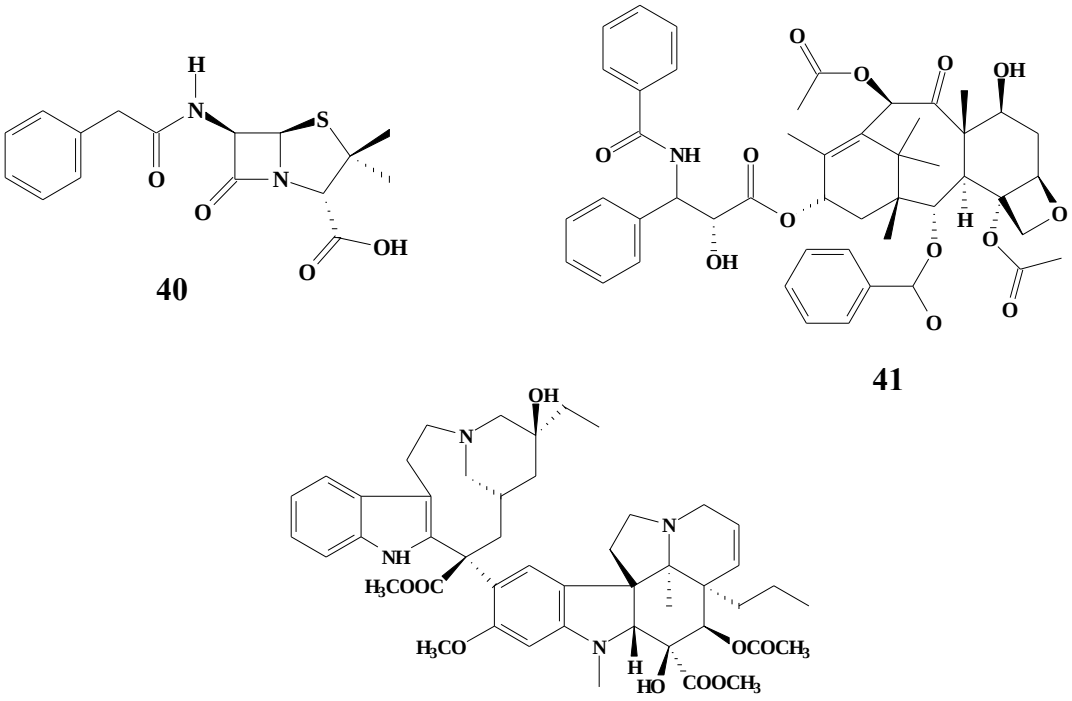


Figura 8. Estrutura de fármacos oriundos de fungos. Penicilina G (benzilpenicilina) (**40**), Taxol (paclitaxel) (**41**), Vincristina (**42**). Fonte: ALY et al., 2011; CHAPLA et al., 2013; JALGAONWALA et al., 2011.

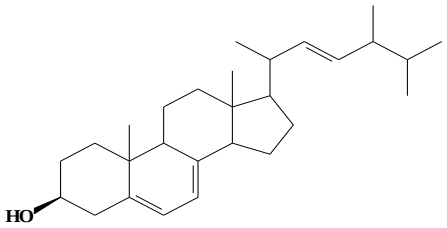
1.4.1 *Fusarium proliferatum*

O gênero *Fusarium*, de acordo com a classificação taxonômica, constitui um estado anamorfo da ordem *Hypocreales*, filo *Ascomycota*, o qual está associado a doenças de diversas culturas de importância econômica, dentre elas: milho, trigo, cana-de-açúcar, banana e abacaxi (WALKER et al., 2016).

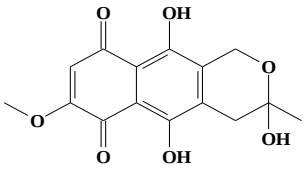
Estudos realizados com o fungo *F. proliferatum*, isolado da planta *Syzygium cordatum*, demonstra a presença de metabólitos com diversas propriedades biológicas. Como exemplo o esteroide ergosta-5,7,22-trien-3β-ol (**43**), que possui atividade antimicrobiana (DAME et al., 2016). Há relatos de outros metabólitos secundários como naftoquinonas, tais como, fusarubina (**44**) e nectraiafurona, com diversas atividades biológicas, destacando antibacteriana, citotóxica e inseticida (KORNSAKULKARN, DOLSOPHON, 2011).

O fungo *F. proliferatum*, ao se desenvolver causa a deterioração e podridão dos hospedeiros. Sua prevalência é maior em plantas como milho, banana e estudos mais recentes o identificaram em abacaxi, podendo afetar diversas partes como folhas, caule, ramos e órgãos subterrâneos (SUN et al., 2014; TANAKA et al., 2001).

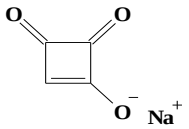
Ananas comosus (L.) pertencente à família das Bromelioideae, conhecido como abacaxi, é uma espécie frutífera de grande importância econômica e social cultivada em mais de 70 países de clima tropical e subtropical (FRANÇA-SANTOS et al., 2009). Essa espécie é suscetível a várias doenças fúngicas, como as causadas por fungos do gênero *Fusarium*, gerando a podridão das partes do fruto. Alguns metabólitos secundários isolados desse fungo e em outras espécies de *Fusarium*, como a moniliformina (**45**), que apresenta um potencial bioerbicida (TREMACOLDI, SOUZA FILHO, 2006), a beauvericina (**46)** um ciclo-hexadepsipeptídeo, com propriedades antitumorais (HEILOS et al., 2017; SILVA et al., 2020), antifúngicas e antimicrobiana, fumonisinas (**47**-**49**), fusaproliferina (micotoxina), fusarinas e ácido fusárico (**50**) que tem relatos na literatura de possuir propriedades inseticida e fitotóxicas, além de ser um potente antimicrobiano (Figura 9) (DUTTA, BHATTACHARYYA, 2013; STEPIÉN et al., 2013).



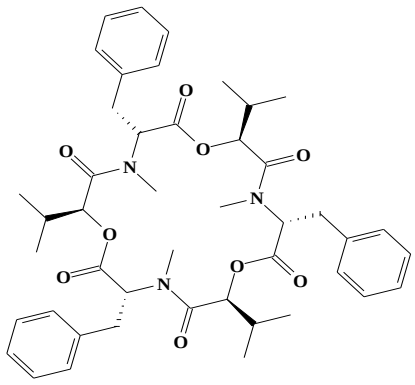
43



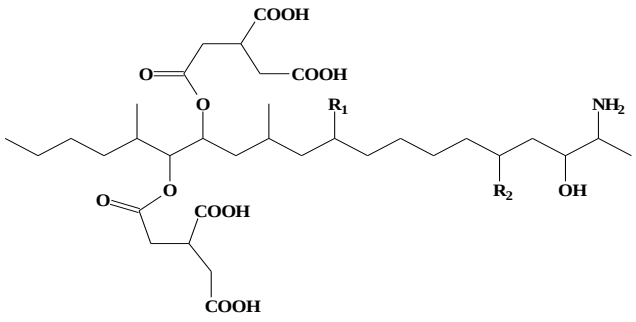
44



45



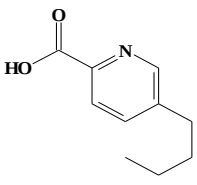
46



47 R_1 e R_2= OH

48 R_1 = H; R_2= OH

49 R_1 = OH; R_2= H



50

Figura 9. Compostos isolados do fungo *Fusarium proliferatum*. Ergosta-5,7,22-trien-3β-ol (**43**), fusarubina (**44**), moniliformina (**45**), beauvericina (**46**), fumonisina B1 (**47**), fumonisina

B2 (**48**), fumonisina B3 (**49**) e ácido fusárico (**50**). Fonte: DAME et al., 2015; RHEEDER et al., 2002.

Visto a gama de diversidade de compostos isolados de fungos com variadas propriedades biológicas, alguns compostos isolados *F. proliferatum* de *Ananas comosus* foram investigados frente à enzima UJB.

1.5 Mecanismo de inibição enzimática *in vitro* e uso de ferramentas computacionais para o planejamento de compostos *Hits*

1.5.1 Ensaios *in vitro* e mecanismo de inibição enzimática

Há diversos mecanismos de inibição enzimática, caracterizados por estudos cinéticos. Os modos de ligação podem ser classificados em irreversíveis ou reversíveis. Inibidores irreversíveis formam complexos estáveis com a enzima-alvo, geralmente por ligações covalentes inativando a enzima permanentemente ou tendo uma reativação lenta. Os inibidores classificados como reversíveis se ligam a enzima por meio de interações, tais como ligações de hidrogênio, interações iônicas, hidrofóbicas e de Van der Waals e geralmente não sofrem nenhuma transformação química enquanto ligados à enzima. Atualmente há uma diversidade de estudos que buscam inibidores enzimáticos reversíveis para desenvolvimento de novos fármacos, pois a enzima não é modificada quimicamente e nem inativada irreversivelmente (COPELAND, 2000; LEHNINGER et al., 2014).

Compostos com caráter inibitório podem se ligar de diferentes maneiras à enzima gerando diferentes comportamentos dos inibidores enzimáticos reversíveis, levando a uma inibição competitiva, não-competitiva e a incompetitiva. Os inibidores competitivos geralmente apresentam semelhança estrutural com o substrato, dessa forma, competem com o substrato pelo sítio ativo da enzima. Inibidores incompetitivos interagem apenas com o complexo enzima-substrato, com o intuito de impedir ou retardar a formação do produto (LEHNINGER et al., 2014). Inibidores não-competitivos não apresentam estruturas análogas ao substrato, pois se ligam em um sítio ativo diferente do substrato, eles podem se ligar tanto na enzima livre quanto no complexo enzima-substrato formando um complexo inativo, enzima-inibidor ou enzima-substrato-inibidor. Logo, o inibidor não compete com o substrato pelo mesmo sítio

ativo, no qual ele se ligará em outro local, gerando uma alteração na conformação do sítio ativo, impedindo a reação enzimática (LEHNINGER et al., 2014).

Este comportamento do inibidor pode ser obtido por ensaios *in vitro* variando a concentração do substrato e mantendo as demais condições experimentais. Os dados experimentais obtidos são convertidos em taxas reacionais e usando abordagem gráfica do padrão de intersecção das curvas é possível determinar o mecanismo de inibição. Dentre os métodos utilizados está o de Lineweaver-Burk (1/*V* x 1/[S]) (Figura 10) que é uma linearização de Michaelis Menten (1/V x [I]) (CORTÉS et al., 2001; DE SOUSA et al., 2015; COPELAND, 2000).

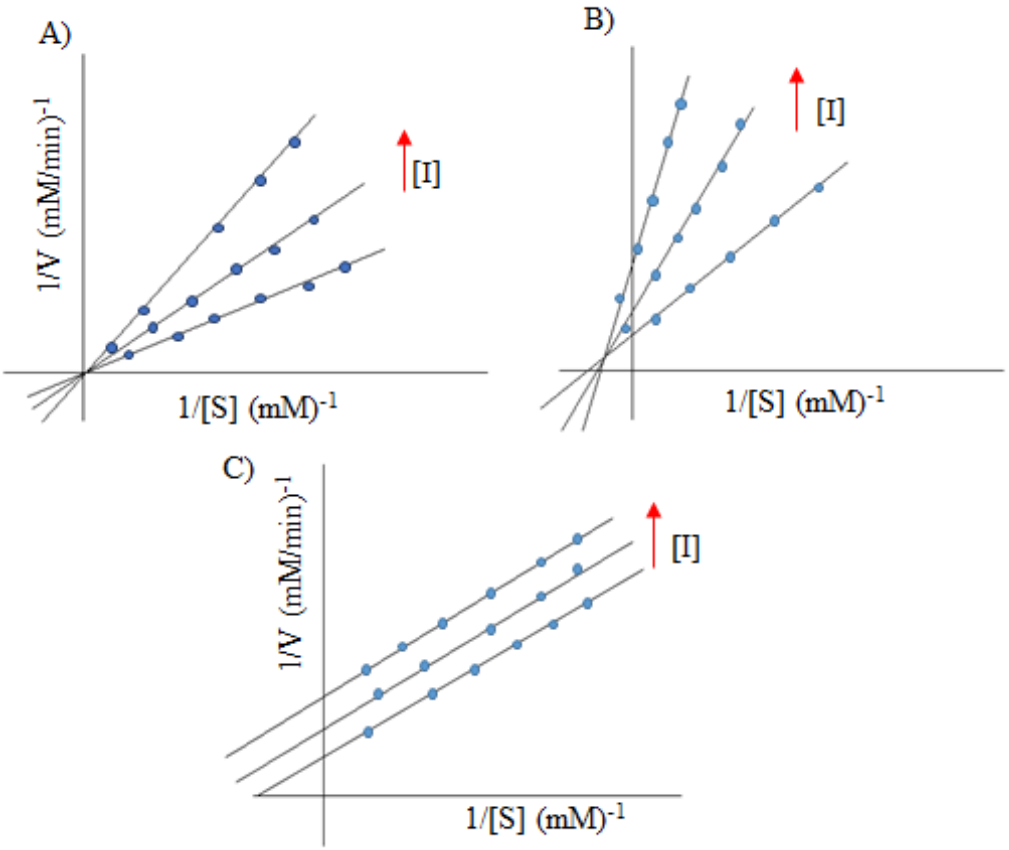


Figura 10. Gráficos ilustrativos de Lineweaver-Burk. **A)** Gráfico de um inibidor competitivo; **B)** Gráfico de um inibidor não-competitivo; **C)** Gráfico de um inibidor incompetitivo. (Adaptado de COPELAND, 2000).

Na pesquisa de novos inibidores enzimáticos, é essencial avaliar quantitativamente o potencial inibitório e os comportamentos cinéticos dos compostos estudados na enzima de

interesse, com base nisso, os compostos mais potentes foram analisados quanto ao seu mecanismo de inibição frente a UJB.

1.5.2 Estudo *in silico* no planejamento de compostos *Hits*

O desenvolvimento de novos fármacos requer um alto investimento financeiro, além de ser um processo bastante lento, de acordo com o INCA em 2018, o tempo total de desenvolvimento pode ultrapassar 10 anos. Em média, são gastos US$ 1,38 bilhões para cada novo medicamento desenvolvido (ARROIO et al., 2010; VAN DE WATERBEEMD et al., 2003). Nos estágios iniciais da fase de descoberta de fármacos está a identificação por triagem biológica e otimização de moléculas pequenas (IC_{50}, correlação entre estrutura e atividade e mecanismo de inibição), conhecidos como compostos *Hits* (molécula bioativa). O desenvolvimento de compostos líderes (*Lead Compounds*) a partir de um *hit* consiste na otimização da potência, afinidade, seletividade e determinação de propriedades farmacocinéticas. Assim, estes compostos selecionados terão perfil para descoberta de compostos com potencial de desenvolvimento clínico (FERREIRA et al., 2011).

As técnicas computacionais, de maneira interdisciplinar, auxiliam no mapeamento de novos candidatos reduzindo o tempo de pesquisa e, consequentemente os custos, tornando-se uma maneira de minimiza falhas em etapas mais avançadas dos estudos (ARROIO et al., 2010; VAN DE WATERBEEMD et al., 2003). Dentre esses métodos está a abordagem *in silico,* (simulação/experimentos computacionais) o uso dessa ferramenta traz como vantagens, custos inferiores, menor tempo de análise, reprodutibilidade, rapidez e exatidão (COCCO et al., 2020). Os estudos *in silico* permitem avaliar as interações entre compostos bioativos e o receptor, além de ser possível investigar propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas e efeitos toxicológicos de candidatos a fármacos. Aliado a experimentos químicos e biológicos é essencial na busca por novas moléculas bioativas com elevado potencial terapêutico (COCCO et al., 2020; MODA et al., 2007).

1.5.2.1 *Docking* ou docagem molecular

O *docking* ou docagem molecular é uma simulação computacional com a qual é possível analisar e avaliar possíveis interações a partir da formação do complexo receptor (proteínas, enzimas e DNA) e ligante (GSCHWEND et al., 1996). O entendimento dessas interações entre alvos biológicos e seus ligantes é de grande importância para o planejamento de novos fármacos

para as indústrias farmacêuticas, pois é possível interpretar variados fenômenos bioquímicos, sendo uma alternativa mais rápida e de menor custo, e também utilizada para otimização e melhoramento de compostos já existentes. O principal objetivo de estudos de docagem molecular é encontrar o melhor encaixe entre as moléculas de bio-receptores e ligantes, para isso são utilizados diversos algoritmos capazes de buscar diferentes graus de flexibilidade conformacional (SANT, 2009).

A utilização do docking molecular está associada a duas principais variáveis, o algoritmo de busca e a função de ajuste, responsável por avaliar o melhor cenário energético para a formação do complexo, ou seja, interação entre receptor e ligante mais estável. Os algoritmos são responsáveis, utilizando a estrutura tridimensional do receptor, por caracterizar o sítio de ligação, adicionar o possível ligante a esse sítio, e avaliar a qualidade de acomplamento (poses), levando em consideração as interações intermoleculares com os resíduos de aminoácidos presentes no sítio de ligação do receptor alvo (FERREIRA et al., 2011; ANDRADE et al., 2010).

Com base na importância da utilização do *docking* molecular, alguns compostos foram submetidos a essa técnica computacional, com o intuito de verificar quais interações ocorrem entre inibidores e a enzima UJB.

1.5.2.2 Estudo de parâmetros farmacocinéticos *in silico*

A farmacocinética é uma das principais etapas de estudo de compostos bioativos e fármacos, esse ramo da farmacologia estuda o percurso do fármaco no organismo, desde sua administração até sua eliminação. Para isso são estudados os parâmetros ADMET, a Absorção é caracterizada pela passagem do fármaco do local de administração para o plasma sanguíneo; Distribuição refere-se a transferência do fármaco do sangue para o local de ação; Metabolismo, em que ocorre a inativação/modificação do fármaco (metabólito) e a Excreção etapa que ocorre a remoção do mesmo pelos rins, afim de evitar a Toxicidade. Esses parâmetros são responsáveis por cerca de 39% das falhas durante o processo de desenvolvimento de candidato a fármaco (VAN DE WATERBEEMD et al., 2003).

Logo, é indispensável o estudo de propriedades físico-químicas dos possíveis fármacos, afim de traçar um perfil farmacocinético e, consequentemente a biodisponibilidade, que refere-se à extensão e à velocidade em que a porção ativa (fármaco ou metabólito) adentra a circulação sistêmica, alcançando, assim, o local de ação. Assim, esses parâmentos dependem de vários

fatores biológicos e químicos, como a dissolução no trato gastrointestinal, permeação de membranas biológicas e a forma de metabolização (DAINA et al., 2017).

Por meio de técnicas computacionais, ou seja, ensaios *in silico*, é possível obter para um determinado composto os parâmetros ADMET. A vantagem do uso das técnicas computacionais da-se na redução dos custos e do tempo para a realização de procedimentos experimentais, pois não basta apenas a molécula possuir boa atividade biológica se a mesma não possuir boas propriedades relacionadas a absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Dentre os parâmetros de estudos *in silico* os mais utilizados para avaliar candidatos a fármacos, é a regra dos cinco de Lipinski (*RO5*) (ARROIO et al., 2010).

1.5.2.3 Regra dos cinco (*Rule of five – RO5*)

Christopher A. Lipinski, foi responsável por criar um algorítmico que prevê a possibilidade de um determinado fármaco ter atividade oral, iniciada em 1997, quando Lipinski e colaboradores de uma indústria farmacêutica (*Pfizer*) identificaram as propriedades físico-químicas e seus descritores dos compostos que levam a problemas de absorção e permeabilidade de membranas celulares. O estudo foi fundamentado nas propriedades de aproximadamente 2500 fármacos orais comercialmente ativos do banco de dados do *World Drug Índex* (WDI) aprovados para a Fase II dos ensaios clínicos (O´SHEA; MOSER, 2008).

A *RO5*, é do que um conjunto de parâmetros usados para avaliação do potencial que uma molécula apresenta de ser farmacologicamente ativa quando administrada por via oral em humanos. Fármacos que não são excluídos pela regra dos cinco têm maior probabilidade de serem bem sucedidos nos aspectos relacionados à ADME (PICCIRILLO; AMARAL, 2018).

Essa regra, baseia-se em critérios físico-químicos que os compostos devem apresentar para poderem ser absorvidos pelo organismo humano, distribuídos, apresentem estabilidade frente ao metabolismo e para que possam ser mantidos no organismo pelo tempo necessário para cumprir sua função e não serem sumariamente excretadas. Ou seja, para passar na *RO5*, a molécula deve possuir massa molecular (MM) menor ou igual a 500 g/mol, compostos com MM maior podem reduzir a sua solubilidade, além de apresentarem dificuldade para atravessar a bicamada lipídica. Essa regra avalia também a lipofilicidade dos compostos, expressa pelo logP menor ou igual a cinco (coeficiente de partição em *n*-octanol e água). Os compostos devem possuir cinco ou menos grupos doadores de ligação hidrogênio (nDLH) e valor menor ou igual a dez grupos aceptores de ligação hidrogênio (nALH). Com o aumento de ligações de hidrogênio podem favorecer a solubilidade do composto bioativo em meio aquoso, porém

impede a passagem, por exemplo, na bicamada fosfolipídica da membrana plasmática de células, por aumentar a quantidade de ligações de hidrogênio que devem ser quebradas (LIPINSKI et al., 1997; ROMERO et al., 2014).

Entretanto, algumas classes terapêuticas com boa biodisponibilidade oral constituem exceção a esta regra: antibióticos, antifúngicos, vitaminas e glicosídeos cardiotônicos. De acordo com Lipinski (2004), uma possível explicação para estas substâncias que violam sua regra seria que membros destas classes terapêuticas apresentam características estruturais que permitem ao fármaco atuar como substrato para transportadores que ocorrem naturalmente (LIPINSKI, 2004). Existe uma extensão da *RO5*, que foi formulada após o estudo de uma série de compostos testados em ratos. Com isso, evidenciou-se que compostos com o número de ligações rotáveis (nLR) menor do que dez e área de superfície polar (PSA) menor ou igual a 140 Å apresentaram melhor biodisponibilidade oral em ratos, conhecida também como filtro de Veber (VEBER et al., 2002; ZIEMSKA et al., 2020).

Outras regras também foram adicionadas afim de se obter uma efetiva biodisponibilidade do fármaco, sendo criadas por diferentes indústrias farmacêuticas. A regra de Ghose que estabelece a MM entre 160 a 480 g/mol, o logP deve ser entre -0,4 a 5,6 e o número total de átomos do composto deve ser de 20 a 70 (GHOSE et al., 1999). A regra de Muegge afirma que o composto deve apresentar MM entre 200 a 600 g/mol, o logP deve ser menor ou igual a 5, o nALH deve ser menor ou igual a 10, o nDLH deve ser menor ou igual a 5, o nLR deve ser menor ou igual a 15 e a PSA deve ser menor ou igual a 150 $Å^2$ (COCCO et al., 2020; DAINA et al., 2017; MUEGGE et al., 2001; ZIEMSKA et al., 2020).

O estudo *in silico* aplicando esses parâmetros ou filtros, tem o intuito de avaliar qualitativamente a chance de uma molécula se tornar um medicamento oral em relação à biodisponibilidade. Para tal fim são empregados softwares que permitem realizar a filtragem de bibliotecas químicas para excluir moléculas com propriedades provavelmente incompatível com um perfil farmacocinético aceitável (DAINA et al., 2017). Neste trabalho para avaliar o perfil farmacocinético dos compostos ensaiados frente a enzima urease foram utilizados dois softwares *ChemSpider* e o *Swiss*ADME.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo a realização de triagens *in vitro* e *in silico* de compostos sintéticos e de origem natural buscando inibidores da enzima urease e da bactéria *H. pylori*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o valor da constante de Michaelis Menten (K_m) e Velocidade máxima ($V_{máx}$) da urease de *Canavalia gladiata* (*jack bean*) (UJB);
- Triar compostos sintéticos e produtos naturais frente à UJB;
- Determinar o valor de IC_{50} dos compostos mais ativos;
- Identificar por meios de ensaios de cinética enzimática os possíveis mecanismos de inibição dos compostos que forem potentes inibidores;
- Realizar o *docking* molecular para melhor compreensão do mecanismo de inibição;
- Avaliar o potencial inibitório dos compostos frente a *H. pylori*;
- Avaliar o perfil farmacocinético de todos os compostos testados frente a UJB por meio de estudos *in silico*.

3. Parte experimental

3.1 Reagentes e solventes

- Kit Ureia (Bio Clin, Brasil), contendo ureia padrão (70 mg/dL); solução enzimática (urease a 10.000 UI e tampão fosfato 100 mmol/L (pH 6,8)); tampão estoque (tampão fosfato 100 mmol/L (pH 7,5), nitroprussiato de sódio 5 mmol/L, salicilato de sódio 300 mmol/L); e oxidante estoque (hidróxido de sódio 1,5 mol/L e hipoclorito de sódio 10 mmol/L);
- Água ultrapurificada pelo sistema MILLI-Q *Direct*;
- Dimetilsulfoxido (DMSO) da marca Mallinckrodt Chemicals;
- DMSO deuterado (DMSO-d_6) (Sigma-Aldrich).
- Caldo *Brain heart infusion* (BHI) (Merck Millipore cod. 110493, Darmstadt, Alemanha);
- Soro fetal bovino (SIGMA cod. F2561; St. Louis, MO, USA);
- Cepa de referência de *H. pylori* ATCC 43504;
- Meio Agar Columbia contendo 5% de sangue de carneiro;
- Amoxicilina (SIGMA cod. A8523; St. Louis, MO, USA);
- Metronidazol (SIGMA cod. M3761; St. Louis, MO, USA);

3.2 Procedimentos experimentais

Os ensaios enzimáticos foram realizados por meio de leituras espectrofotométricas, baseados na absorbância (ABS) do sal azul de indofenol, utilizando o método modificado de Berthelot (DE SOUSA et al., 2014; FAWCETT et al.; 1960; MOTOSHIMA et al., 2018).

3.2.1 Preparo dos reagentes

As soluções foram preparadas a partir de um kit (Bio *Clin*). Em um tubo *Falcon* de 50 mL foi adicionado 10 mL do tampão estoque, no qual contém tampão fosfato a 100 mmol/L (pH 6,8), nitroprussiato de sódio ($Na_2[Fe(CN)_5NO]$) a 5 mmol/L, salicilato de sódio ($C_7H_5NaO_3$) a 300 mmol/L, e em seguida foi acrescentado 40 mL de água ultrapurificada e a solução foi homogeneizada. Sendo armazenado a temperatura entre 2 a 8°C.

O preparo da Solução I (SI) foi realizado no momento do ensaio, de acordo com a quantidade de amostras, sendo necessário 200 µL da solução enzimática (enzima UJB (*Canavalia gladiata*) (10,000 IU)) para cada 4 mL da solução tampão (diluição descrita acima). Esta solução ficou mantida em banho de gelo até utilização no ensaio enzimático.

Para o preparo do Solução II (SII), em um tubo *Falcon* adicionou-se 5 mL do oxidante estoque, que consiste em hidróxido de sódio (NaOH) a 1,5 mol/L e hipoclorito de sódio (NaClO) a 10 mmol/L, sendo em seguida adicionado 45 mL de água ultrapurificada. A solução II também é armazenada em temperatura entre 2 a 8°C até a sua utilização.

3.2.2 Curva padrão de ureia

A curva padrão de ureia foi realizada para calibração do experimento, utilizando as seguintes concentrações 0,75 mmol/L; 1,33 mmol/L; 1,75 mmol/L; 2,55 mmol/L; 4,08 mmol/L; 5,83 mmol/L; 8,16 mmol/L e 9,16 mmol/L. Em microtubos de eppendorf foram pipetados 20 µL das soluções de ureia, previamente preparadas, e adicionados 1000 µL da SI, e incubando na estufa à 37°C por 10 minutos. Em sequência foi acrescentado 1000 µL da SII e novamente incubado nas mesmas condições. As leituras foram realizadas em duplicata no espectrofotômetro ultravioleta e visível (*Ocean Optics* MINI-2-GS) à 600 nm.

3.2.3 Determinação dos parâmetros cinéticos: constante de Michaelis Menten (K_m) e a Velocidade máxima ($V_{máx}$)

Para a obtenção dos parâmetros cinéticos da enzima UJB foi realizado titulações do substrato conforme descrito para obtenção da curva padrão de ureia (item **3.3.2**). Os valores de absorbância medidos à λ = 600 nm foram convertidos a taxa reacional (Velocidade = [azul de indofenol]/tempo). Os parâmetros cinéticos da enzima foram obtidos a partir do programa GraFit 5.0.13 (*Erithacus Software* Ltd. 2006), por meio do comportamento gráfico utilizando o método de linearização de Lineweaver-Burk (**Eq. 1**) foi determinado o valor da K_m e a $V_{máx}$. Na equação [S] = concentração de substrato (ureia), K_m = constante de Michaelis Menten, $V_{máx}$ = velocidade máxima e V_0 = velocidade inicial.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{máx}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{máx}} \qquad \textbf{Eq. 1}$$

3.2.4 Determinação da concentração molar da enzima UJB

Conforme descrito por Dixon e colaboradores (1995) e Barrett e colaboradores (1982), a determinação da concentração molar da UJB foi realizada por titulação do inibidor padrão, a tioureia, variando de 250 a 1 µmol/L, concentrações escolhidas com base em seu valor de IC_{50}. Após o preparo dessas soluções em microtubos eppendorf, foram pipetados 20 µL do substrato, e 10 µL do inibidor e em seguida adicionado 1000 µL da SI, e incubando na estufa à 37°C por 50 minutos, após foi acrescentado 1000 µL da SII, e novamente incubando, por 10 minutos a à 37°C (WAHID et al., 2019; PEYTAM et al., 2019). As leituras foram realizadas em duplicata no espectrofotômetro ultravioleta e visível (UV-Vis) à 600 nm. Para determinar a concentração da enzima foi plotado um gráfico utilizando a atividade (%) *versus* a concentração da tioureia (µmol/L), utilizando o mesmo programa GraFit® 5.0.1.

3.2.5 Triagem das amostras

Inicialmente foi realizada uma triagem para verificar os compostos capazes de inibir a UJB. Na Tabela 2 estão as estruturas das moléculas testadas frente a essa enzima.

Tabela 2. Estruturas dos compostos testados frente a UJB.

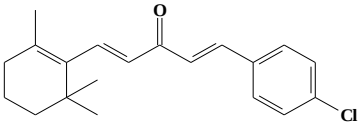
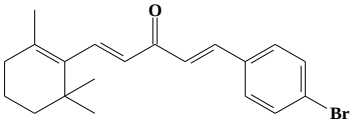
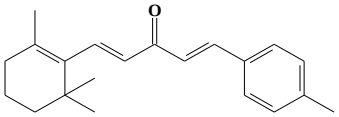
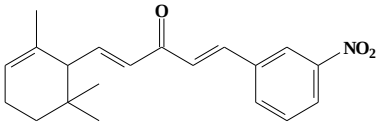
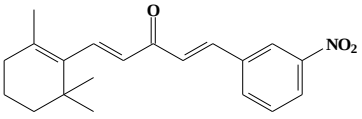
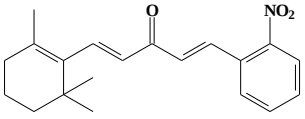
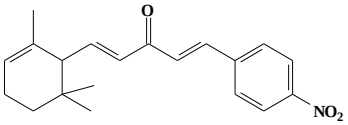
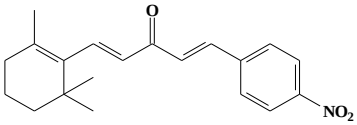
Cod.	Estrutura	Cod.	Estrutura
1a		**1b**	
1c		**1d**	
1e		**1f**	
1g		**1h**	

Tabela 2. Continuação.

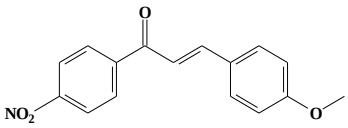
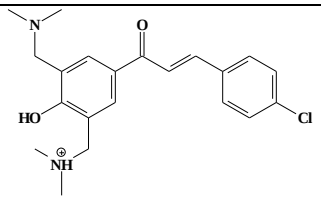
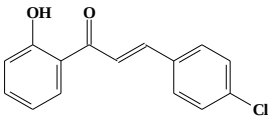
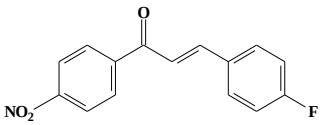
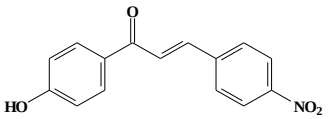
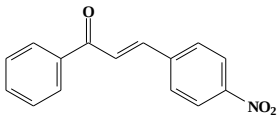
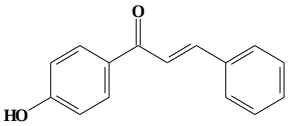
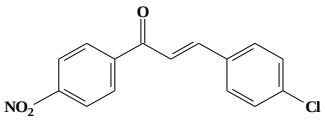
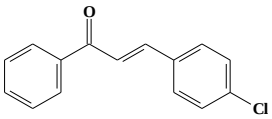
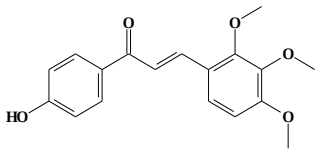
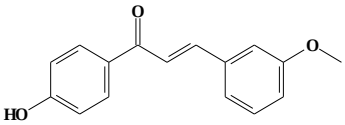
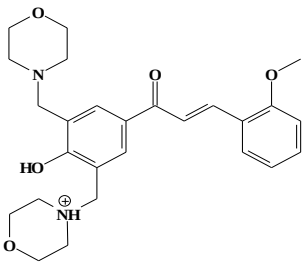
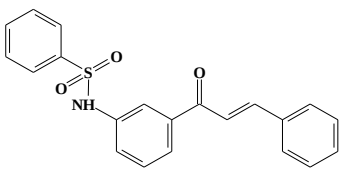
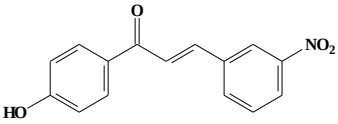
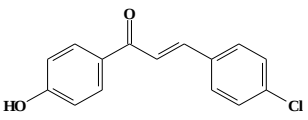
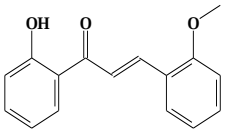
Cod.	Estrutura	Cod.	Estrutura
2a		**2b**	
2c		**2d**	
2e		**2f**	
2g		**2h**	
2i		**2j**	
2k		**2l**	
2m		**2n**	
2o		**2p**	

Tabela 2. Continuação.

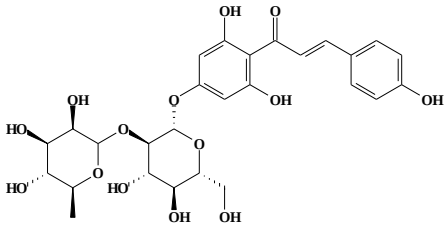
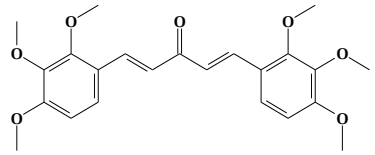
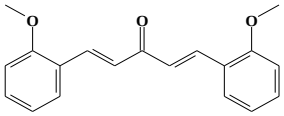
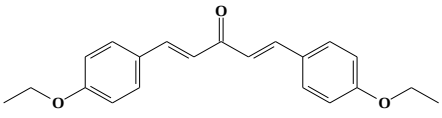
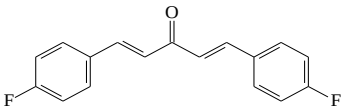
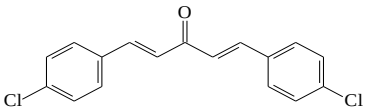
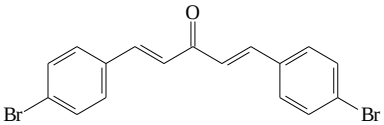
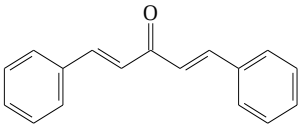
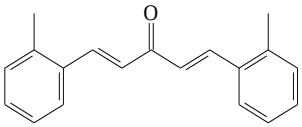
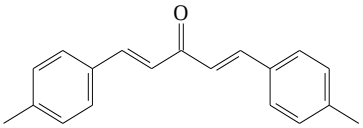
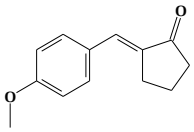
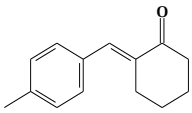
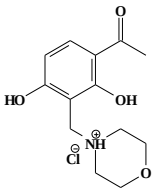
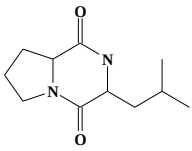
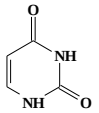
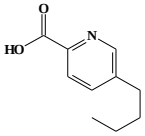
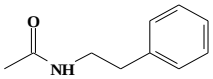
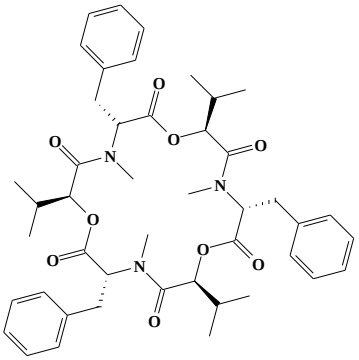
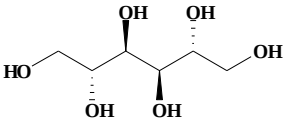
Cod.	Estrutura	Cod.	Estrutura
2q		**3a**	
3b		**3c**	
3d		**3e**	
3f		**3g**	
3h		**3i**	
4a		**4b**	
4c		**5a**	
5b		**5c**	

Tabela 2. Continuação.

Cod.	Estrutura	Cod.	Estrutura
5d		**5e**	
6a			

As chalconas (**1a**-**1h**, **2a**-**2q**, **3a**-**3i**) e derivados (**4a**-**4c**) foram fornecidos pela Prof.ª Dr.ª Caridad N. Perez (Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás-UFG Goiânia). As chalconas foram sintetizadas conforme metodologias descritas por Bernardes (2018), Lima et al. (2016) e Ramalho et al. (2013).

O extrato e os compostos (**5a**-**5e**) isolados do fungo *F. proliferatum* do abacaxi (*Ananas comosus*) foram cedidos pelo Prof. Dr. Paulo Cesar Vieira (Departamento de Química, Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto, São Paulo). O extrato e o composto (**6a**) obtido pela precipitação em processo de extração do fungo *Pholiota nameko* foi cedido pela Prof.ª Dr.ª Elaine Rosechrer Carbonero (LaBiOrg - Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão).

As amostras dos compostos puros foram inicialmente solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 50 mmol/L, em seguida diluídos até a concentração de 500 µmol/L em solução aquosa de DMSO 2%. Os extratos foram solubilizados em DMSO na concentração de 10.000 µg/mL, e diluídos até a concentração de 250 µg/mL em DMSO 2%. Foi utilizado o ultrassom (Branson 2510) para a solubilização das amostras. As concentrações finais dos analitos na reação enzimática foram de 2,5 µg/mL para extratos e 5 µmol/L para os compostos.

Em microtubos de 2000 µL foram pipetados 10 µL de cada solução dos compostos e 1000 µL da SI foram adicionados juntamente com 20 µL de substrato ([ureia] = 8,16 mmol/L), com incubação à 37°C por 10 min. Em seguida, 1000 µL da SII foi adicionado e incubado nas mesmas condições. Após a reação a absorbância foi medida à 600 nm no espectrofotômetro. Os

ensaios foram realizados em duplicata e foi usado um controle negativo (DMSO 2%) e controle positivo (tioureia à 5 µmol/L).

Utilizando a equação da reta obtida a partir da regressão linear da curva padrão de ureia, os valores de absorbância foram convertidos em concentração de produto reacional (azul de indofenol) e em taxa reacional. A inibição foi calculada conforme equação 2 abaixo.

$$\%\text{Inibição} = 100 \times (1 - V_i/V_o) \qquad \textbf{Eq. 2}$$

- V_i = velocidade de reação na presença do inibidor.
- V_o= velocidade de reação na ausência do inibidor.

Após a triagem, os compostos que apresentaram inibição significativa frente à urease (superior a 50%), foram determinados os valores de IC_{50}.

3.2.6 Determinação dos valores de IC_{50}

A medida do valor de IC_{50} está relacionado a capacidade de um composto de inibir determinado alvo biológico, que neste caso foi empregado para verificar o potencial de inibição frente a enzima UJB. Sendo assim, o valor de IC_{50} especifica a concentração necessária para um composto inibir metade do efeito biológico máximo da enzima (COPELAND, 2000).

A determinação dos valores de IC_{50} dos compostos **5a**-**5e** foi realizada usando concentrações entre 0,1 a 350 µmol/L. E para as chalconas sintéticas (**1a**-**1h**, **2a**-**2q**, **3a**-**3i**) e derivados (**4a**-**4c**) foram utilizadas concentrações entre 0,5 a 250 µmol/L, todas as soluções preparadas em DMSO 2%. A potência do composto **6a** foi determinada usando as concentrações na faixa de 10 a 500 µmol/L. Os ensaios procederam nas mesmas condições descritas anteriormente (item **3.2.5**) e a escolha das concentrações foram baseadas nos dados de inibição de cada composto. A absorbância medida foi usada para o cálculo da inibição nas diferentes concentrações das amostras e foi construído uma curva (concentração (µmol/L) *vs* resposta (%)) utilizando o programa GraFit® 5.0.13. Os valores de IC_{50} obtidos foram determinados pelo método de regressão não-linear (**Eq. 3**). Os ensaios foram realizados em duplicada e repetidos em experimentos individuais.

O controle positivo (tioureia) também foi submetido a esse ensaio para determinar o valor de IC_{50}, as concentrações utilizadas variaram de 1 a 250 µmol/L, usando as mesmas condições do ensaio, porém houve uma modificação em relação ao tempo de incubação, a primeira etapa

reacional com a SI foi incubada por 50 minutos o restante seguiu da mesma forma (PEYTAM et al., 2019).

$$y = \frac{Range}{1+\left(\frac{x}{\mathrm{IC}_{50}}\right)^{s}} + \mathrm{Background} \qquad \textbf{Eq. 3}$$

3.2.7 Determinação do mecanismo de inibição

Após a determinação dos valores de IC_{50} os compostos mais potentes foram selecionados para os ensaios cinéticos afim de se obter experimentalmente o mecanismo de inibição. O experimento foi realizado nas mesmas condições usadas para a triagem dos compostos (item **3.2.5**), porém com a variação da concentração do substrato para avaliar o comportamento da enzima na presença do inibidor. Com base no valor do K_m do substrato frente a UJB, foram selecionadas as concentrações para este experimento (0,75; 1,33; 1,75; 2,55; 4,08; 5,83; 8,16 e 9,16 mmol/L), as outras condições experimentais foram mantidas constantes, tais como a concentração da enzima e do inibidor.

Três curvas foram construídas com concentrações de inibidores diferentes, que foram selecionas com base na inibição e no valor de IC_{50} (25%, 50% e 75% de inibição). Utilizando como controle uma curva sem a adição de inibidor. Os experimentos foram realizados em duplicata e em três experimentos individuais. Os dados foram tratados e plotados no GraFit® utilizando o método de Lineweaver-Burk (CORTÉS, et al., 2001; DE SOUSA, et al., 2015; COPELAND, 2000).

Após a determinação do mecanismo de inibição foi calculado a constante de dissociação do complexo enzima-inibidor (K_i), fazendo uso dos parâmetros de IC_{50} de cada composto e o tipo de inibição, sendo aplicadas as equações para inibidor competitivo (**Eq. 4**) e não-competitivo (**Eq. 5**) (COPELAND, 2000).

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1+\frac{[S]}{K_m}} \qquad \textbf{Eq. 4}$$

$$IC_{50} = \frac{[S]+K_m}{\frac{K_m}{K_i}+\frac{[S]}{\alpha K_i}}, \text{ se } \alpha = 1,\ K_i = \mathrm{IC}_{50} \qquad \textbf{Eq. 5}$$

3.2.8 Procedimento de recristalização do manitol e análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O composto **6a** foi obtido na forma de precipitado em um processo de extração hidroalcóolica do fungo *Pholiota nameko*, para sua identificação foi utilizando a técnica de RMN (Bruker, modelo: *acender*, 400MHz de ^{1}H; 100MHz ^{13}C). O preparo da amostra foi realizado pesando cerca de 10 mg e solubilizando em 600 µL de DMSO deuterado (DMSO-d6) em tubo de RMN. Este experimento foi realizado em parceria com o Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (UFU – Uberlândia/MG).

Com o intuito de purificar a amostra identificada como manitol (**6a**) para realização do ensaio enzimático o composto foi recritalizado. O processo de recristalização foi conduzido em um sistema de refluxo com aquecimento até a solubilização de todo material, cerca de 60°C por aproximadamente 40 min, seguido de resfriamento por 12 h (PAVIA et al., 2009; RODRIGUES et al., 2010). Os cristais obtidos foram então filtrados a vácuo e secos para repetição do experimento de RMN de ^{1}H e ensaio enzimático em UJB.

3.2.9 Avaliação da atividade anti *H. pylori*

Este ensaio foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Rodrigo Rezende Kitagawa (Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES). A atividade sobre o crescimento bacteriano foi avaliada através da concentração inibitória mínima (CIM), pela da técnica de microdiluição em caldo e concentração bactericida mínima (CBM) de acordo com a norma CLSI M7-A10, 2015 (*Clinical & Laboratory Standards Institute*) com adaptações.

O ensaio antimicrobiano foi realizado utilizando a cepa de referência de *H. pylori* ATCC 43504, amoxicilina sensível e metronidazol resistente, cultivada inicialmente em placas contendo Agar Columbia contendo 5% de sangue de carneiro e incubados por 72 horas a 37 °C, em atmosfera microaerofila, contendo 10% de CO_2. Posteriormente as colônias foram repicadas para caldo *Brain heart infusion* (BHI) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino e incubadas sob as mesmas condições.

O controle anti-*H. pylori* utilizados nos ensaios foram os antibióticos amoxicilina e metronidazol, nas concentrações variando de 0,078 – 5 µg/mL e 0,25 - 512 µg/mL, respectivamente (KITAGAWA et al., 2012).

3.2.9.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM)

Para determinar a CIM, em cada poço da microplaca de 96 orifícios foram adicionados 100 µL de diferentes concentrações das amostras (32 - 1024 µg/mL) e o mesmo volume da suspensão bacteriana (diluição 1:20 da escala 0,5 mcfarland) em BHI suplementado. Para o controle de crescimento bacteriano, foram adicionados a suspensão bacteriana e meio BHI e para o controle negativo, somente amostras e meio BHI suplementado. A inibição do crescimento foi determinada através da diferença de absorbância em 620 nm obtida antes e após incubação por 72 horas a 37°C, em atmosfera contendo 10% de CO_2. A CIM foi definida, graficamente, como sendo a menor concentração das amostras que induziram a um brusco declínio no valor da absorbância (90% de inibição) (KITAGAWA et al., 2012).

A CBM foi determinada pela menor concentração das amostras capaz de inibir a formação de colônias em placas de Agar Columbia contendo sangue de carneiro 5% (incubada a 37°C/CO_2 10% por 72h), as concentrações testadas foram às correspondentes aos poços da microplaca do teste de CIM sem crescimento aparente (KITAGAWA et al., 2012).

3.2.10 *Docking* molecular

Essa etapa foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Rodrigo Rezende Kitagawa (Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Por meio desse experimento realizado com a urease de *H. pylori* (UHP), foi possível visualizar as possíveis interações com o síito ativo da enzima e assim compreender melhor o mecanismo de inibição dos compostos determinados pelo ensaio *in vitro*. O programa utilizado foi o GOLD, o inibidor referência foi o ácido acetihidroxâmico ($C_2H_5NO_2$) (VERDONK et al., 2003). Utilizou-se o complexo cristalográfico PDB ID: 1E9Y (KIRCHMAIR et al., 2008). Foi empregada a função de *score ChemScore* para a classificação das melhores poses no sítio ativo.

3.2.11 Avaliação da biodisponibilidade oral *in silico*

As propriedades farmacocinéticas dos compostos (Tabela 2) foram analisadas utilizando dois *softwares* o *ChemSpider* e o *Swiss*ADME. O ChemSpider é uma base de dados de acesso livre que pertence à *Royal Society of Chemistry* e fornece variadas informações de mais de 58 milhões de substâncias químicas a partir de aproximadamente 500 fontes de dados (SANTOS

et al., 2017). O SwissADME fornece acesso a cinco diferentes filtros baseados em regras, com diversas faixas de propriedades. Estes filtros geralmente são originários de análises de grandes empresas farmacêuticas, com o objetivo de melhorar a qualidade dos produtos. Esses filtros são de Lipinski (*Pfizer*) com a *RO5*, e os métodos Ghose (*Amgen*), Veber (*GSK*), Egan (*Pharmacia*) e Muegge (*Bayer*) adaptados (DAINA et al., 2017).

4. Resultados e Discussões

A busca de inibidores de urease é altamente relevante, tendo em vista que essa enzima está relaciona a sobrevivência da *H. pylori*, bactéria envolvida em diversas patologias (O'CONNOR et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2016). Neste trabalho, diversos compostos foram testados frente UJB, destacando-se alguns potentes inibidores. Para o estudo enzimático desses compostos foi empregado o método modificado de Berthelot. O método está baseado na hidrólise da ureia pela urease, formando amônia (NH_4^+), que em meio alcalino (NaOH) e na presença de um catalisador inorgânico ($Na_2[Fe(CN)_5NO]$), reage com salicilato de sódio ($C_7H_5NaO_3$) e hipoclorito de sódio (NaClO) formando o azul de indofenol (coloração verde) (Figura 11). A medida da atividade enzimática é fundamentada na leitura espectrofotométrica do sal azul de indofenol no comprimento de onda (λ) de 600 nm (FAWCETT et al.,1960; DE SOUSA et al. 2014).

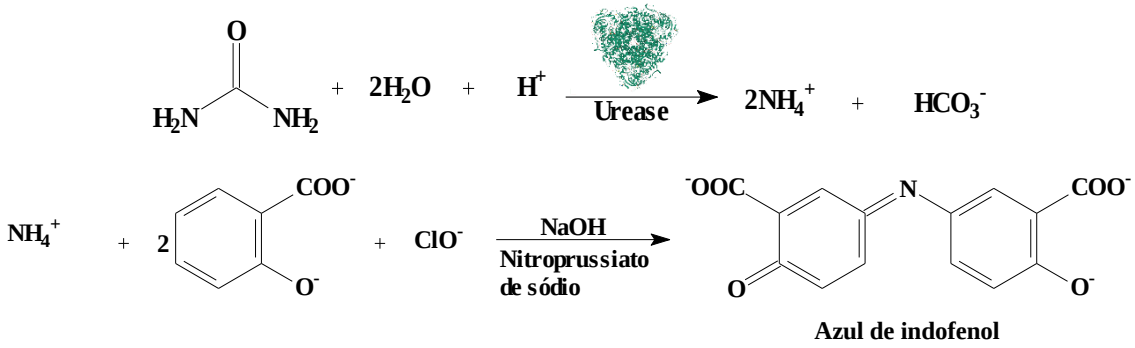


Figura 11. Etapas reacionais do ensaio enzimático de UJB.

Utilizando o método espectrofotométrico de Berthelot, inicialmente foi construído uma curva de calibração variando as concentrações de ureia, os dados foram plotados, gerando um gráfico de ABS *vs* concentração de ureia (mmol/L), e por meio da equação linear gerada foi possível converter os valores de ABS das amostras testadas em taxas reacionais do produto formado.

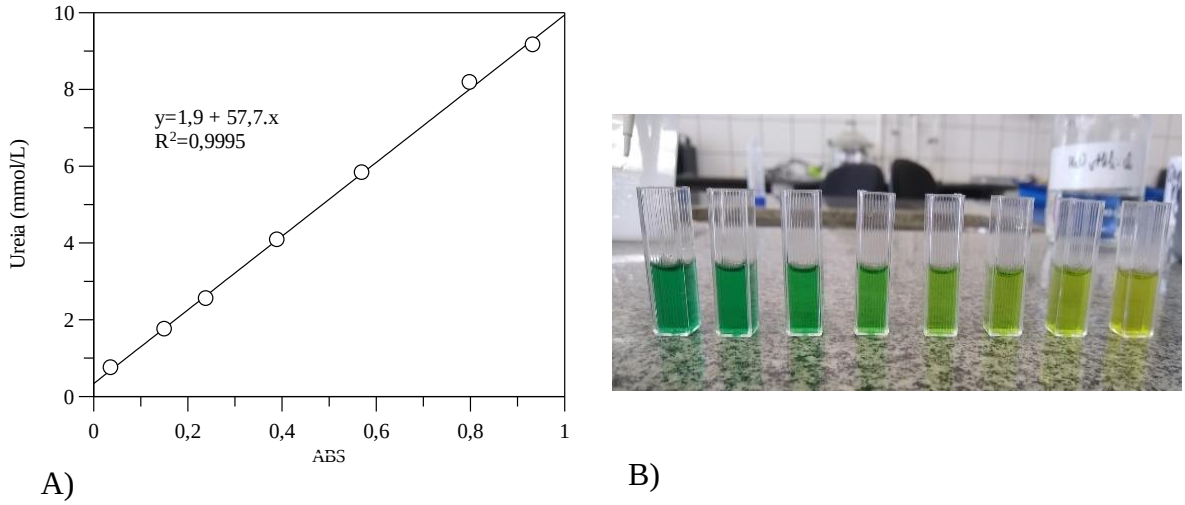


Figura 12. Curva padrão. **A)** gráfico: ABS *versus* concentração de ureia (mmol/L); **B)** Coloração observada após as etapas reacionais, sendo a cor proporcional a formação de azul de indofenol.

4.1 Parâmetros de cinética enzimática da UJB

A cinética enzimática de reações catalisadas por enzimas é descrita pela equação de Michaelis Menten, que demostra a relação entre a velocidade inicial (V_0) e a concentração de um substrato [S]. Por meio dessa equação (**Eq. 6**) são obtidos parâmetros importantes como a constante de Michaelis Menten (K_m), a velocidade máxima ($V_{máx}$) e a constante catalítica (K_{cat}), parâmetros aplicáveis na otimização das condições experimentais dos ensaios enzimáticos bem como para estudos de mecanismo de inibição entre a enzima-alvo e um possível inibidor (COPELAND, 2000).

$$V_0 = \frac{V_{máx}}{K_M + [S]} \qquad \textbf{Eq. 6}$$

A constante de Michaelis Menten (K_m) é definida como a [S] quando a V_0 é igual a $V_{máx,}$ no qual demostra a força de ligação de um substrato à enzima. Ou seja, essa constante é um importante parâmetro quantitativo, pois mede a afinidade da enzima com o substrato. A equação 6 pode ser tranformada algebricamente em outras equações, como o método de linearização (**Eq. 1**, p. 45), um dos mais utilizados, no qual os valores de K_m e a $V_{máx}$ podem ser deduzidos graficamente, utilizando $1/V_0$ e 1/[S], sendo esse chamado de método de Lineweaver-Burk ou de gráfico de duplo-recíproco (COPELAND, 2000).

Para determinação desses parâmetros para a UJB, foi realizado a leitura da velocidade da reação variando a concentração do substrato utilizando a equação de Lineweaver-Burk (Figura 13). Por meio da interseção da reta no eixo x e no eixo y, obteve-se esses parâmetros cinéticos. Os valores encontrados foram de K_m = 4,25 ± 0,62 mmol/L e $V_{máx}$ = 44,34 ± 1,33 mmol/L/min. O valor encontrado experimentalmente é aproximado aos citados na literatura para enzima UJB, valores de K_m = 8,30 ± 1,14 mmol/L à 4,3 ± 1,2 mmol/L (LAGE, et al., 2018; ZHOU et al., 2017). O valor de K_m foi usado para estabelecer a concentração de substrato de ureia no ensaio enzimático.

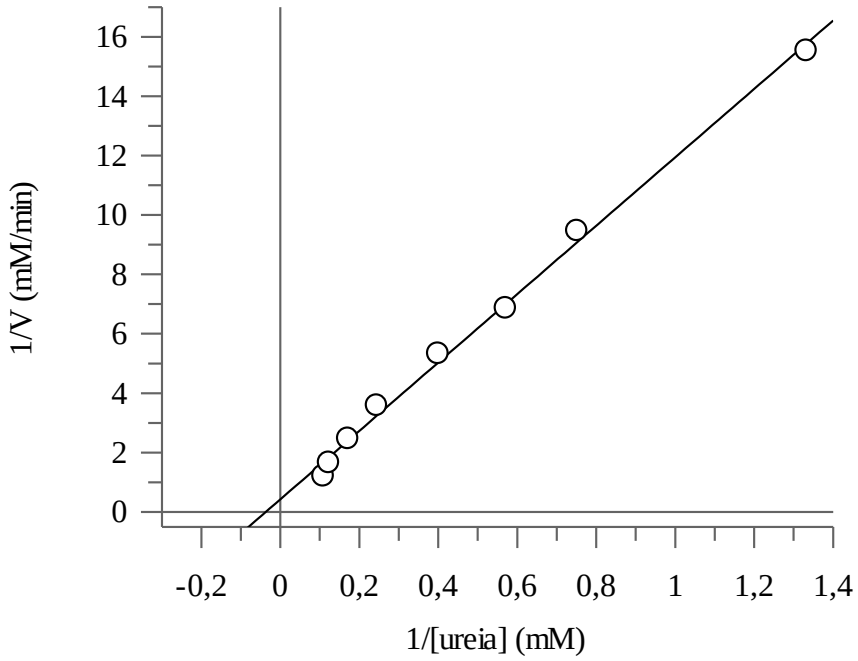


Figura 13. Gráfico de Lineweaver-Burk utilizado para determinação experimental dos valores de K_m e $V_{máx}$ da UJB.

4.1.1 Determinação da concentração da UJB e obtenção da constante catalítica (K_{cat})

A concentração da enzima UJB foi obtida experimentalmente variando as concentrações de um inibidor conhecido, a tioureia (DIXON et al., 1995; BARRETT et al., 1982). Os dados obtidos foram plotados gerando o gráfico de regressão linear, observado na Figura 14. Através da inclinação da reta foi obtido a concentração molar da enzima UJB, tendo o valor de 1,29 µmol/L.

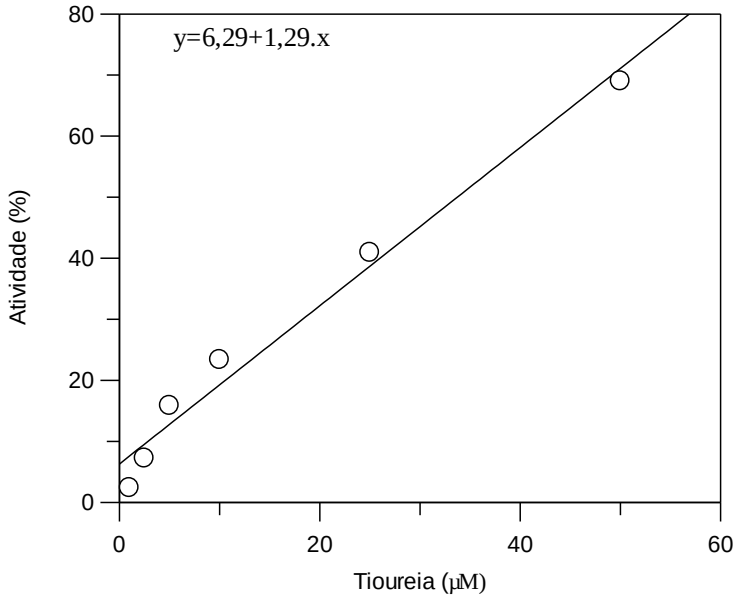


Figura 14. Gráfico da atividade (%) da UJB *versus* a concentração da tioureia, usado para determinar a concentração molar da urease.

Dando sequência a padronização do ensaio enzimático, com esse dado foi possível determinar outro parâmetro, a constante catalítica (K_{cat}) (**Eq. 7**). A K_{cat} indica a quantidade máxima de moléculas de substrato que são convertidas em produto a cada segundo, por cada sítio ativo da enzima. Dessa forma, ela descreve a eficácia da enzima, ou seja, é a medida da rapidez com que a enzima pode catalisar uma reação específica (LEHNINGER, et al., 2014). Neste caso, a K_{cat} da UJB foi de 2062,3 s^{-1}.

$$K_{cat} = \frac{V_{máx}}{[E]_{total}} \qquad \textbf{Eq. 7}$$

4.2 Triagem das amostras

Após a padronização do ensaio enzimático de UJB, foi realizada a triagem dos compostos listados na Tabela 2 (p. 46). Esse procedimento foi baseado na atividade da UJB, sendo determinada pela absorbância do sal azul de indofenol (λ = 600 nm) (DE SOUSA, et al. 2014; FAWCETT, et al.,1960; MOTOSHIMA et al., 2018). Na Figura 15 são apresentados os resultados de inibição das chalconas (**1a**-**1h**, **2a**-**2q**, **3a**-**3i**) e derivados (**4a**-**4c**) na concentração de 5 μmol/L.

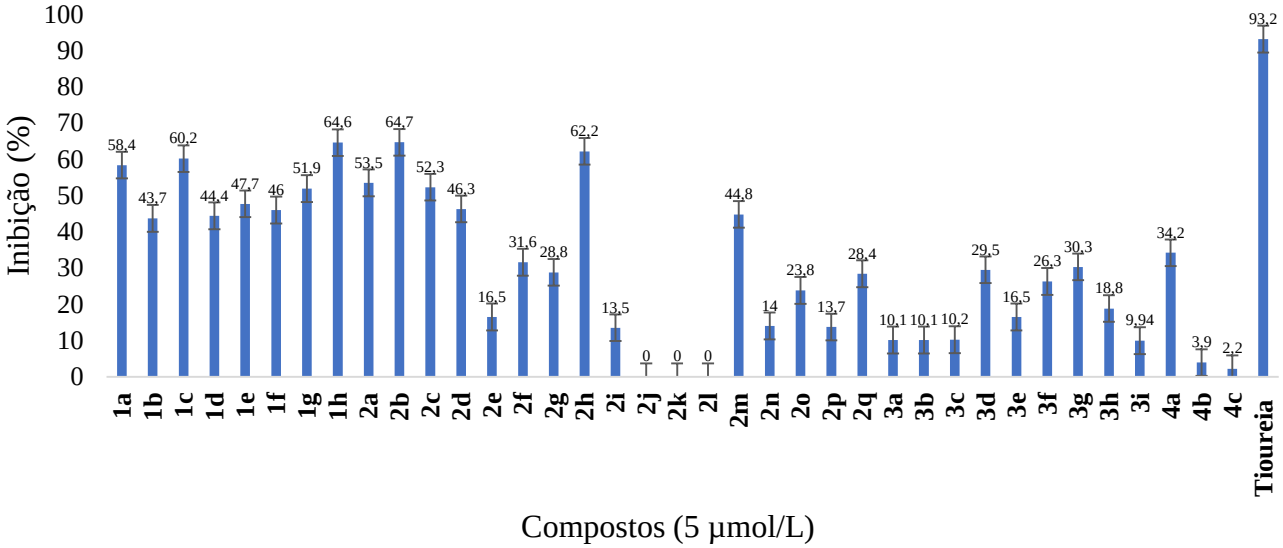
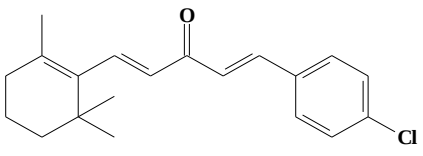
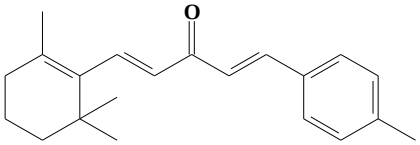


Figura 15. Inibição dos compostos **1a-1h**, **2a-2q**, **3a-3i** e **4a-4c** frente à enzima UJB na concentração de 5 µmol/L.

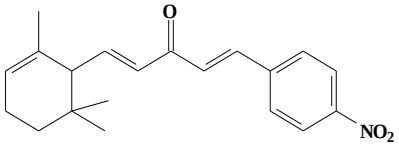
Os compostos **1a** (58%)**, 1c** (60%)**, 1g** (52%)**, 1h** (65%)**, 2a** (54%)**, 2b** (65%), **2c** (63%) e **2h** (62%**)** foram os mais potentes frente a UJB, observando-se que os compostos mais ativos apresentaram grupos retiradores de elétrons (grupo nitro e Cl) na posição *para* do anel aromático B das chalconas, com exceção da chalcona **1c** e **2a** que nesta mesma posição apresentam um grupo metil e metoxila, respectivamente.



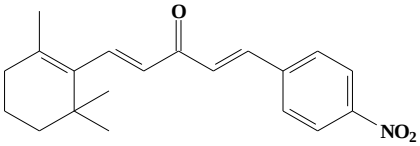
1a



1c



1g



1h

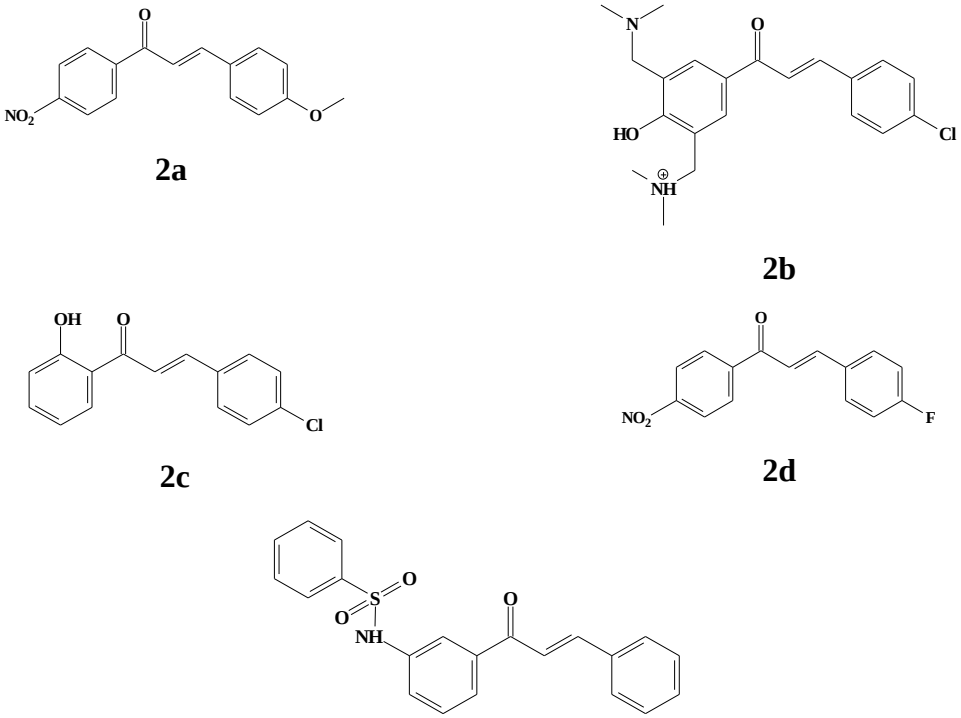


Figura 16. Estruturas da chalconas que apresentaram maior inibição frente a UJB e foram determinados os valores de IC_{50}.

As chalconas do tipo retinóide **1a-1h** são derivadas de α- e β-ionona, sendo a β-ionona um precursor na síntese de vitamina A, ácido retinóico e carotenoides (VALLA et al., 2006). Avaliando os resultados de inibição das chalconas do tipo retinóide todos os compostos (**1a-1h)** apresentaram inibição superior a 43%. Observa-se o favorecimento da atividade inibitória enzimática quando o grupo retirador de elétrons no anel B está na posição *para* (compostos **1a** (58%), **1c** (60%), **1g** (52%) e **1h** (65%)), pois quando o grupo nitro está em *meta* ou em *orto* a inibição é inferior a 50% (compostos **1d** (44%), **1e** (48%) e **1f** (46%), exceto pelo composto **1b** que o bromo está em *para* e a inibição encontrada foi de 44% sendo possivelmente devido há efeitos estéricos referente ao tamanho do átomo.

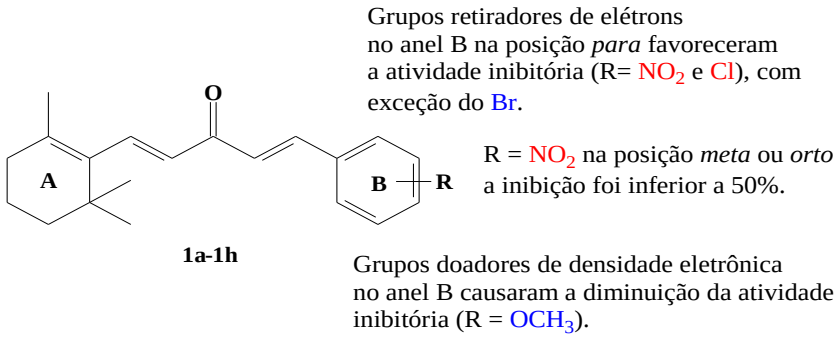


Figura 17. Principais características das chalconas (**1a-1h**) que influenciaram na inibição da UJB. Destacado em vermelho os substituintes que favoreceram a atividade inibitória e em azul os grupos que causaram a diminuição do potencial inibitório.

Nas chalconas **2a-2q** percebe-se a influência dos substituintes do anel A, onde majoritariamente os compostos com grupos doadores (metoxila e hidroxila), **2j-2l**, **2p** e **2q** tiveram inibição enzimática inferior a 50%, bem como os compostos que não tinham substituintes no anel A (**2g** e **2m**), com exceção dos compostos **2b** (65%) e **2c** (63%) que mesmo com grupos doadores tiveram inibição significativa.

Quando o anel A e B tiveram a presença de grupos doadores de densidade eletrônicoa foi observado que os compostos não inibiram a enzima UJB, como o caso dos compostos **2j, 2k** e **2l,** nos quais há a presença do grupo metoxila no anel B e hidroxila no anel A. O mesmo comportamento foi observado nos compostos **3a** (17%), **3b** (10%) **3c** e **2p** (14%). As chalconas mais potentes foram selecionadas para investigação dos valores de IC_{50}. Esses principais pontos estruturais que contribuíram para atividade inibitória das chalconas foram demostradas nas Figuras 17 e 18.

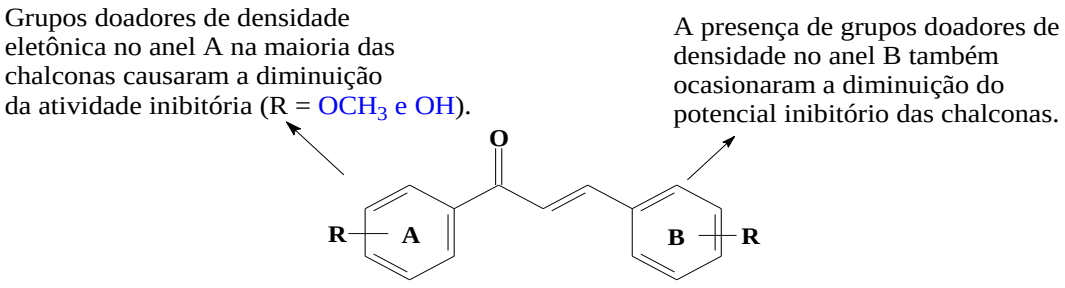


Figura 18. Principais características das estruturas das chalconas **2a-2q**, que influenciaram na inibição da UJB.

O extrato do fungo *F. proliferatum* (EFp) de *Ananas comosus* foi testado na concentração de 2,5 µg/mL e obteve uma inibição de 51%. Os compostos isolados desse extrato

também foram triados na concentração de 5 µmol/L, sendo os compostos **5a** e **5b** os mais ativos frente à UJB com inibição de 73% e 40%, respectivamente (Figura 19). Após a triagem os compostos foram submetidos ao ensaio para determinação dos valores de IC_{50}.

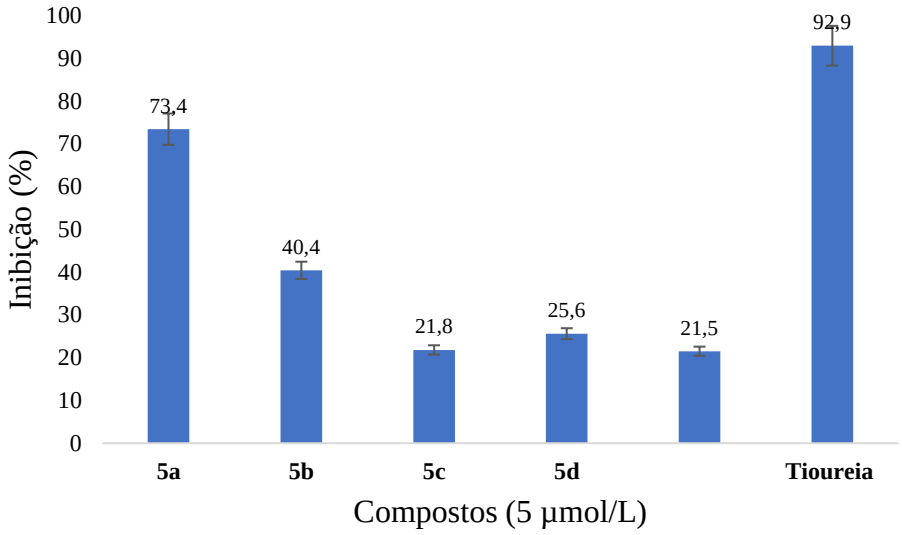


Figura 19. Percentual de inibição dos compostos **5a-5e** testados frente à UJB (5 µmol/L).

4.3 Potência inibitória, mecanismo, docking e atividade anti-*H. pylori* das chalconas

4.3.1 Determinação do valor de IC_{50} para as chalconas

Dentre as variadas estruturas de chalconas testadas no ensaio enzimático em UJB, foram escolhidas as que apresentaram inibição superior a 50% para determinar os valores de IC_{50}. Na determinação dos valores de IC_{50} das chalconas sintéticas foram utilizadas as seguintes concentrações: 250, 150, 100, 50, 25, 10, 5, 2,5, 1 e 0,5 µmol/L. Após a leitura das absorbâncias à 600 nm os valores foram convertidos em taxas reacionais e foi realizado o tratamento de dados utilizando o programa GraFit 5.0.13. Os valores de IC_{50} podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de IC_{50} das chalconas expressos em µmol/L.

Código	Compostos	Valores de IC_{50} (µmol/L)
1a	(1*E*, 4*E*) -1- (4-clorofenil)-5-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-1,4-pentadien-3-ona	13,2 ± 1,5
1c	(1*E*, 4*E*)-1-(4-metilfenil)-5-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-1,4-pentadien-3-ona	17,3 ± 0,7
1g	(1*E*,4*E*)-1-(4-nitrofenil)-5-(2,6,6-trimetil-2-ciclohexen-2-il)-1,4-pentadien-3-ona	12,9 ± 0,9
1h	(1*E*, 4*E*)-1-(4-nitrofenil)-5-(2,6,6-trimetil-2-ciclohexen-1-il)- 1,4-pentadien-3-ona	9,0 ± 1,2
2a	(*E*)-3-(4-metoxifenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona	18,8 ± 1,7
2b	(2*E*)-2-propen-1-[3,5-bis[(dimetilamino)metill]-4-hidroxifenil]-3-(4-clorofenil)-ona	11,7 ± 1,9
2c	4-cloro-2'-hidroxichalcona	5,7 ± 0,5
2d	(2*E*)-3-(4-fluorofenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona.	11,6 ± 0,5
2m	N-{3-[(2*E*)-3-fenil-2-propenoil]fenil}benzenosulfonamida	9,5 ± 0,9
	Tioureia*	29,7 ± 1,2

*Controle positivo

Realizando uma comparação com a tioureia, todas as chalconas testadas mostraram ser mais potentes que o controle positivo. Como visto anteriormente, as chalconas apresentam uma variedade de propriedades biológicas, em destaque para a atividade antibacteriana, sendo um indicativo para sua elevada atividade inibitória (ASIRI; KHAN, 2011; LAI et al., 2010).

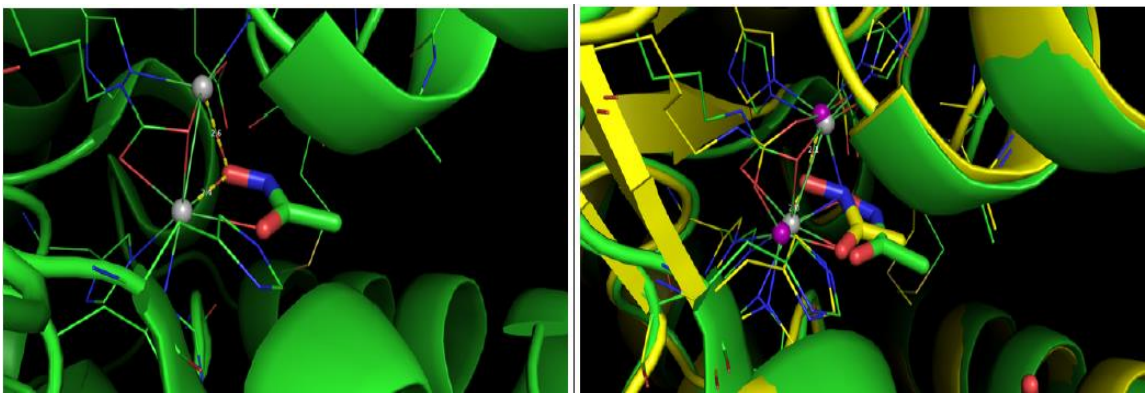
Dentre as chalconas analisadas, destaca-se as que obtiveram menores valores de IC_{50} a **1h** (9,0 ± 1,2 µmol/L)**, 2c** (5,7 ± 0,5 µmol/L) e **2m** (9,5 ± 0,9 µmol/L), quando comparadas com a literatura apresentaram maior potência que o flavonoide quercetina, IC_{50} de 11,2 ± 0,9 µmol/L, inibidor competitivo de UJB (XIAO et al., 2013). Estudos realizados com chalconas sintéticas em ensaios enzimáticos frente à urease, demostraram valores de IC_{50} variando de 32,51 a valores >100 µmol/L, destacando as atividades dos derivados benzotiazepinos que foram mais potentes (ANSARI et al., 2005). Logo, essas chalconas avaliadas em UJB apresentaram maior potência inibitória em relação as citadas na literatura.

4.3.2 *Docking* molecular das chalconas

O *docking* molecular é uma técnica computacional utilizada para analisar a formação do complexo enzima-inibidor, com o intuito de investigar quais as interações que ocorrem e como consequência entender o mecanismo de inibição. Neste estudo foi realizado *docking* molecular das chalconas (**1c**, **1h**, **2a, 2c** e **2m**) utilizando como enzima alvo a urease de *H. pylori*.

Inicialmente foi realizado uma comparação entre as ureases da espécie *Canavalia ensiformis* e de *H. pylori* (UHP), pois os ensaios *in vitro* foram realizados utilizando a enzima UJB obtida do gênero *Canavalia*. Investigações usando cálculos de *docking* para urease de *Canavalia gladiata* podem ser realizados para comparação entre as enzimas de diferentes espécies do gênero *Canavalia* (*C. gladiata* e *C. ensiformis*) em comparação com a UHP. É conhecido que as enzimas independentemente da sua origem apresentam uma conservação do sítio ativo, sendo também observado para as ureases de *C. gladiata* e *C. ensiformis* e UHP. Comparando as estruturas das enzimas UJB e UHP de diferentes origens, há 55% de similaridade (CARLINI; LIGABUE-BRAUN, 2016).

Como foi mostrado na pose do sítio ativo ambas as ureases apresentaram similaridade nos seus sítios ativos, tendo os mesmos aminoácidos coordenados no sítio ativo. As esferas em coloração cinza representam os dois átomos de níquel da UHP e as esferas de coloração rosa os átomos de níquel coordenados à UJB. Analisando a sobreposição das ureases (Figura 20), é possível verificar que em ambas os átomos de níquel estão coordenados com o mesmo aminoácido de histidina (His). Os resíduos de aminoácidos de lisina (Lys) auxiliam na formação de uma ponte através dos átomos de oxigênio e os átomos de níquel (esferas cinza e rosa). Os átomos de níquel estão ligados a dois resíduos de histidina (His) e um dos átomos de níquel está ligado a um resíduo de aspartato (Asp) (KAFARSKI; TALMA, 2018; LAGE et al., 2018).



A) B)

Figura 20. Sítio catalítico das enzimas UHP e UJB. **A)** Sítio da UHP evidenciando o carboxilato e os resíduos de His responsáveis por coordenar os átomos de níquel (representados na forma de esferas, na cor cinza). **B)** Sobreposição das enzimas UHP e UJB, evidenciando a conservação do sítio catalítico entre estas duas enzimas.

O *software* utilizado foi o *GoldScore*, os compostos foram avaliados em função da afinidade com a enzima alvo e pontuados (*score*), de acordo com a estabilidade energética. O *score* leva em consideração alguns parâmetros eletrostáticos, de Van der Waals, de ligações de hidrogênio e as interações hidrofóbicas, gerando modelos matemáticos que predizem as melhores orientações do inibidor (poses). Foi utilizado como padrão o inibidor do ácido acetohidroxâmico (IC_{50} = 0,8 µmol/L). Esses valores são observados na Tabela 4, juntamente com os valores de energia de ligação.

Tabela 4. Resultados do ensaio *in silico* para as chalconas **1c**, **1h**, **2a, 2c** e **2m**.

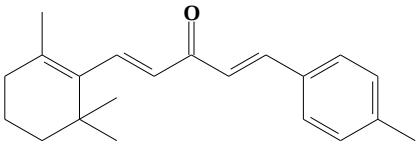
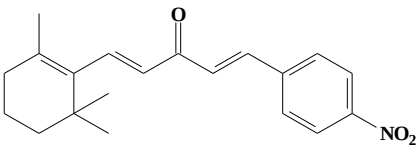
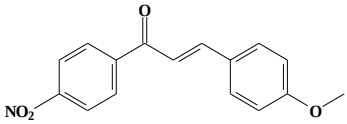
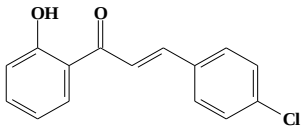
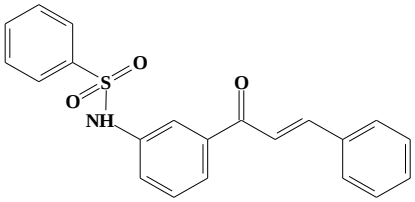
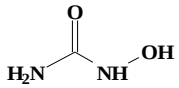
Cod.	**Estrutura**	***Score*** **(*GoldScore*)**	**Energia de ligação**
1c		23,40	-23,92
1h		40,61	-46,97
2a		34,88	-41,76

Tabela 4. Continuação.

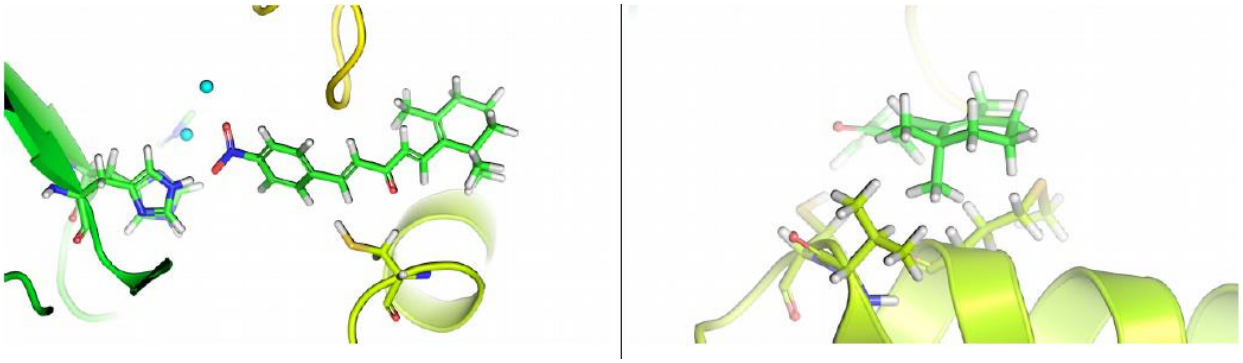
Cod.	Estrutura	*Score* (*GoldScore)*	Energia de ligação
2c		25,93	-26,94
2m		27,20	-43,79
*ácido acetohidroxâmico		40,56	-42,86

*Inibidor de UHP, controle positivo utilizado.

Os resultados foram expressos em valores de *score*¸ obtidos pela avaliação das interações entre os inibidores e a UHP através do *software*. Os valores de *score* levam em consideração qual o tipo de interação está ocorrendo, sendo assim, estruturas com maior *score* indicariam poses mais favoráveis de encaixe no sítio ativo da enzima. Em contrapartida as substâncias com valores de *score* mais baixo teriam menor potencial de interação, pois possuem um somatório de interações favoráveis menor do que uma substância ativa (VERDONK et al., 2003).

Outra maneira de analisar esses resultados é em termos da energia de ligação necessária para que o composto bioativo se ligue ao sítio ativo da enzima. Dessa forma, a molécula que apresentar menor quantidade de energia necessária para se ligar ao sítio ativo, será aquela que, teoricamente, apresentará melhor resultado de atividade biológica. Neste tipo de análise o programa utilizado vai buscar o melhor cenário energético, avaliando a complementaridade estérica e química entre o inibidor e a enzima, com o intuito de encontrar a menor energia para a formação do complexo enzima-inibidor (VERDONK et al., 2003). Observa-se os valores de *score* e energia de ligação na Tabela 4 para as chalconas, nas quais as que apresentaram melhor pontuação e a menor energia de ligação, comparáveis aos valores obtidos para o inibidor padrão de UHP (ácido acetohidroxâmico) foi as estruturas **1h**, **2a** e **2m.** A seguir se apresentam as poses dos *docking* de cada composto, bem como a análise das possíveis interações entre a enzima e os inibidores.

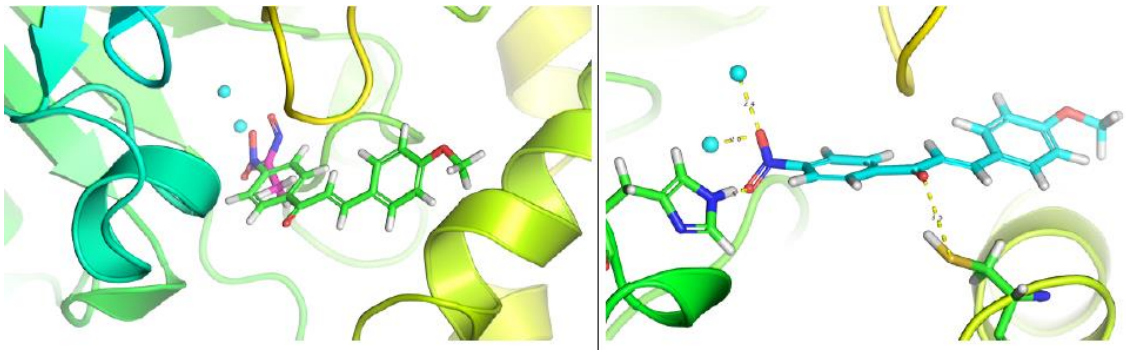
A chalcona **1h** foi a apresentou maior valor de *score* (40,61), próximo ao padrão ácido acetohidroxâmico, sendo assim o que apresento melhor estabilização no sítio ativo da UHP, por meio das poses é possível observar interações iônicas entre o grupamento nitro e o átomo de níquel (Figura 21A). O restante da estrutura também se estabiliza através de interações hidrofóbicas (Figura 21B). Além disso, foi observado que as metilas do composto interagem com os aminoácidos valina (Val320) e metionina (Met317), indicando um mecanismo de inibição competitivo.



A) B)

Figura 21. Resultado do *docking* para o composto **1h**. **A)** Pose de *docking* no sítio ativo da UHP demostrando as interações entre a molécula **1h** e os íons de níquel. **B)** Detalhe da estabilização do grupamento hidrofóbico pelos aminoácidos mais externos do sítio ativo.

O composto **2a** (*score* de 34,88) novamente está presente o grupo nitro (Figura 22A) que interage via ligação iônica com os átomos de níquel presente no sítio catalítico da enzima. O restante da estrutura química (**2a)** auxilia na estabilização da molécula no sítio ativo através de contribuições hidrofóbicas. Na Figura 22B é possível visualizar que a carbonila também auxilia na estabilização desse composto, interagindo com resíduo de metionina. A diminuição da atividade inibitória dessa chalcona possivelmente se deve à presença do grupamento metoxila do anel B, causando algum efeito estérico diminuindo a estabilidade do complexo enzima-inibidor, o que possivelmente contribuiu para a diminuição no valor de *score*.



A) B)

Figura 22. Resultado do *docking* para o composto **2a**. **A)** Pose de *docking* de **2a** no sítio catalítico da enzima UHP. **B)** Detalhe das interações favoráveis nesta região.

Ao sobrepor essas duas chalconas (Figura 23), verifica-se uma melhor estabilização do anel metilênico de **1h** do que o anel com metoxila de **2a**, podendo justificar o maior potencial inibitório do composto **1h** (IC_{50} = 9,0 ± 1,2 µmol/L) frente a UJB, enquanto a chalcona **2a** apresentou um IC_{50} de 18,8 ± 1,7 µmol/L.

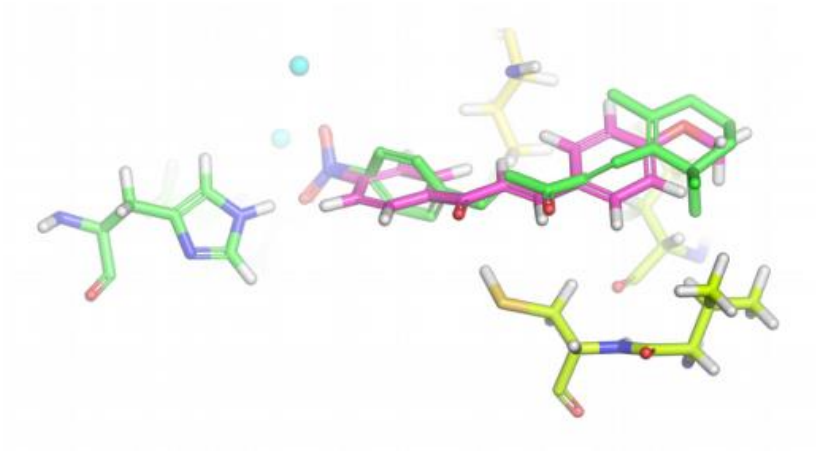
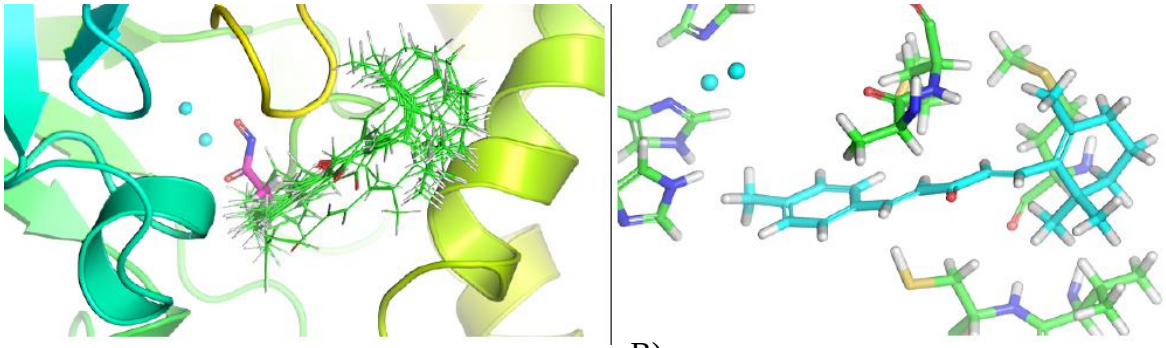


Figura 23. Sobreposição das poses de docking de **1h** e **2a** no interior do sítio ativo de UHP.

O composto **1c** mostrou na docagem molecular com UHP que a estrutura não apresentou grupamentos capazes de se estabilizar no sítio ativo da UHP, sendo assim, devido as poucas interações que estabilizam esse composto na UHP apresentou menor valor de score (23,40). As interações ocorrem um pouco mais à frente, próxima a entrada do sítio, como demostra a Figura 24A. Dessa forma, a chalcona **1c** estabiliza por meio de contribuições hidrofóbicas com alguns aminoácidos vizinhos, alanina (Ala365), metionina (Met366 e Met317), valina (Val320) e cisteína (Cys321), que compõem um bolsão (Figura 24B). Sugerindo que este composto pode

apresentar um comportamento de um inibidor não-competitivo, mesmo comportamento encontrado para alguns flavonoides, como a quercetina (XIAO et al., 2012).



A) B)

Figura 24. Resultado do *docking* para o composto **1c**. **A)** Sobreposição das poses consensuais de **1c** no sítio ativo da UHP. **B)** Estabilização da chalcona **1c** no sítio ativo por meio de contribuições hidrofóbicas.

Ao comparar os compostos **1h** e **1c,** ambas as chalconas apresentam o mesmo esqueleto, porém se diferem no substituinte na posição *para* no anel aromático, enquanto a chalcona **1h** apresenta o grupo nitro a chalcona **1c** apresenta uma metila, e isso trouxe grandes diferenças relacionadas a inibição enzimática, demostrando a importância de grupamentos aceptor de ligação de hidrogênio. Na Figura 25 se apresenta a sobreposição com ambos os compostos, sendo visualmente observado a diferença das interações e a consequência na diminuição da potência inibitória do composto **1h** e **1c** (IC_{50} de 9,0 e 17,3 µmol/L, respectivamente).

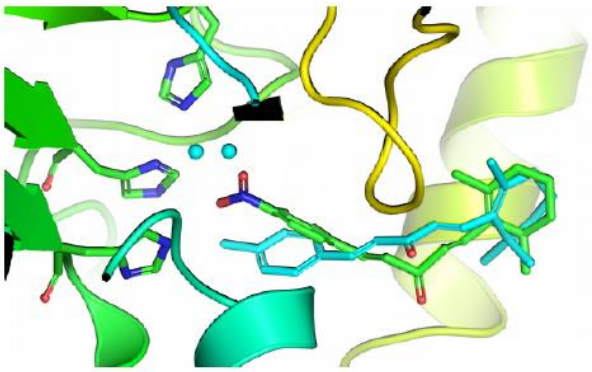


Figura 25. Sobreposição das poses de docking de **1c** e **1h** no interior do sítio ativo de UHP.

A chalcona **2c** apresentou um valor de *score* de 25,93, observa-se na Figura 26A que interage diretamente no sítio ativo da UHP se estabilizando por meio de interações iônicas entre

os átomos de níquel e os grupos hidroxila e a carbonila. O mesmo comportamento pode ser observado na Figura 26B para o composto **2m** que apresentou um valor de *score* de 27,20, ambas estruturas por interagir no sítio catalítico da UHP possivelmente são inibidores competitivos.

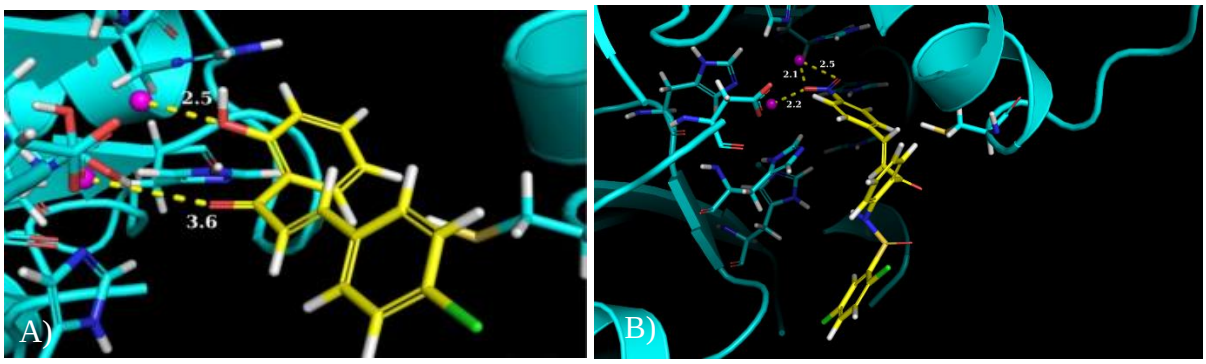


Figura 26. Resultado de *docking* para os compostos **2c** e **2m. A)** Pose do *docking* para a chalcona **2c**; **B)** Pose do *docking* para a chalcona **2m.**

4.3.3 Mecanismo de inibição das chalconas

O estudo de mecanismo consiste na avaliação da cinética enzimática, que é realizado pela determinação das taxas reacionais medidas em resposta ao aumento da concentração de substrato na presença do inibidor em concentração constante. Assim, através do tratamento dos dados obtidos experimentalmente pelo método de Lineweaver-Burk, foi possível avaliar o perfil dos inibidores quanto aos seus comportamentos.

O mecanismo de inibição das chalconas **1h**, **2a**, **1c**, **2c** e **2m** (valores de IC_{50} de 9,0; 17,3; 18,8; 5,7 e 9,5 µmol/L, respectivamente) foram determinados com a finalidade de confirmar experimentalmente o mecanismo previsto por estudos de *docking* para estes compostos.

O mecanismo de inibição foi determinado para os compostos conforme a metodologia descrita (item **3.2.7**, página 51) e tratamento dos dados usando equação de Lineweaver-Burk. A análise dos gráficos gerados tendo como base as posições de interseções das retas permitiram a determinação do tipo de inibição. As Figuras 27 a 30 são referentes aos dados cinéticos enzimáticos das chalconas **1h**, **2a**, **2c** e **2m**. É possível verificar que em ambos as retas interceptam no eixo X próximo a origem para os gráficos duplo-recíproco de Lineweaver-Burk, indicando que podem ser inibidores do tipo competitivo (CORTÉS et al., 2001; COPELAND, 2000).

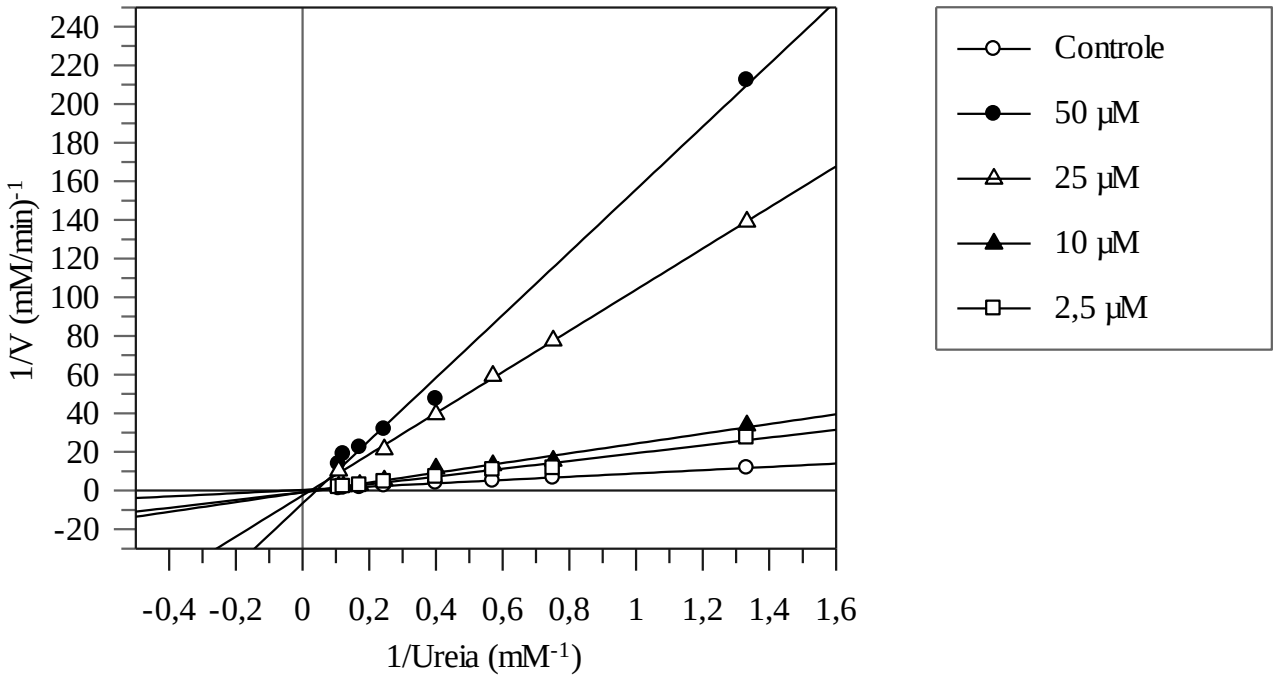


Figura 27. Gráfico representando os dados cinéticos do composto **1h** pelo método de Lineweaver-Burk, indicando um inibidor competitivo.

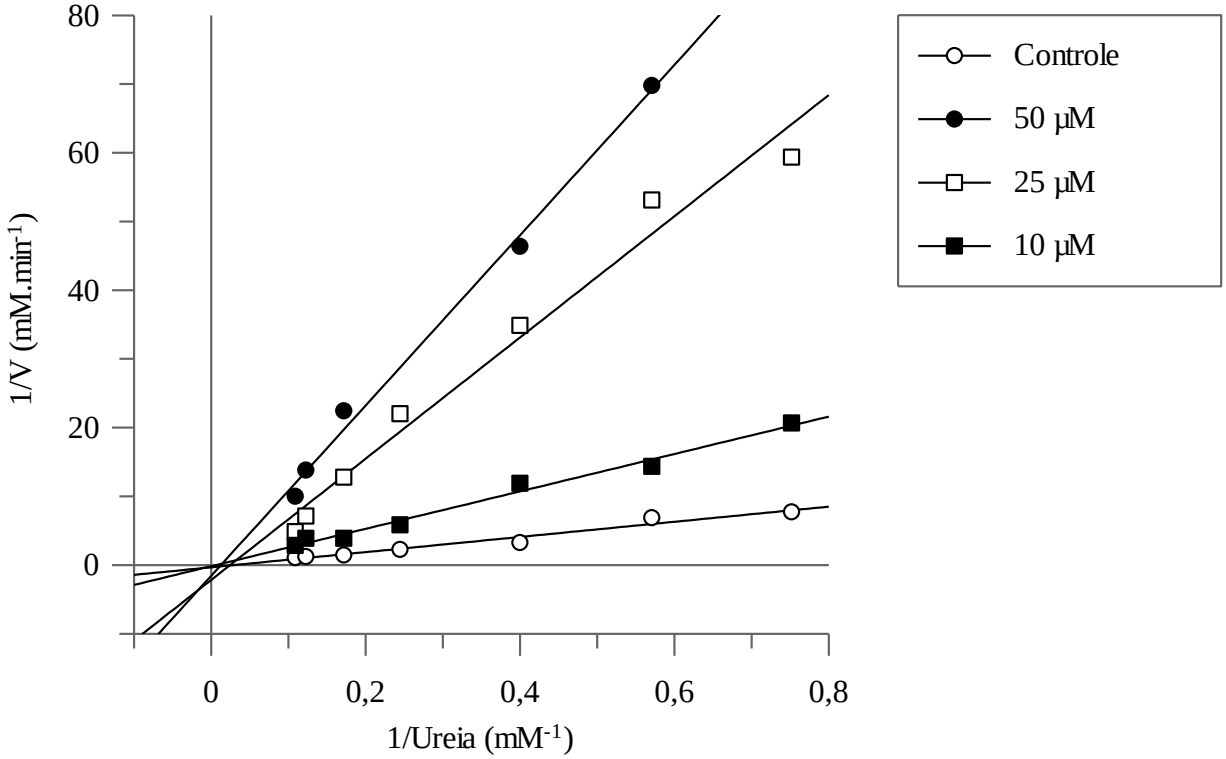


Figura 28. Gráfico representando os dados cinéticos do composto **2a** pelo método de Lineweaver-Burk, indicando um inibidor competitivo.

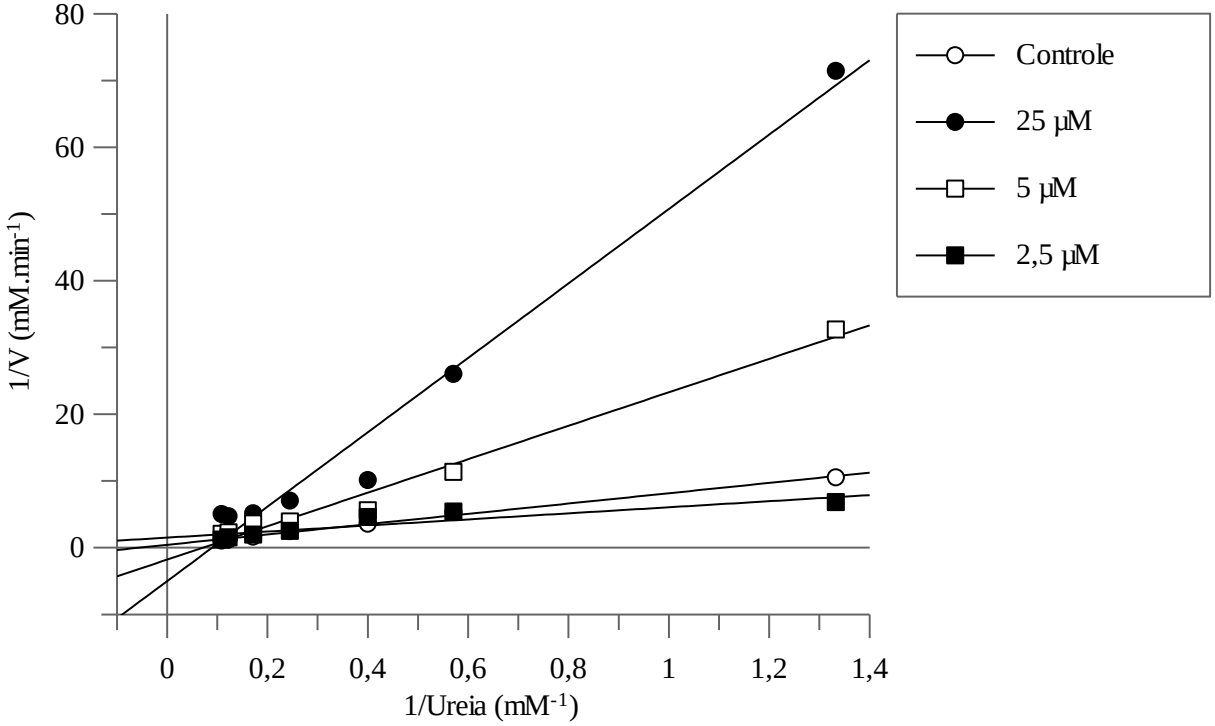


Figura 29. Gráfico representando os dados cinéticos do composto **2c** pelo método de Lineweaver-Burk, indicando um inibidor competitivo.

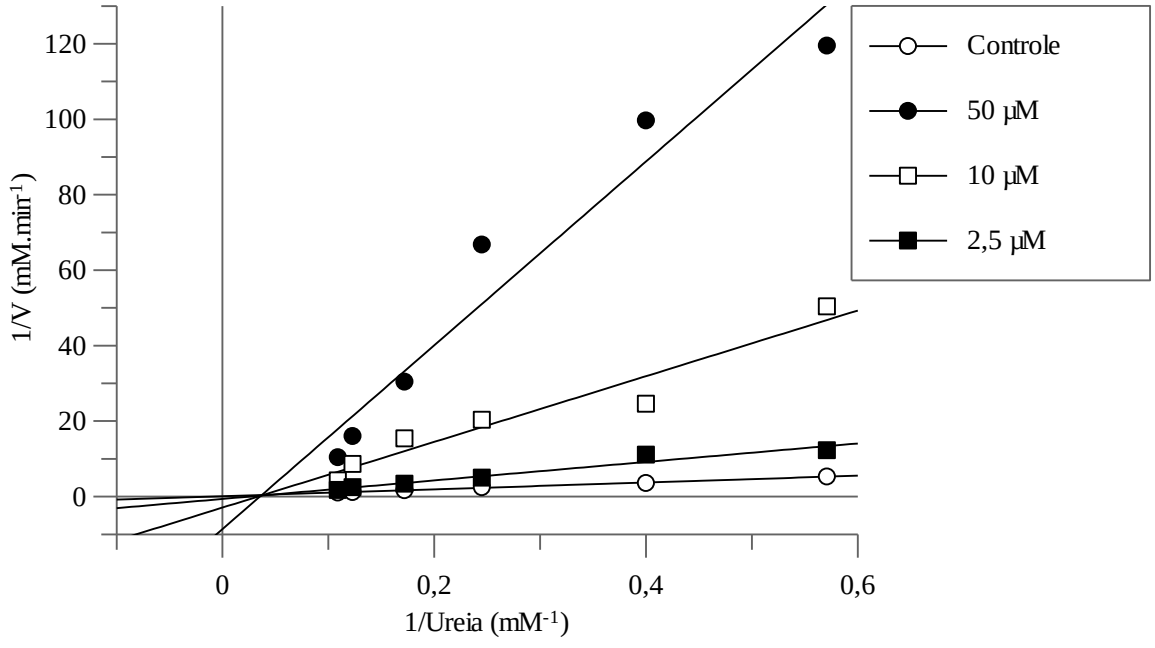


Figura 30. Gráfico representando os dados cinéticos do composto **2m** pelo método de Lineweaver-Burk, indicando um inibidor competitivo.

Já o mecanismo de inibição do composto **1c** (Figura 31) apresentou comportamento gráfico de um inibidor não-competitivo, ou seja, a interação enzima e inibidor não ocorre no

sítio ativo, mas sim em outra região da enzima (COPELAND, 2000). A confirmação desses mecanismos de inibição foi realizada pela avaliação dos resultados obtidos da regressão não-linear e a comparação dos parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$) obtidos (Tabela 5).

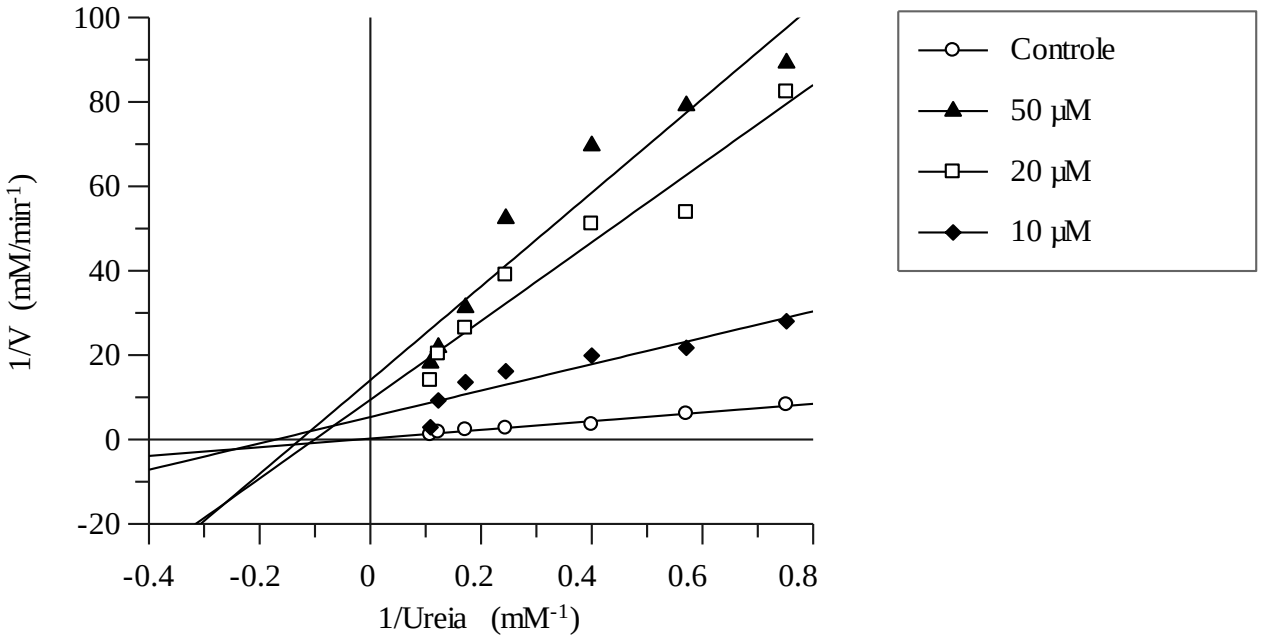


Figura 31. Gráfico representado os dados cinéticos pelo método de método de Lineweaver-Burk do composto **1c**, indicando um inibidor não-competitivo.

Tabela 5. Dados cinéticos enzimáticos dos compostos **1h, 2a**, **2c**, **2m** e **1c**, respectivamente.

Composto	[I] (µmol/L)	K_m (mmol/L)	$V_{máx}$ (mmol/L/min)	Tipo de inibidor	K_i (µmol/L)
1h	50	54,7 ± 1,4	31,4 ± 0,4	Competitivo	2,98
	25	20,3 ± 1,2	31,1 ± 0,1		
	10	12.5 ± 0,6	32,8 ± 1,9		
	2,5	6,1 ± 0,2	32,7 ± 3,3		
	0	8,8 ± 0,9	31,1 ± 0,2		
2a	50	30,1 ± 3,6	30,9 ± 0,2	Competitivo	6,19
	25	22.1 ± 4,6	31,1 ± 0,03		
	10	12,2 ± 7,3	30,8 ± 0,3		
	0	7,4 ± 0,4	31,0 ± 0,1		
2c	25	39,7 ± 1,9	30,2 ± 0,8	Competitivo	1,87
	5	19,9 ± 1,7	30,9 ± 1,0		
	2,5	7,3 ± 0,6	29,9 ± 0,5		
	0	8,3 ± 0,7	29,3 ± 0,3		
2m	50	47,5 ± 2,1	39,9 ± 0,9	Competitivo	3,13
	10	22,4 ± 2,8	30,8 ± 1,5		
	2,5	7,0 ± 0,9	31,7 ± 1,1		
	0	8,2 ± 0,8	30,3 ± 0,7		
1c	50	9,3 ± 0,4	0,1 ± 0,05	Não competitivo	17,3
	25	8,5 ± 4,6	0,1 ± 0,02		
	10	8,6 ± 1,3	0,9 ± 0,3		
	0	8,6 ± 0,4	31,2 ± 0,2		

Ao analisar os dados experimentais dos compostos **1h**, **2a**, **2c** e **2m** e os valores de K_m e $V_{máx}$ obtidos da aplicação da equação de Lineweaver-Burk foi observado a variação da constante de Michaelis Menten (K_m) crescente de acordo com o aumento da concentração de inibidor e a manutenção dos valores de velocidade máxima ($V_{máx}$), sendo então um outro indicativo que essas chalconas apresentam o modo de inibição competitivo frente a enzima UJB. Os valores de K_i foram calculados e para a chalcona **1h** o K_i foi de 2,98 µmol/L e **2a** o K_i foi de 6,19 µmol/L, dessa forma a chalcona **1h** apresentou maior afinidade pela enzima confirmando o que foi visualizado nas interações entre enzima e inibidor pelo estudo de *docking* no qual foi a chalcona que apresentou maior valor de *score*. Para as chalconas **2c** e **2m** os

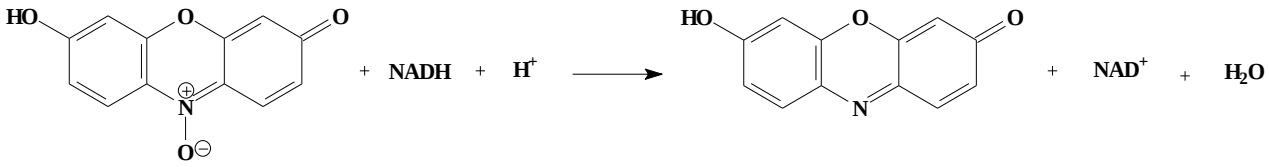
valores de *Ki* foram de 1,87 e 3,13 µmol/L, respectivamente, e de acordo com esses dados experimentais o composto **2c** apresentou maior afinidade com a UJB, porém pelo estudo *in silico* essas duas últimas chalconas apresentaram baixos valores de *score* indicando menores contruições que as estabilizem no sítio ativo da enzima sendo essa divergência em relação a estabilização, possivelmente devido a diferença estrutural entre as UHP e UJB.

Para o composto **1c** houve uma diminuição dos valores de $V_{máx}$, no entanto o K_m não houve grandes variações, sendo outro indicativo de que essa chalcona apresentou um mecanismo de inibição não-competitivo ($\alpha = 1$). A constante de afinidade (K_i) para esta chalcona foi de 17,3 µmol/L. Em relação os mecanismo de inibição os resultados encontrados no estudo *in vitro* são condizentes com os resultados do estudo *in silico*, onde as chalconas **1h**, **2a**, **2c** e **2m** apresentaram interação com o sítio catalítico da enzima tendo experimentalmente comportamento competitivo, enquanto a chalcona **1c** não teve interações com o sítio catalítico da enzima e apresentou um comportamento não-competitivo nos experimentos realizados e baixa afinidade pela enzima.

4.3.4 Avaliação da atividade anti-*H. pylori* das chalconas

As chalconas apresentaram atividade inibitória em urease e em estudos anteriores atividade antibacteriana, sendo relevante a investigação destes compostos frente à *H. pylori*. Os ensaios *in vitro* foram realizados determinando a viabilidade bacteriana através do método descrito no item **3.2.9**. Os resultados foram expressos em concentração inibitória mínima (CIM), que é definido como a concentração do composto em estudo necessário para inibir o crescimento bacteriano, por consequência quanto menor o valor de CIM, maior a potência da substância. A concentração bactericida mínima (CBM) também foi determinada para esses compostos, que corresponde à concentração mínima do composto capaz de causar a morte bacteriana.

Inicialmente as chalconas e derivados (**1a-1h, 2a-2c**, **2e-2l**, **2n-2q**, **3a-3c** e **4a-4c**) foram testadas nas concentrações 250, 125 e 62,5 µg/mL, pois esses compostos turvaram no meio de crescimento da bactéria (BHI), não sendo possível a leitura espectrofotométrica. Para visualizar os resultados foi utilizado o revelador resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-óxido), um indicador bastante utilizado em condições de redução em meios de cultura (FUKUSHIMA et al., 2003). O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (coloração roxa) em resorufina (coloração rosa), como demostrado na Figura 32.



Coloração roxa

Coloração rosa

Figura 32. Reação de redução da resazurina.

Os resultados desse teste anti-*H. pylori* é observado na Figura 33. A coloração rosa indica crescimento bacteriano e a cor roxa significa a sua morte.

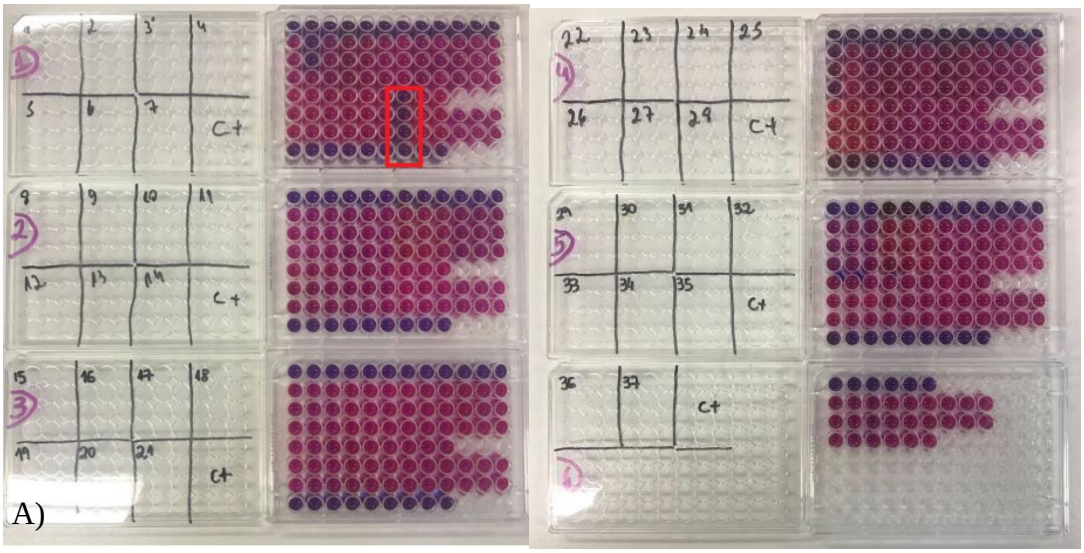


Figura 33. Avaliação da atividade Anti-*H. Pylori*. **A)** placa do teste dos compostos **1a-1h, 2a-2c**, **2e-2l**, **2n-2q**, **3a-3c** e **4a-4c**, utilizando o método colorimétrico com a redução da resazurina, em vermelho o resultado da chalcona **2c**. **B)** Estrutura do composto **2c** que apresentou CIM e CBM de 0,97 mmol/L.

Como é possível observar a única chalcona que apresentou atividade inibitória frente a bactéria, nas três concentrações testadas, foi o composto **2c,** que apresentou CIM e CBM de 250 µg/mL (0,97 mmol/L) sendo a morte confirmada com repique em placa de ágar Columbia com sangue de carneiro 5%. As fileiras superiores e inferiores que estão em azul são os controles negativos, somente meio de cultura e amostra sem bactéria. A chalcona **2c** também

apresentou potencial inibitório frente a enzima UJB com o valor de IC_{50} de 5,7 µmol/L, podendo ser um indicativo do mecanismo para a atividade anti-*H-pylori*.

A maioria das chalconas avaliadas não apresentaram CBM satisfatório, com valores acima de 1024 µg/mL. Em relação a CIM, alguns autores estipulam faixas para considerar um composto com propriedades antimicrobianas. As moléculas que apresentam CIM até 100 µg/mL são considerados fortes inibidores, entre 100 – 500 µg/mL atividade moderada, entre 500 - 1000 µg/mL tem um baixo potencial inibitório e maiores que 1000 µg/mL inativos (ALIGIANNIS et al., 2001). Levando isso em consideração, as chalconas **2d, 3e, 3g, 3h** e **3i** podem ser consideradas moderadas quanto a atividade antibacteriana pois apresentam CIM de 256 µg/mL frente a *H. pylori*, enquanto as chalconas **3d** e **3f**, com CIM de 1024 µg/mL são consideradas inativas. Em destaque a chalcona **2m**, que apresentou CIM de 128 µg/mL (0,35 mmol/L), logo foi o composto com maior potencial anti-*H. pylori*, principalmente quando comparado a um fármaco padrão, como o metranidazol que apresenta CIM >254 µg/mL (1,5 mmol/L), nessas mesmas condições experimentais (KITAGAWA et al., 2012). Esta atividade pode estar relacionada a inibição da enzima urease, pois no ensaio enzimático esse composto apresentou potencial inibitório (IC_{50} de 9,5 ± 0,9 µmol/L).

4.4 Potência inibitória, mecanismo e docking dos compostos oriundos do fungo *F. proliferatum*

4.4.1 Determinação do valor de IC_{50} para o extrato (EFp) e compostos isolados do fungo F. proliferatum

Inicialmente foi determinado o valor de IC_{50} do EFp, variando as concentrações de 25 a 0,5 µg/mL. O valor de IC_{50} obtido para o extrato do fungo *F. proliferatum* foi de 2,68 µg/mL. Existem diversos relatos de metabólicos secundários obtidos de extratos de fungos que apresentaram diversas atividades biológicas. No trabalho desenvolvido por Dame e colaboradores (2015), os compostos isolados do extrato de *F. proliferatum* apresentaram atividade antifúngica e antibacteriana. No trabalho desenvolvido por Rasekhi e colaboradores (2014), foram identificados diversos metabólicos bioativos, como micotoxinas, ácidos graxos e hidrocarbonetos, com atividades antifúngica, antibacteriana e antiviral.

Devido a capacidade dessa classe de fungo produzir compostos bioativos, e o baixo valor de IC_{50} do EFp, todos os compostos isolados foram triados frente a UJB bem como tiveram o potencial inibitório determinado. A determinação dos valores de IC_{50} foi realizada para o

composto **5a** nas seguintes concentrações 40; 20; 10; 5; 2,5; 1, 0,5 e 0,1 µmol/L e as demais amostras **5b, 5c, 5d** e **5e** foram utilizadas as concentrações 350; 250; 100; 50; 25; 10; 5 e 2,5 µmol/L. Os valores de IC_{50} podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de IC_{50} expressos em µmol/L dos compostos **5a – 5e.**

Códigos	Compostos	Valores de IC_{50} (µmol/L)
5a	Dicetopiperazina ciclo prolina-leucina	1,66 ± 0,15
5b	Uracila	3,34 ± 0,87
5c	Ácido fusárico	13,51 ± 0,19
5d	N-etil-3-fenil-acetamida	24,39 ± 1,72
5e	Beauvericina	22,11 ± 1,19
	Tioureia	29,7 ± 1,2

Os compostos avaliados foram mais potentes que a tioureia (controle positivo, IC_{50} de 29,7 ± 1,2 µmol/L). O composto que apresentou menor valor de IC_{50} = 1,66 ± 0,15 µmol/L, ou seja, maior potência frente a inibição da enzima UJB, foi o dicetopiperazina ciclo prolina-leucina (**5a**), também conhecido como gancidina W. Estudos relatam que essa substância é inibidora de *Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Micrococcus luteus, Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, com valores de CIM e 0,25-12,5 µg/mL (DE CARVALHO; ABRAHAM, 2012).

O segundo composto com maior potencial inibitório foi a uracila (**5b**) com IC_{50} 3,34 ± 0,87 µmol/L. Esse composto e seus derivados apresentam várias aplicações farmacológicas, como a uracila 5-substituída, utilizada em tratamento de diversos tumores, além de apresentar atividade antibacteriana (PALAFOX et al., 2010). O ácido fusárico (**5c**) (ácido 5-butilpiridina-2-carboxílico) é um alcaloide piridínico, e apresentou um valor de IC_{50} de 13,51 ± 0,19 µmol/L frente a UJB. Também há estudos que demostraram que o ácido fusárico é um potente antimicrobiano, além de possuir propriedades inseticida e fitotóxica. Este composto apresentou perfil antifúngico frente à *Candida albican* e atividade antibacterianas frente a *Escherichia coli e Staphylococcus aureus*, com valores de CIM 25-400 µg/mL (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; STEPIÉN, et al., 2013).

A beauvericina (**5e**) é um ciclo-hexadepsipeptídeo, a principal micotoxina produzida pelo fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo), a qual possui propriedades antifúngica e antimicrobiana, quando testados nos fungos *Hypothenemus hampei* e *Telchin licucs licus* foram

encontrados valores de CC_{50} de 2,81 e 6,95 mmol/L, respectivamente (VÁSQUEZ-BONILLA et al., 2017).

Os compostos **5a** e **5b** como apresentaram menor concentração necessária para inibir a UJB, foram selecionados para o ensaio *in silico* e *in vitro* para determinação do mecanismo de inibição.

4.4.2 Mecanismo de inibição dos compostos oriundos do fungo F. proliferatum

O mecanismo de inibição dos compostos **5a** e **5b** foram determinados, a partir de dados experimentais, e foi possível prever como o inibidor se liga a enzima. Os experimentos cinéticos foram realizados variando as concentrações do substrato de 0,75; 1,33; 1,75; 2,55; 4,08; 5,83; 8,16 a 9,16 mmol/L, e as concentrações do inibidor usadas foram selecionadas com base no valor de IC_{50} sendo equivalentes a 0%, 25%, 50% e 75% de inibição (COPELAND, 2000). Os dados experimentais obtidos foram tratados e plotados, afim de se analisar graficamente o comportamento inibitório dos compostos. Na Figura 34 é representado o gráfico de Lineweaver-Burk para o composto **5a**. E na Figura 35 o resultado para o composto **5b**.

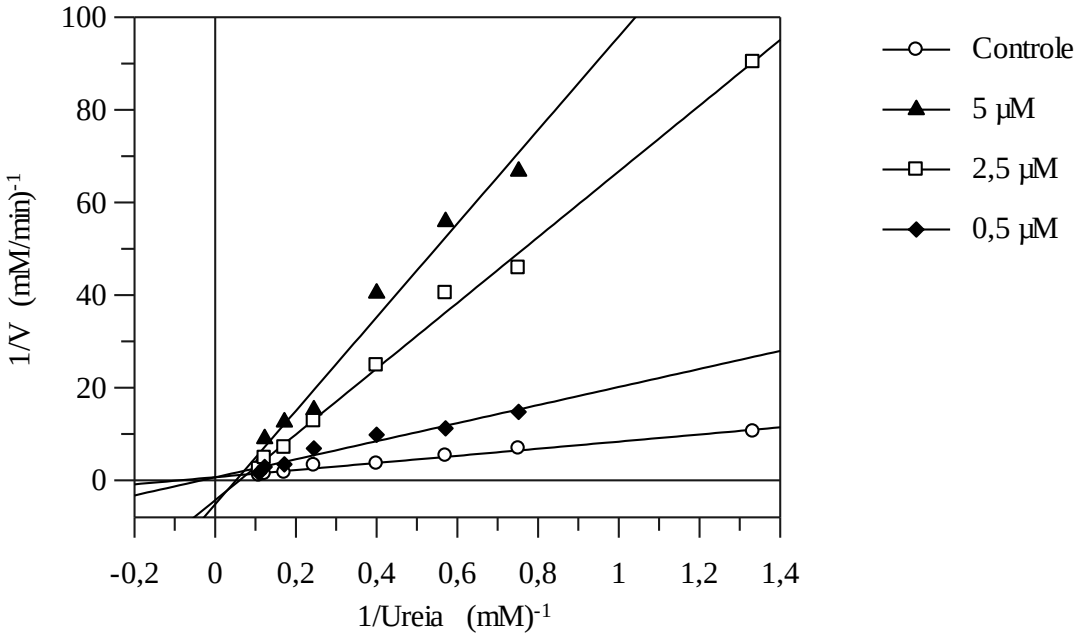


Figura 34. Gráfico representando os dados cinéticos pelo método de Lineweaver-Burk do composto **5a**, indicando um inibidor competitivo.

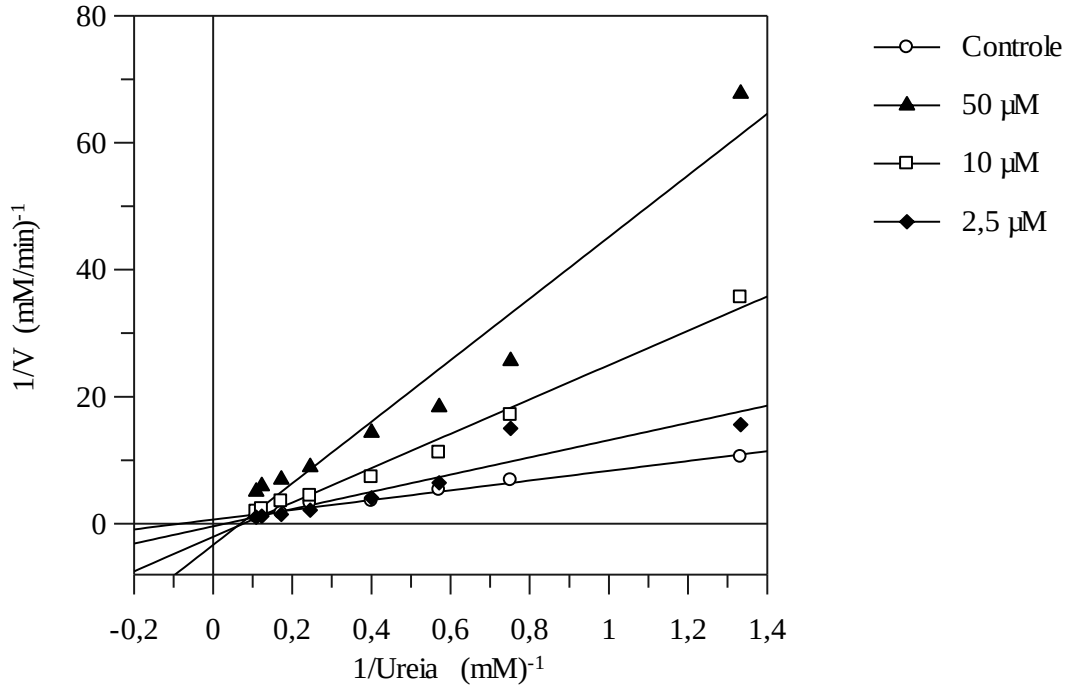


Figura 35. Gráfico representando os dados cinéticos pelo método de método de Lineweaver-Burk do composto **5b**, indicando um inibidor competitivo.

Observando os gráficos de Lineweaver-Burk para os dois compostos em ambos as retas interceptam na origem, indicando que são inibidores do tipo competitivo, ou seja, competem com o substrato pelo sítio ativo da UJB (CORTÉS et al., 2001). Através da regressão não-linear também pode-se verificar o mecanismo de inibição de ambos os compostos, por meio dos valores de K_m e $V_{máx}$ para cada curva, sendo um outro método capaz de demostrar o tipo de inibição que essas substâncias apresentam. Esses dados estão expressos na Tabela 7.

Tabela 7. Dados cinéticos enzimáticos dos compostos **5a** e **5b.**

Composto	[I] (µmol/L)	K_m (mmol/L)	$V_{máx}$ (mmol/L /min)	Tipo de inibidor	*Ki* (µmol/L)
5a	2	32,9 ± 3,6	61,8 ± 2,2	Competitivo	0,55
	1	14,8 ± 4,6	63, 8± 5,5		
	0,5	3,57 ± 0,53	62,7 ± 2,3		
	0	7,5 ± 0,4	62,9 ± 5,8		
5b	50	32,8 ± 0,8	61,7 ± 0,4	Competitivo	1,1
	10	10,7 ± 3,5	60, 8± 5,8		
	2,5	5,94 ± 0,13	60,9 ± 2,1		
	0	7,05 ± 0,7	61,1 ± 0,3		

Na inibição competitiva, quando o substrato e o inibidor estão presentes em uma solução, a proporção da enzima que pode formar complexos enzima-substrato depende das concentrações do substrato e do inibidor, e também de suas afinidades relativas à enzima (LEHNINGER, et al., 2014). A medida que se aumenta a concentração do substrato ocorre a redução da formação do complexo enzima-substrato. Com isso, o valor de K_m vai aumentando, uma vez que é necessária uma maior concentração de substrato para superar os efeitos inibitórios do competidor, porém a $V_{máx}$ da reação catalisada permanece inalterada. Esses parâmetros podem ser observados para ambos os compostos, o valor de $V_{máx}$ permanece com poucas alterações (Tabela 7) e ocorre o aumento do K_m na medida que se acrescenta concentrações maiores de inibidor, sendo outro indicativo de inibidores competitivos.

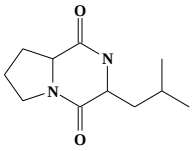
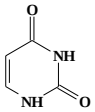
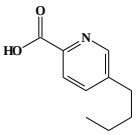
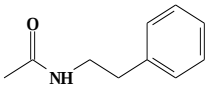
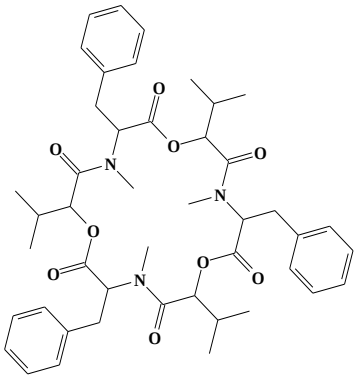
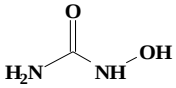
Levando em consideração que são inibidores competitivos, foi determinado a constante de dissociação do complexo enzima-inibidor (K_i), que está relacionada a afinidade do inibidor pela enzima, ou seja, quanto menor for o seu valor maior será a interação entre o inibidor e a enzima. Assim, o composto **5a,** que apresentou um valor de K_i de 0,55 µmol/L, é o inibidor competitivo mais potente dessa serie de compostos de PNs testados frente a UJB.

4.4.3 *Docking* molecular dos compostos isolados do fungo *F. proliferatum*

O *screening* virtual por *docking* em UHP foi realizado para todos os compostos naturais isolados do fungo *F. proliferatum*, sendo utilizado como padrão o inibidor do ácido acetohidroxâmico, devido a semelhança estrutural entre os compostos analisados. Na Tabela 8

são apresentados os valores de *score* de cada composto, juntamente com os valores de energia de ligação.

Tabela 8. Resultados do ensaio *in silico* para os compostos de **5a** a **5e**.

Cod.	**Estrutura**	***Score* (*GoldScore*)**	**Energia de ligação**
5a		14,75	-14,88
5b		28,28	-28,78
5c		31,97	-38,14
5d		21,25	-26,56
5e		17,09	-19,48
*ácido acetohidroxâmico		41.11	-42.97

*Inibidor de UHP, controle positivo utilizado.

Os compostos **5b, 5c** e **5d** foram os que apresentaram melhor pontuação e a menor energia de ligação, comparáveis aos valores obtidos para o inibidor padrão de UHP (ácido

acetohidroxâmico). A seguir se apresentam as poses dos *docking* de cada composto, bem como a análise das possíveis interações entre a enzima e os inibidores.

O composto **5b** apresentou um valor de *score* de 28,28 sendo observado na Figura 36 um número considerável de interações. Estas interações ocorreram no sítio ativo da UHP, como ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Ala365, Arg338, Ala169 e Cys321, e também é possível observar interações iônicas entre a carbonila e os átomos de níquel. Um indicativo do mecanismo de inibição desse composto ser competitivo, sendo coerente com os resultados experimentais obtidos, cujo valor de K_i = 1,1 µmol/L também evidenciou forte interação com o sítio ativo da enzima. Os compostos **5c** e **5d** também interagem diretamente no sítio ativo da UHP, como é observado nas Figuras 37 e 38.

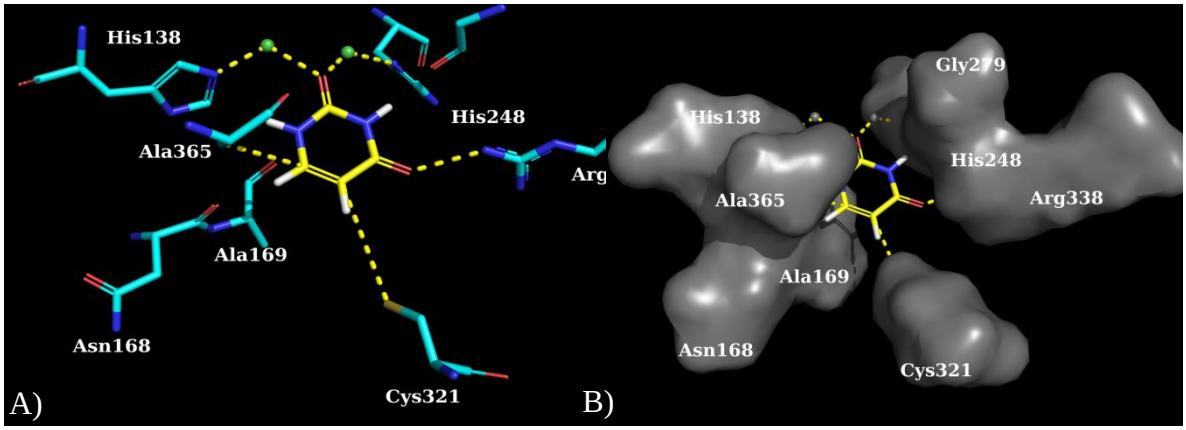


Figura 36. Resultado de *docking* para o composto **5b. A)** Pose do *docking* para o composto **5b**, demostrando seu modo de interação na região do sítio ativo. **B)** Representação da superfície de van der Waals dos aminoácidos envolvidos na estabilização da molécula, evidenciando a complementaridade de **5b**.

Os compostos **5c** e **5d** também interagem diretamente no sítio ativo da UHP, como é observado nas Figuras 37 e 38.

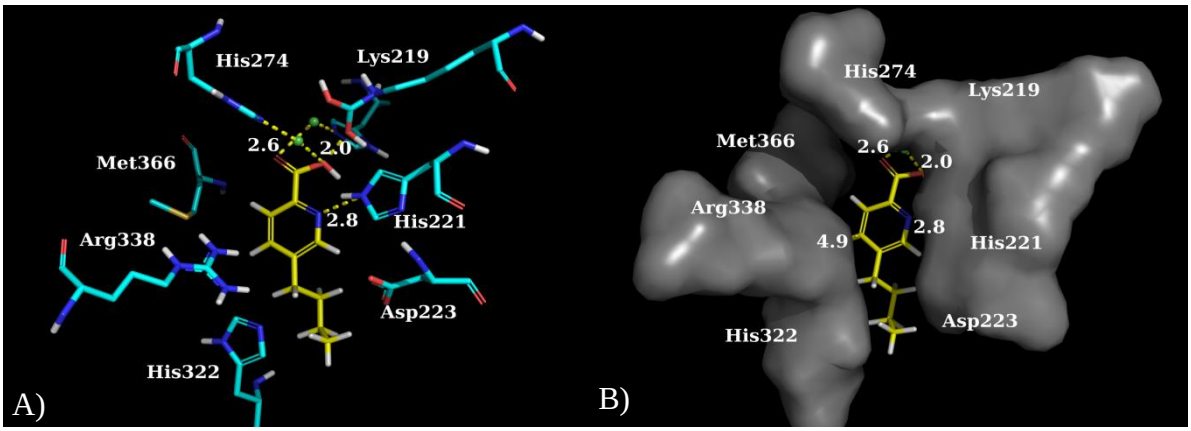


Figura 37. Resultado de *docking* para **5c**. **A)** As principais interações com os aminoácidos Lys219, His221, Asp223, His322, Arg338 e Met366. **B)** Representação da superfície de van der Waals dos aminoácidos envolvidos na estabilização da molécula, evidenciando a complementaridade de **5c** com o sítio ativo.

A estrutura **5c** foi a que apresentou maior valor de *score* (31,97), sendo assim foi o composto que apresentou melhores contribuições energéticas para sua estabilização no sítio catalítico da enzima. O composto **5d** também se estabiliza no sítio avido da enzima UHP, como demostrado na Figura 38, interagindo por meio de interações iônicas com o metal, além de se estabilizar ao longo do canal do sítio ativo por contribuições hidrofóbicas com alguns aminoácidos demostrados na Figura 38B devido a essas interações mais fracas o seu valor de *score* foi de 21,25. Ambos interagem diretamente com o sítio ativo da enzima, com contribuição hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e as interações da carbonila presente na estrutura dos dois compostos com os átomos de níquel da UHP.

Assim, o estudo *in silico* revelou inibidores com modo de ligação competitivo.Os valores de K_i (**Eq. 4**, p. 52) encontrados pelo estudo *in vitro*, 4,45 µmol/L para **5c** e 8,02 µmol/L para o **5d**, são condizentes com os estudos teóricos, sendo o composto **5c** o que apresentou maior afinidade pela urease. O estudo cinético para determinar o mecanismo de inibição experimental desse composto não foi realizado devido à falta de massa para o preparo das soluções.

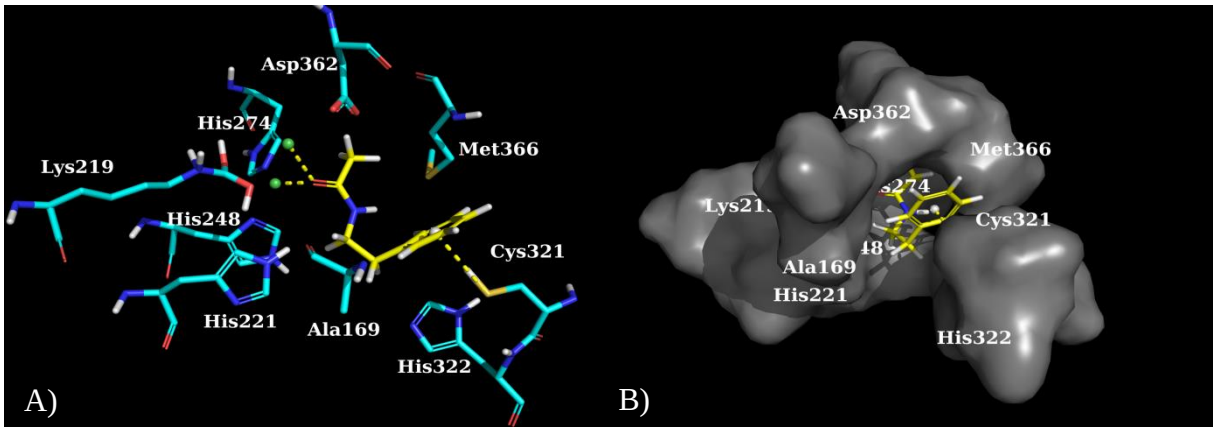


Figura 38. Resultado de *docking* para o composto **5d**. **A)** Interações com os aminoácidos Asp32, Met366, Cys321, His322. **B)** Representação da superfície de van der Waals dos aminoácidos envolvidos na estabilização da molécula, demonstrando a complementaridade de **5d** com o sítio ativo.

O resultado do *docking* da estrutura **5e**, é demostrado na Figura 39. Esse composto é volumoso e isso refletiu na sua estabilização no sítio ativo da UHP, pois a cavidade catalítica é muito pequena (Figura 39A) como consequência apresentou um baixo valor de *score* (17,09). A estabilização ocorre em uma região mais externa ao sítio ativo, ficando mais à superfície da UHP. Esta região, embora não seja predominantemente composta por aminoácidos de caráter hidrofóbico, permite sua estabilização por meio de contribuições hidrofóbicas.

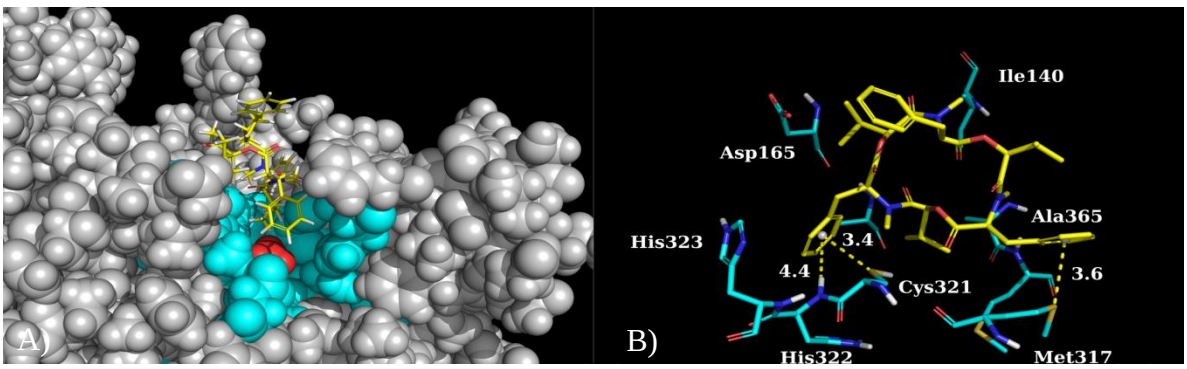


Figura 39. Resultado de *docking* para o composto **5e**. **A)** Localização do sítio ativo (destacado em azul), da região de interação no sítio (destacado em vermelho) e do modo de ligação da estrutura **5e**, mais à superfície (destacada em amarelo). **B)** Principais interações hidrofóbicas da estrutura na região mais externa ao sítio ativo.

Como visto anteriormente pelo estudo experimental o composto **5a** apresentou o melhor potencial inibitório frente a UJB, dos compostos isolados do fungo *F. proliferatum* com um

valor de K_i = 0,55 µmol/L e os resultados do ensaio de mecanismo de inibição indicaram que este composto apresenta o comportamento de um inibidor competitivo. Porém, o resultado do docking molecular para a estrutura **5a,** demostrou que esse composto apresentou o menor valor de *score* (14,75), havendo poucas contribuições que estabilizem o mesmo no sítio ativo da UHP. Neste sentido a sua estabilização não ocorreu no sítio ativo como esperado, mas em uma região mais externa à superfície da proteína de forma semelhante a estrutura **5e** (Figura 40) sendo inconsistentes com os dados experimentais.

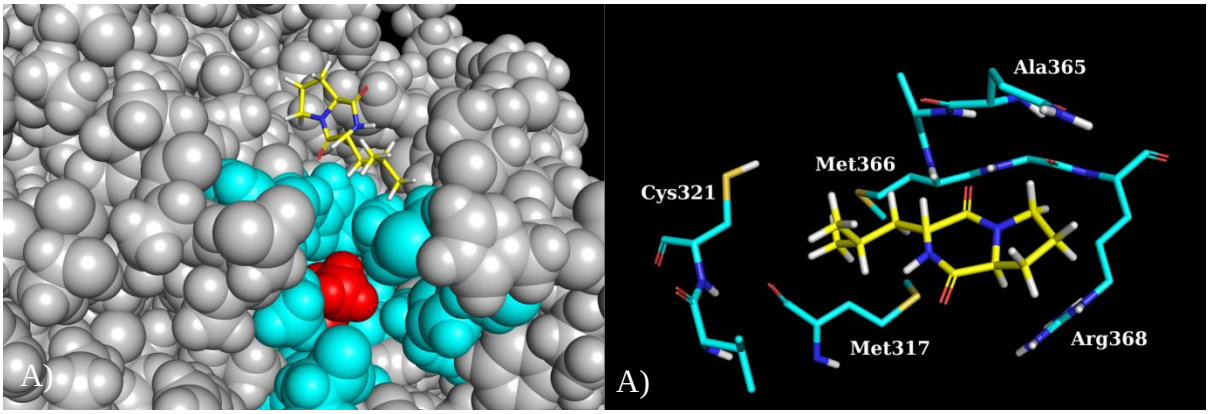


Figura 40. Resultado de *docking* para o composto **5a**, a sua estabilização ocorre na região mais externa à superfície da UHP. **A)** Localização do sítio ativo (destacado em azul), da região de interação no sítio (destacado em vermelho) e do modo de ligação da estrutura **5a**, mais à superfície (destacada em amarelo). **B)** principais interações com os resíduos de aminoácidos Cys321, Met366, Met317, Ala365 e Arg368.

Neste sentindo os resultados sugerem diferenças entre o sítio ativo destas duas enzimas (*Canavalia gladiata* e *Helicobacter pylori*), que poderiam ser uma resposta a conformação da estrutura terciária causada pelas diferenças entre as enzimas. Estas diferenças ainda não foram investigadas porque a estrutura terciária de *C. gladiata* não está disponível no banco de dados de proteína (PDB - Protein Data Bank), apenas a estrutura cristalográfica de urease de *C. ensiformis* foi encontrada.

4.5 Identificação do composto 6a de *Pholiota nameko* por técnicas espectroscópicas e determinação da potência inibitória enzimática

4.5.1 Identificação do composto 6a por RMN de ^{1}H, ^{13}C e RMN 2D

Um precipitado foi obtido durante o processo de extração hidroalcoólica a quente do cogumelo *Pholiota nameko*, espécie pertence à Ordem Agaricales e popularmente conhecido como *Nameko*. Este cogumelo é amplamente cultivado na China e no Japão e apresenta elevado valor proteico, além da presença de vitaminas, aminoácidos, lipídios e polissacarídeos, sendo alguns destes compostos relacionados a diferentes atividades biológicas, tais como atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e hipolipidêmica (ZHANG, Y. et al., 2014; YANG et al., 2019).

Inicialmente foi investigado o potencial inibitório desse precipitado frente a UJB, (2,5 µg/mL) obtendo 89,1% de atividade inibitória enzimática. Apresentando potencial inibitório e com o intuito de verificar o composto responsável por inibir a UJB, foi realizado a identificação estrutural desse precipitado através da técnica espectroscópica de RMN de ^{1}H e de ^{13}C, e as técnicas de RMN bidimensional (COSY, HSQC e HMBC).

O espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-6d, 400 Hz) (Figura 41) apresentou um conjunto de sinais na região de 3,63-3,34 ppm e um sinal largo em 4,33 ppm. A ampliação do espectro observado na Figura 42 permitiu a análise das multiplicidades e o cálculo das constantes de acoplamento (*J* expressa em Hz).

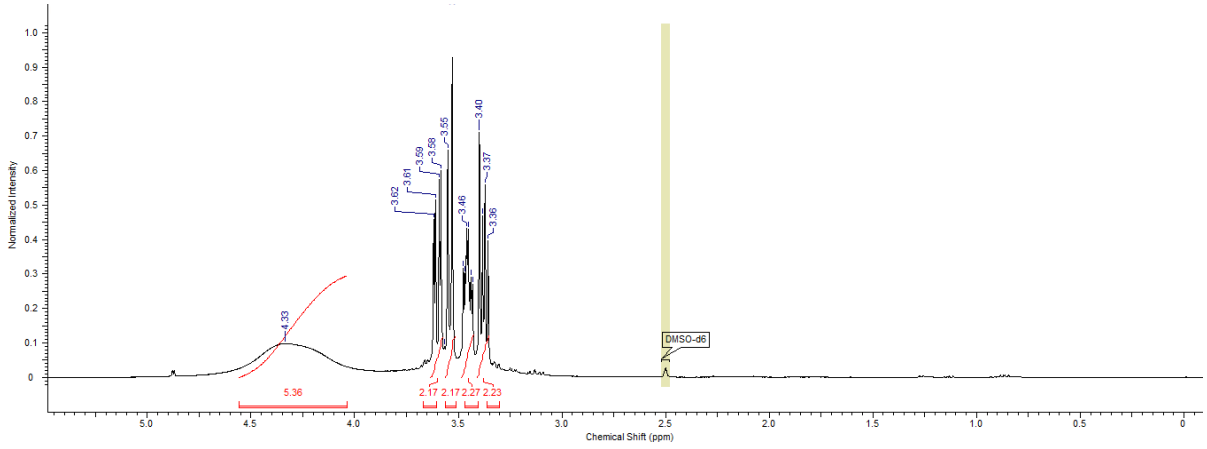


Figura 41. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d6, 400 MHz) do composto **6a.**

A molécula é simétrica, sendo assim alguns prótons são equivalentes, por isso no espectro RMN de ^{1}H apresenta quatro sinais, o H-1 é equivalente ao H-6, temos o H-1' equivalente ao H-6', esses dois prótons do carbono metilênico (CH_2) apresentam um ambiente químico diferente gerando esses dois sinais (hidrogênios diastereotópicos). Os sinais observados foram um duplo dupleto integrando para dois hidrogênios em δ_H 3,61 (*dd*, $^{3}J_{HH}$ = 4 Hz e $^{2}J_{HH}$ = 12 Hz) referente aos hidrogênios H-1 e H-6 que acomplam com H-1' e H-6' em geminal e com os hidrogênios vicinais H-2 e H-5, respectivamente. O duplo dupleto mais

blindado em δ_H 3,37 (*dd*, $^3J_{HH}$ = 4 Hz e $^2J_{HH}$ = 12 Hz) integrando para dois hidrogênios, confirma estes acoplaementos. O acoplamento geminal é observado devido a presença dos centros quirais, sendo os hidrogênios da posição 1 e 6 diastereotópicos. Um dupleto em δ_H 3,53 (d, *J* = 8 Hz) referente aos hidrogênios H-3/H-4 e um multipleto em δ_H 3,46 (*m*, $^3J_{HH}$ = 4 Hz e $^2J_{HH}$ = 8 Hz) resultado do acoplamento dos hidrogênios H-2/H-5 com os hidrogênios metilênicos (H-1, H-1', H-6 e H-6') e com os H-3 e H-4, respectivamente.

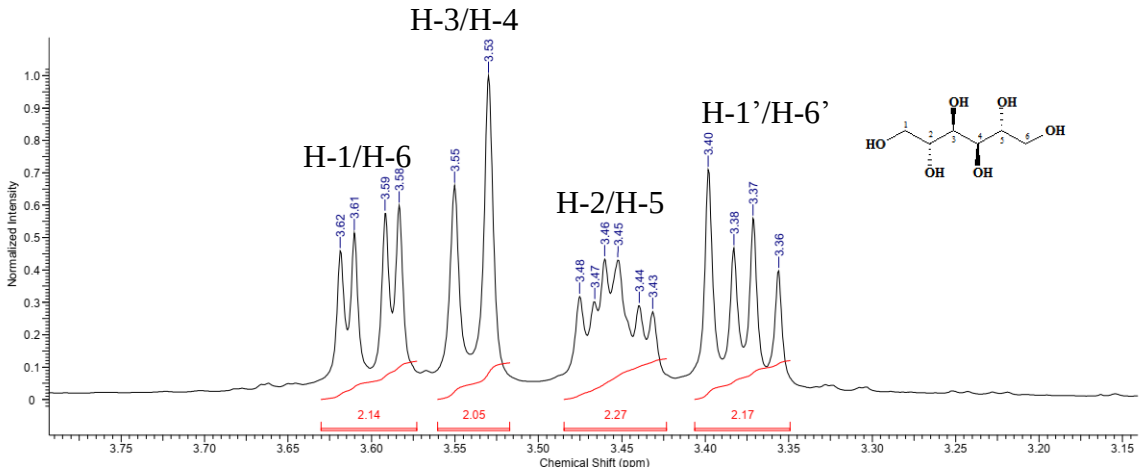


Figura 42. Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d6, 400 MHz) do composto **6a.**

No espectro de RMN de ^{13}C, apresentado na Figura 43, há a presença de três sinais na região de carbonos ligados a oxigênio, em δ_C 71,39, 69,78 e 63,9. Os valores de deslocamento químico dos carbonos foram importantes para a identificação do aditol, pois normalmente os valores de deslocamento de hidrogênio são coincidentes.

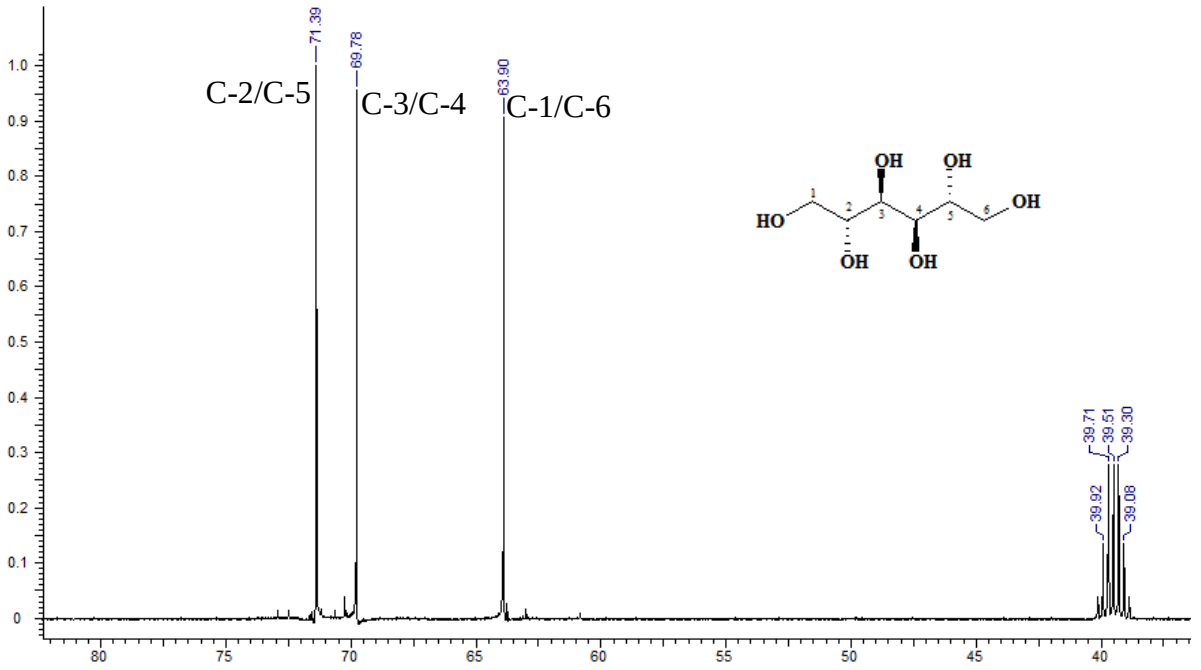


Figura 43. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-d6, 200 MHz) do composto **6a.**

Através do experimento de DEPT 135 (Figura 44) observa-se dois sinais positivos referentes a dois átomos de carbono metínicos e um sinal negativo, referente a um carbono metilênico. O número de sinais nestes espectros, aliado aos sinais do espectro de RMN de ^{1}H levou à suposição de que tratava-se de um alditol simétrico de seis carbonos.

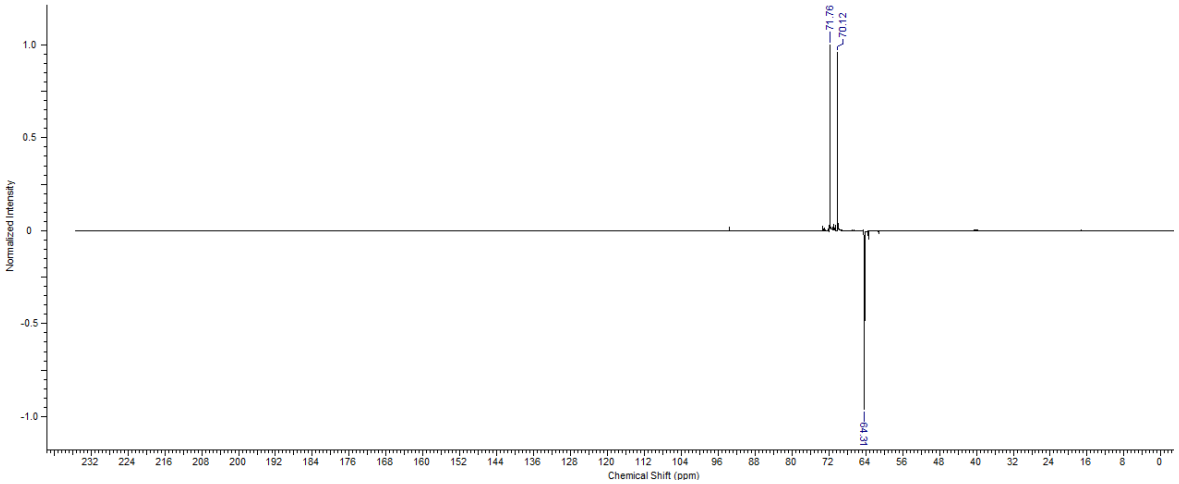


Figura 44. Experimento de DEPT 135 (DMSO-d6, 200 MHz) do composto **6a.**

Através das interpretações do mapa de contorno COSY foi possível confirmar as correlações ^{1}H-^{1}H verificadas no espectro de RMN de ^{1}H (Figura 45). Observa-se que o H-1/H-6 estão acomplando com H-1'/ H-6' ($^{1}J_{HH}$) em geminal e com o H-2/H-5 em vicinal ($^{3}J_{HH}$). Os prótons H-2 acopla com o H-1/H-1' e o H-5 com H-6/H-6' em vicinal e os hidrogênios H-3/H-4 acoplam com o H-2/H5 em vicinal.

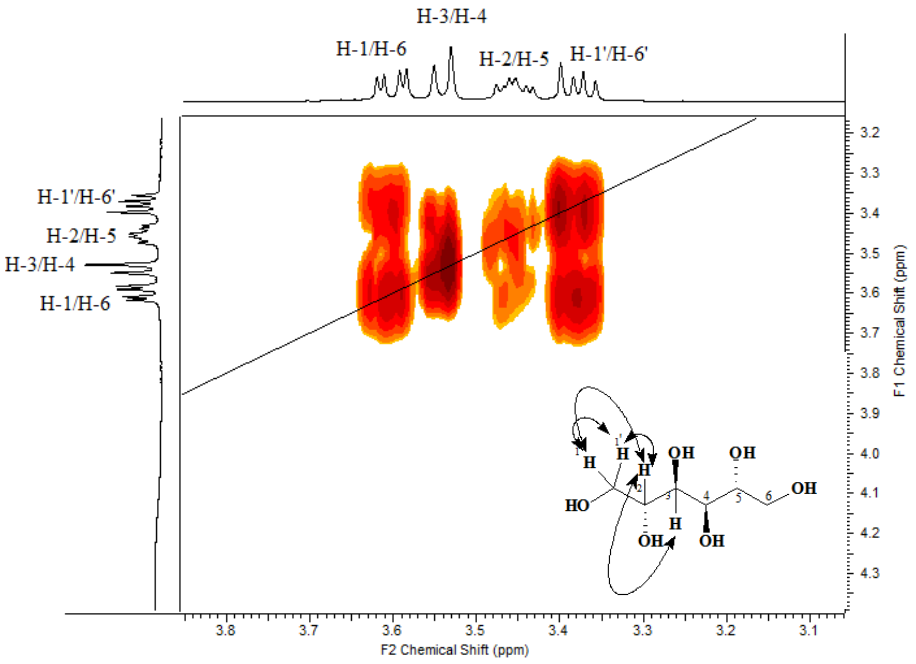


Figura 45. Mapa de contorno COSY (DMSO-d6, 400 MHz) do composto **6a.**

Com base nas correlações diretas ($^1J_{CH}$) observadas no mapa de contornos HSQC (Figura 46) foi possível atribuir os sinais em δ_C 71,39, 69,78 e 63,9 aos átomos de carbono C-2 e C-5, C-3 e C-4, C-1 e C-6, respectivamente.

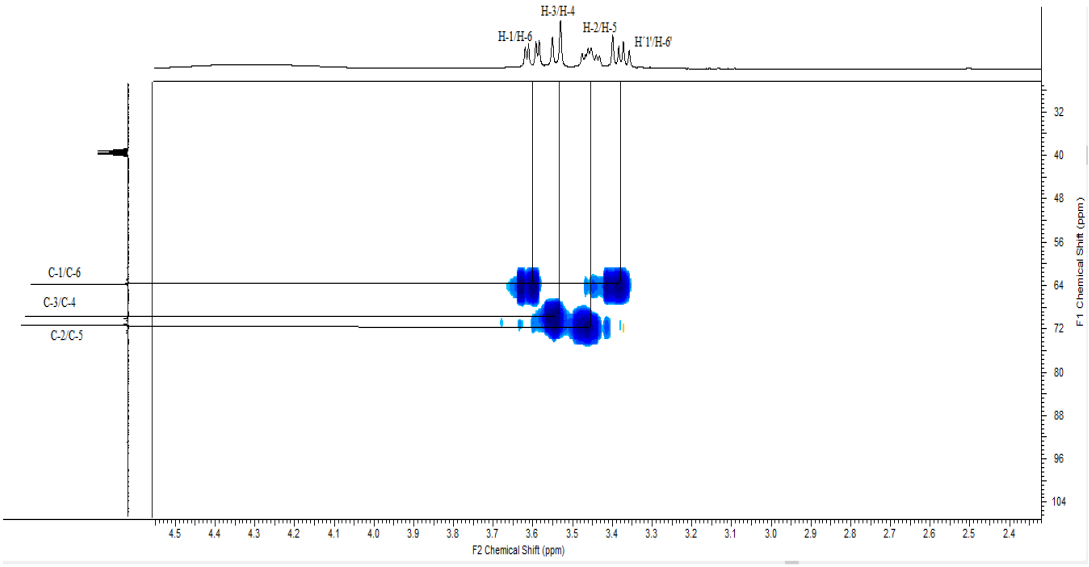


Figura 46. Mapa de contorno HSQC (DMSO-d6, 400 MHz) do composto **6a.**

No experimento de HMBC foi possível verificar as correlações heteronucleares a $^2J_{HC}$ e a $^3J_{HC}$ (Figura 47). É possível verificar que o duplo dupleto referente aos hidrogênios H-1/H-6 apresentaram correlação com os sinais de δ_C 71,39 e δ_C 69,78, referente aos carbonos C-2/C-5 e C-3/C-4, respectivamente. Os hidrogênios H-3/H-4 correlacionam com os sinais de δ_C 71,39 e 63,9, referentes aos carbonos C-2/C-5 e C-1/C-6, respectivamente. Um multipleto referente aos hidrogênios H-2/H-5 que correlacionam com os carbonos na posição C-1/C-6 e C-3/C-4 e o duplo dupleto dos hidrogênios H-1'/H-6' que se correlacionaram com carbonos C-3/C-4 e C-2/C-5, respectivamente.

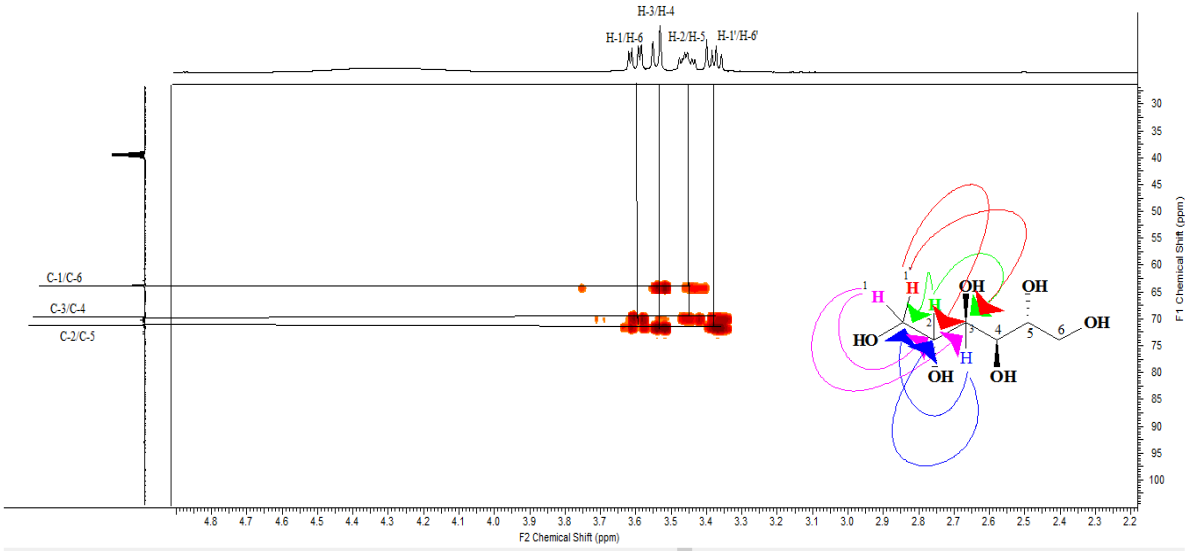


Figura 47. Mapa de contornos HMBC (DMSO-d6 400 MHz) do composto **6a.**

Com base nos dados obtidos, juntamente com os dados da literatura (KUMAR et al., 2019; PAULA et al., 1998; SCHÜRMANN et al., 2010), foi possível identificar o composto **6a** como sendo o D-manitol. Os dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C estão descritos na tabela 9. O D-manitol foi identificado pela primeira em 1811 por Henri Braconnot, sendo este, geralmente, o mais abundante de todos os carboidratos. Trata-se de um poliálcool acíclico de seis carbonos, comumente produzido por fungos dos philos Basidiomicota e Ascomiceta (RAMSTEDT et al., 1987).

Tabela 9. Dados espectroscópicos de RMN (400 MHz, DMSO-d6) do composto **6a** comparado com dados da literatura (δ em ppm).

Posição	$\delta^{1}H$ *(m, J (Hz))*	RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-d6) Paula et al., 1998	$\delta^{13}C$	RMN de ^{13}C (200 MHz, DMSO-d6) Paula et al., 1998
1/6	3,61(dd, *J* = 4 e 12)	3,61 (ddd, J_1=3,4; J_2=5,7 e J_3=10,7 Hz)	63,9	63,7
1'/6'	3,44 (dd, *J* = 4 e 12)	3,37 (m)	-	-
2/5	3,53 (d, *J* = 8)	3,54 (ddd)	71,39	71,2
3/4	3,46 ppm (m, J = 4 e 8)	3,45 (m)	69,78	69,6

Após a identificação do composto **6a** foi realizada a técnica de recristalização para a purificação e repetição dos ensaios enzimáticos (Figura 48). Após a recristalização foi realizado novamente o experimento de RMN de ^{1}H. Na Figura 49 é observado o espectro de RMN ^{1}H, e nota-se que houve a remoção das impurezas.

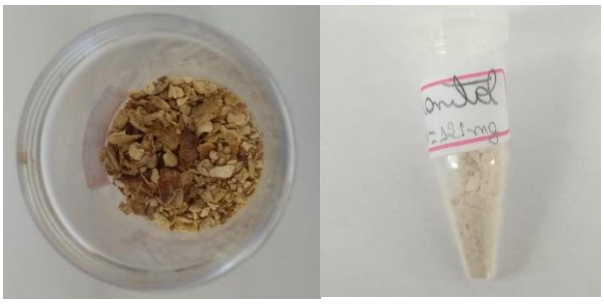


Figura 48. Precipitado (**6a**) obtido do extrato do fungo *Pholiota nameko*. **A)** Composto **6a** antes do processo de purificação por recristalização. **B)** Composto **6a** após a recristalização.

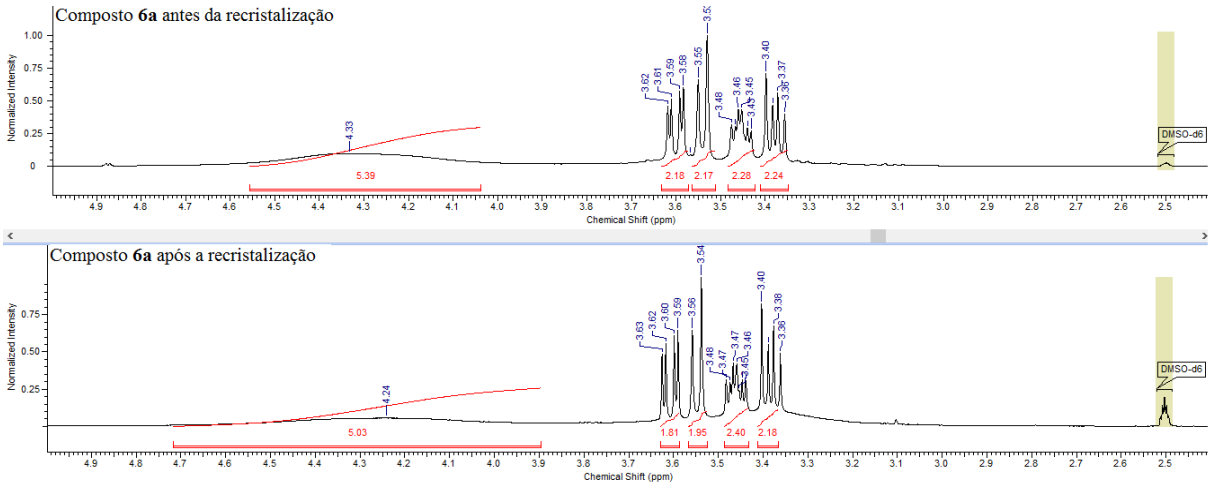


Figura 49. Espectros de RMN ^{1}H do composto **6a** antes e após o procedimento de recristalização.

Na figura 50 observa-se a região do espectro de RMN ^{1}H referente aos hidrogênios aromáticos (δ = 7-8 ppm) evidenciando a presença de compostos fenólicos no precipitado obtido do fungo antes da purificação, podendo ser uma justificativa para a maior atividade inibitória frente a UJB antes da recristalização. Na literatura há relatos de classes de compostos fenólicos inibidores de urease, tais como os flavonoides, chalconas e cumarinas (ANSARI et al., 2005; IBRAR et al., 2013; XIAO et al., 2007; XIAO et al., 2013).

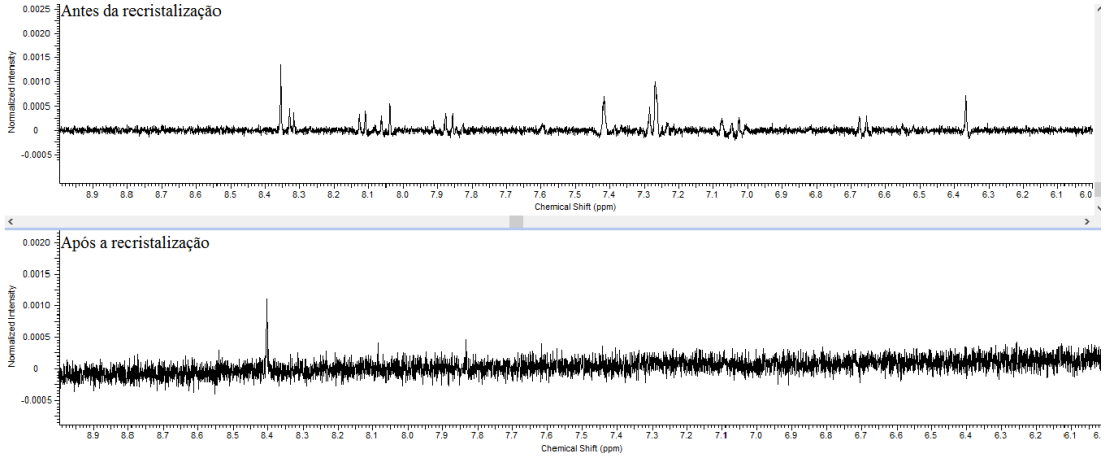


Figura 50. Ampliação dos espectros de RMN ^{1}H do composto **6a** antes e após a purificação por recristalização. **A)** RMN ^{1}H do precipitado obtido do fungo; **B)** RMN ^{1}H obtido após a recristalização do D-manitol contido no precipitado.

4.5.2 Potência inibitória do composto 6a de *Pholiota nameko*

Inicialmente foi investigado o potencial inibitório desse precipitado frente a UJB, onde foi obtido um valor de inibição de 89,1% quando avaliado à 2,5 μg/mL. Após a recristalização do precipitado (**6a**) os ensaios enzimáticos foram repetidos e o composto **6a** teve então uma inibição de 55,0% (concentração = 2,5 μg/mL). Apesar da diminuição da atividade inibitória esta inibição ainda é considerada significativa, tendo em vista a avaliação deste composto em baixas concentrações. Desta forma, o composto **6a** foi ensaiado para a determinação do seu valor de IC_{50} e foi obtido uma potência inibitória de 35,5 ± 1,8 μmol/L.

A fração contendo as impurezas também foi avaliada em UJB na concentração de 2,5 μg/mL obtendo-se o valor de inibição de 49,7%. Assim, as impurezas presentes no precipitado também constribuiram para a inibição enzimática da UJB. Conforme revelado por experimentos de RMN de ^{1}H, a presença dos compostos fenólicos pode estar correlacionada com esta atividade inibitória enzimática (ANSARI et al., 2005; IBRAR et al., 2013; XIAO et al., 2007; XIAO et al., 2013). Existem alguns relatos de atividades biológicas do manitol, tais como anti-hipertensiva (HAGIWARA et al., 2005), atividade gastroprotetora em úlceras induzidas em ratos (KIM et al., 1999). Segundo Garro e colaboradores (2015), o manitol apresenta atividade antibacteriana frente *H. pylori*, com CIM de 32 μg/mL, sendo também ativo frente às cepas de *H. pylori* resistentes a claritromicina e metranidazol, com um valor de CIM de 64 μg/mL.

4.6 Triagem *in silico* de parâmetros farmacocinéticos

A investigação *in silico* das propriedades farmacocinéticas de compostos com atividades biológicas, é uma abordagem bastante utilizada nos dias atuais no desenvolvimento de fármacos. Há substâncias ativas que apresentam alta potência frente a diferentes agentes infecciosos e são promissores a se tornarem agentes terapêuticos, porém seu efeito farmacológico não é satisfatório. Devido a isso, os estudos de ADME são importantes para verificar a viabilidade de um determinado composto bioativo. Sabendo-se que os efeitos adversos e tóxicos dos compostos estão diretamente relacionados à sua estrutura química, estes dados são lançados em modelos computacionais, realizando um monitoramento virtual, correlacionando as características estruturais com as propriedades físico-químicas, a partir de banco de dados fornecidos pelas próprias indústrias farmacêuticas (DAINA et al., 2017).

Assim, com o intuito de verificar as propriedades físico-químicas que atendam os parâmetros de ADME para os compostos inibidores de UJB, uma triagem *in silico* foi realizada. Dois *softwares* foram utilizados, o *ChemSpider* e o *Swiss*ADME (ambos gratuitos), dentre os quais o *ChemSpider* forneceu os resultados relacionados aos parâmetros da *RO5* de Lipinski e o programa *Swiss*ADME permitiu uma varredura de todos os parâmetros físico-químicos que possam interferir na farmacocinética de um candidato a fármaco, apresentando gráfico de correlação de propriedades (*Bioavailability radar*) e análise com base na "regra dos 5" de Lipinski et al. (1997), nos parâmetros de Ghose et al. (1999), Egan et al. (2000), Muegge et al. (2001) e Veber et al. (2002). Os resultados dessa triagem foram expressos na Tabela 10.

O estudo da lipofilicidade é a propriedade mais importante de um candidato a fármaco, pois está relacionada a todos os parâmetros ADME. Se um composto é muito lipofílico, ele pode ser insolúvel em meio aquoso (fluido gastrointestinal ou plasma), além disso ele pode distribuir para bicamadas lipídicas e ser incapaz de alcançar o meio intracelular. Por outro lado, se o fármaco for muito polar, pode não ser absorvido na parede intestinal devido à falta de solubilidade na membrana (ZIEMSKA et al., 2020; DAINA et al., 2014).

Como observado na tabela 10, cada regra (*RO5*, Ghose, Egan e Muegge) possui um algoritmo desenvolvido pela indústria farmacêutica responsável, as metodologias empíricas para a determinação do Log *P* consideram diversos dados, com o intuito de verificar efetivamente esse parâmetro, afim de minimizar erros. Esses algoritmos podem ser divididos em duas categorias.

Tabela 10. Ensaio *in silico* para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos dos compostos **1a-6a.**

	A	B	C	D	E	F	G			H	N. violações				
							Log $P_{o/w}$								
Cod.	M.M (g/mol)	n. átomos	RM ±0,3 cm^3	nALH	nDLH	nLR	MLog P[1]	WLog P[2]	Xlog[3] P3	PSA (Å²)	(*RO5*) Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge
1a	314,85	45	96,11	1	0	4	7,08	5,90	5,63	17,07	1^{G1}	1^{G2}	0	1^{G3}	$2^{G3,*}$
1b	359,30	45	98,80	1	0	4	7,44	6,01	5,69	17,07	1^{G1}	1^{G2}	0	1^{G3}	$2^{G3,*}$
1c	294,43	48	96,06	1	0	4	7,01	5,55	5,36	17,07	1^{G1}	0	0	0	$2^{G3,*}$
1d	325,40	47	99,92	3	0	5	6,46	5,53	5,76	62,89	1^{G1}	0	0	0	1^{G3}
1e	325,40	47	99,92	3	0	5	6,45	5,67	4,83	62,89	1^{G1}	1^{G2}	0	0	0
1f	325,40	47	99,92	3	0	5	6,10	5,67	4,83	62,89	1^{G1}	1^{G2}	0	0	0
1g	325,40	47	99,92	3	0	5	6,34	5,53	5,76	62,89	1^{G1}	0	0	0	1^{G3}
1h	325,40	47	99,92	3	0	5	6,06	5,67	4,83	62,89	1^{G1}	1^{G2}	0	0	0
2a	283,28	34	81,56	4	0	5	6,92	5,91	4,53	62,12	1^{G1}	1^{G2}	0	0	0
2b	373,90		109,20	3	2	7		3,48	4,19	52,57	0	0	0	0	0
2c	258,70	29	73,28	2	1	3	4,02	3,83	4,41	37,30	0	0	0	0	0
2d	271,24	30	75,03	4	0	4	4,98	4,46	3,66	62,89	1^{G1}	0	0	0	0
2e	269,25	31	77,09	4	1	4	4,43	3,61	3,20	83,12	1^{G1}	0	0	0	0
2f	253,25	29	75,07	3	0	4	3,79	3,91	2,91	62,89	0	0	0	0	0
2g	224,25	29	68,27	2	1	3	3,65	3,18	2,72	37,30	0	0	0	0	0
2h	287,70	30	76,74	3	0	3	4,50	3,47	4,87	51,21	1^{G1}	0	0	0	0
2i	242,70	28	71,26	1	0	3	4,54	4,13	3,71	17,07	1^{G1}	0	0	0	1^{*}
2j	314,33	41	87,75	5	1	6	3,27	3,21	3,25	64,99	0	0	0	0	0
2k	254,28	33	74,76	3	1	4	3,62	3,19	3,57	46,53	0	0	0	0	0
2l	453,55		135,68	6	2	8		1,61	2,23	80,26	0	1^{C}	0	0	0
2m	363,43	43	103,36	3	1	6	4,72	5,16	4,21	71,62	1^{G1}	0	0	0	0
2n	269,25	31	77,09	4	1	4	3,55	3,61	3,18	83,12	0	0	0	0	0
2º	258,70	29	73,28	2	1	3	4,19	3,83	3,35	37,30	1^{G1}	0	0	0	0
2p	254,28	33	74,76	3	1	4	4,0	3,19	4,27	46,53	0	0	0	0	0
3a	414,45	56	114,91	7	0	10	4,11	3,82	3,94	72,45	0	0	0	0	0
3b	294,32	40	88,94	3	0	6	4,08	3,78	4,48	35,53	1	0	0	0	0

Tabela 10. Continuação.

Cod.	M.M (g/mol)	n. átomos	RM ±0,3 cm^3	nALH	nDLH	nLR	Log $P_{o/w}$	PSA (Å²)	(*RO5*) Lipinski			Ghose	Veber	Egan	Muegge
									MLog P[1]	WLog P[2]	Xlog P[3]				
3c	322,40	46	98,56	3	0	8	5,83	4,56	5,15	35,53	0	0	0	0	1^{G3}
3d	270,27	32	75,88	3	0	4	4,89	4,88	4,40	17,07	1^{G1}	0	0	0	1^{*}
3e	303,18	32	85,98	1	0	4	3,92	4,07	4,51	17,07	0	0	0	0	$2^{G3,*}$
3f	392,08	32	91,36	1	0	4	6,65	5,29	5,81	17,07	1^{G1}	0	0	0	$2^{G3,*}$
3g	234,29	32	75,96	1	0	4	4,87	3,76	4,12	17,07	0	0	0	0	1^{*}
3h	262,35	38	85,89	1	0	4	4,09	4,38	5,05	17,07	0	0	0	0	$2^{G3,*}$
3i	262,35	38	85,89	1	0	4	4,11	4,38	4,85	17,07	0	0	0	0	1^{*}
4a	202,25	29	60,34	2	0	2	2,50	2,72	2,43	26,30	0	0	0	0	0
4b	200,28	31	63,62	1	0	1	3,58	3,41	3,36	17,07	0	0	0	0	1^{*}
5a	210,27	33	64,69	2	1	2	-0,84	-0,24	1,12	49,41	0	0	0	0	0
5b	112,09	12	27,68	2	2	0	-0,71	-0,94	-1,07	65,72	0	$4^{A,B,C,G2}$	0	0	$2^{A,*}$
5c	179,22	26	50,58	3	1	4	1,96	2,19	2,59	50,19	0	0	0	0	1^{A}
5d	163,216	25	48,83	1	1	4	1,12	1,37	1,19	29,10	0	0	0	0	0
5e	783,95	114	228,14	12	0	9	5,49	3.77	8,43	139,83	$2^{A,D,G}$	$3^{A,B,C}$	0	1^{H}	$2^{A,G3}$
6a	182,17	26	37,93	6	6	5	-4,67	-3,59	-3,10	121,38	1^{E}	2^{E}	0	0	$3^{A,G3,*}$

A-Massa molar (MM); B- número de átomos; C- Refratatividade Molar (RM); D- número de aceptores de ligação de hidrgenio (nALH); E-número de doadores de ligação de hidrogênio (nDLH); F-número de ligações roteáveis (nLR); G-coeficiente de partição n-octanol/água (Log P, subdivido de acordo com o método utilizado para o seu cálculo); H-área superfície polar (PSA).

Parâmetros utilizados:

RO5 de Lipinski – MM ≤ 500 g/mol; MLog *P* ≤ 4,15; nALH ≤ 10; nDLH ≤ 5;

Ghose–MM entre 160 e 480 g/mol; Log *P* entre -0,4 e 5,6; RM entre 40 e 130; n. de átomos entre 20 e 70;

Egan–Log P ≤ 5,88; TPSA ≤ 131,6;

Muegge–MM entre 200 e 600 g/mol; Log P entre -2 e 5; TPSA ≤ 150; NLR ≤ 15; ALH ≤ 10; DLH ≤ 5; *Heteroatomos ≤ 2;

VEBER-nLR ≤ 10; TPSA ≤ 140.

A primeira ferramenta de cálculo, divide as estruturas moleculares em fragmentos moleculares (WlogP) ou átomos (XLogP), sendo obtido somando-se contribuições fragmentadas ou atômicas. A segunda categoria reúne os métodos topológicos em que a molécula é definida por descritores relacionados à sua topologia (consideram o tipo de ligação química e as propriedades químicas dos átomos), ou uma simples contagem de átomos de carbono e heteroátomos (MLogP). A previsão é dada por equações estatísticas, geralmente obtido por regressões lineares múltiplas treinadas em grandes conjuntos de dados moleculares. (DAINA et al., 2014). Existe uma faixa ótima de Log *P*, entre 0 e 5, coeficiente de partição menor que 0 tem baixa permeabilidade na camada lipídica e valores de Log *P* maiores que 5 são considerados com baixa solubilidade em soluções aquosas, sendo assim as chalconas **1a-1h, 2a**, **3c e 3f** apresentaram maior caráter lipofílico, pois o Log *P* variou entre 7,44 a 5,15. Entretanto diversos compostos apresentaram valores dentro da faixa ótima de Log *P* (0-5) (**2c-2k**, **2m-2p**, **3a**, **3b**, **3d**, **3e**, **3g-3i**, **4a**, **4b**, **5c** e **5d**).

Em particular as chalconas **2c** e **2m** apresentaram valores de Log *P* entre 4,52 e 4,74 e foram inibidores de UJB (IC_{50} de 5,7 e 9,0 μmol/L, respectivamente), bem como tiveram os melhores resultados frente a *H. pylori* (CIM de 0,97 e 0,35 mmol/L, respectivamente), sendo assim, os dados de *RO5* possivelmente influenciaram na atividade biológica desses compostos a nível celular. O mesmo foi observado para os compostos **3e**, **3g**, **3h** e **3i** com CIM de 256 μg/mL em *H. pylori*, apresentando valores de Log *P* dentro da faixa efetiva. O´Shea e Moser (2008), relataram que compostos mais hidrofílicos (valores de Log *P* menores) foram os que melhor apresentaram atividade contra bactérias Gram-negativas. Os dados relacionados a *RO5*, trazem parâmetros relacionados a biodisponibilidade oral de uma molécula bioativa, sendo uma característica favorável para que o composto *hit* tenha maior probabilidade de se tornar um agente terapêutico (LIPINSKI, 2004).

Da mesma maneira os valores de Log *P* com desvio da faixa ótima também ajudaram a compreender os resultados dos compostos que não apresentaram atividade antibacteriana. A ausência da atividade anti-*H. pylori* da chalconas **1c, 1h** e **2a**, inibidoras de UJB, pode estar associada aos valores desfavoráveis de Log *P* encontrados, sendo a falta de permeabilidade celular um fator determinante para a inatividade destes compostos.

A área da superfície polar (PSA) é a soma das áreas de superfície de van der Waals dos átomos polares (oxigênio e nitrogênio) e está relacionada à avaliação da permeabilidade celular e com a biodisponibilidade *in vivo* de um agente terapêutico (ZIEMSKA et al., 2020). De acordo com pesquisa realizada por O´Shea e Moser (2008) com vários antibacterianos, quanto maior o valor de PSA maior parece ser o efeito contra bactérias. Sendo outro fator que implica na melhor

atividade anti-*H.pylori* da chalcona **2m** (71,62 Å²). Um estudo realizado com algumas 4-aminochalconas também notou esse comportamento, o composto com PSA de 88 Å², apresentou valores de CIM superiores a 512 μg/mL para cepas de *S. aureus* e uma menor atividade para *E.coli* (CIM >1024 μg/mL) (MARIÑO, 2014).

Em relação aos compostos de origem natural (**5a-5e** e **6a**), o composto **6a** violou uma das regras de Linpisk, por possuir nDLH > 5, devido a presença das hidroxilas em sua estrutura. O aumento do número de possibilidades de ligações de hidrogênio contribui para a solubilidade em água, mas dificulta a passagem pelas membranas devido ao aumento do número de ligações de hidrogênio que devem ser quebradas para a passagem do fármaco do meio hidrofílico para o meio hidrofóbico representado pela bicamada de fosfolipídeos das membranas celulares e também das membranas das organelas. Além disso, o composto **6a** apresentou um valor de Log *P* muito baixo (-4,67), demostrando ser altamente polar, sendo possivelmente pouco permeável em camadas lipídicas. Porém no estudo realizado por Garro et al. (2015), esse composto apresentou atividade antibacteriana frente *H. pylori*, com CIM de 32 μg/mL. De acordo com, Lipinski (2004) e O´Shea e Moser (2008), há alguns compostos que são uma exceção a *RO5*, como os antibacterianos, juntamente com antifúngicos, vitaminas e cardiotônicos, pois estas classes farmacológicas atuam como substratos para transportadores que ocorrem naturalmente.

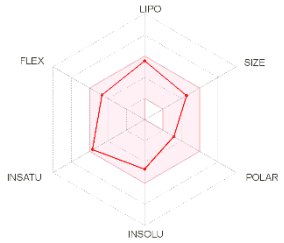
O composto **5a**, o mais ativo frente a UJB (K_i de 0,55 μmol/L), não apresentou nenhuma violação em ambos os filtros, por meio dos ensaios *in silico* e *in vitro*, podendo ser promissor frente a *H. pylori* através da inibição da enzima urease. Entretanto, ensaios *in vitro* são necessários para avaliação da atividade antibacteriana. O composto **5b**, não apresentou nenhuma violação na *RO5*, porém não satisfaz os parâmetros de Ghose e Muegge, devido ser uma molécula pequena.

Outro composto que violou os parâmetros farmacocinéticos foi o **5e**, analisando em relação ao número de ligações rotáveis (nLR), que está relacionado à flexibilidade da molécula para a predição da biodisponibilidade, pois quanto maior a sua flexibilidade mais fácil a interação com a enzima. A flexibilidade da molécula está associada ao número de ligações rotáveis que corresponde ao número de ligações simples, fora de um anel. Quanto mais ligações simples tiver a molécula, maior é a interação com a enzima facilitando a transposição da barreira, ou seja, maior a biodisponibilidade do fármaco. Analisando apenas esse parâmetro o composto **5e** poderia apresentar alta biodisponibilidade, porém ele viola três parâmetros, a MM superior a 500 g/mol, pode afetar na distribuição, pois o transporte de moléculas maiores é

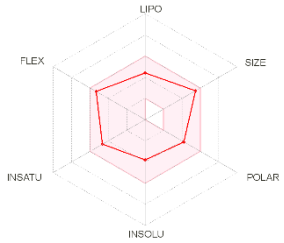
dificultado, número de grupos ALH superior a 10 e o coeficiente de partição acima do permitido.

Outra forma de visualizar a correlação entre essas propriedades fisico-quimicas, é atraves do *Bioavailability radar* (radar de biodisponibilidade), que permite observar semelhança da molécula com um fármaco. O gráfico possui uma área rosa representando o intervalo ideal para cada propriedade, como lipofilicidade, tamanho, polaridade, solubilidade, saturação e flexibilidade (DAINA et al., 2017).

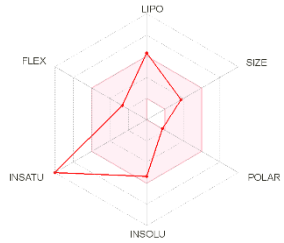
Os compostos que obtiveram os melhores resultados frente ao ensaio *in vitro* e *in silico* são observados nos gráficos de *Bioavailability radar*, na Figura 51.



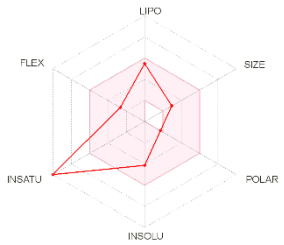
2c



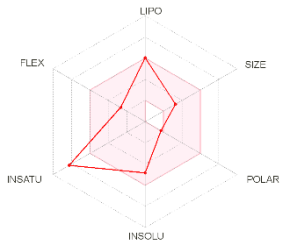
2m



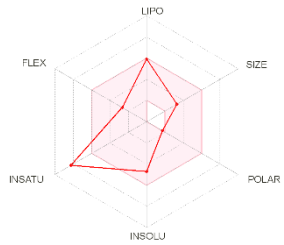
3e



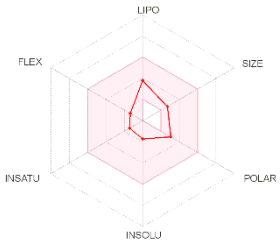
3g



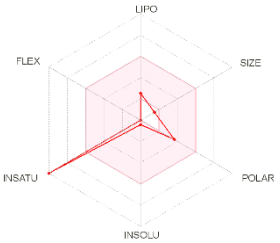
3h



3i



5a



5b

5c **5d**

Figura 51. Representação dos gráficos de *Bioavailability radar*. Limites da area rosa: LIPO (lipofilicidade) -0,7 < XLogP3 < 5,0; SIZE (tamanho da molécula) 150 g/mol < MM < 500 g/mol; POLAR (polaridade) 20 Å² < PSA < 130 Å²; INSOLU (insolubilidade) 0 < LogS < 6; INSATU (insaturação) 0 < fração Csp^2 ou Csp < 0,25; FLEX (flexibilidade) 0 < nLR < 9.

Com esses gráficos observa-se que as chalconas **2c** e **2m**, e os compostos oriundos do fungo *F. proliferatum* **5a**, **5c** e **5d** apresentaram excelentes condições para uma boa biodisponibilidade se administrado por via oral, todos os pontos plotados no gráfico, correlacionando os seis parâmetros físico-químicos estão dentro da área que apresenta os padrões ideais, para os demais compostos apenas o parâmetro de instauração não estava de acordo com o gráfico, ficando fora da área rosa. Dessa forma, a busca por compostos candidatos a fármacos que possam ser administrados via oral é prioritária na indústria farmacêutica, por ser a via mais segura, conveniente e econômica.

5. Conclusões

A triagem *in vitro* foi realizada com 37 compostos sintéticos da classe das chalconas. A análise dos resultados de inibição enzimática das chalconas derivadas de β-ionona em relação as diferenças estruturais revelaram que os compostos mais ativos majoritariamente apresentaram grupos retiradores de elétrons no anel aromático B, especialmente quando tinham grupo NO_2 na posição *para* do anel. Nas chalconas **2a-2q** percebe-se esta mesma influência do anel B, mas também houve a influência dos substituintes do anel A, onde grupos retiradores também impactaram positivamente na atividade inibitória enzimática.

Dentre as chalconas nove se destacaram (**1a,1c,1g, 1h, 2a, 2b, 2c, 2d** e **2m**) com valores de IC_{50} variando de 5,7 à 18,8 µmol/L. A docagem molecular e estudo *in vitro* de mecanismo de inibição foram realizados com base nos resultados de inibição de UJB, tendo as chalconas **1h**, **2a**, **2c** e **2m** revelado um mecanismo de inibição competitivo e a chalcona **1c** um mecanismo não competitivo. As chalconas com atividade inibitória em UJB que apresentaram atividade anti-*H. pylori* significativa foram a **2c** com CIM de 0,97 mmol/L e a **2m** (CIM 0,35 mmol/L). Os dados de *RO5*, como o Log *P*, encontrados para estas chalconas foram coerentes e podem estar correlacionados com a atividade biológica desses compostos a nível celular.

Além dos compostos sintéticos, também foram ensaiados compostos oriundos de produtos naturais, 5 compostos isolados do fungo *F. proliferatum* foram testados e os compostos **5a** e **5b** apresentaram o maior potencial (IC_{50} de 1,66 e 24,39 µmol/L, respectivamente). O estudo de cinética enzimática revelou comportamento competitivo para estes inibidores (K_i 0,55 e 1,1 µmol/L, respectivamente). O *docking* do composto **5b** revelou as possíveis interações entre enzima-inibidor com *score* significativo e em concordância com os resultados experimentais, mas para o composto **5a** não houve coerênca com os resultados *in vitro*, podendo estar relacionado as diferenças estruturais das enzimas usadas no estudo *in silico* e *in vitro*. O composto **5a** também apresentou excelentes condições para uma boa biodisponibilidade para ser administrado por via oral.

O composto **6a** obtido do extrato ativo do cogumelo *Pholiota nameko* foi identificado pelas técnicas de RMN 1D e 2D como D-manitol e apresentou após a cristalização e purificação IC_{50} de 35,5 µmol/L. O manitol é conhecido pela sua atividade gastroprotetora e anti-*H. pylori*, podendo a atividade inibitória da UJB encontrada neste trabalho ser um indicativo do mecanismo anti-*H. pylori*.

Através deste estudo foi possível investigar PNs e sintéticos por meio de ensaios *in vitro* e *in silico* que revelaram alguns inibidores de UJB com características promissoras. Estas moléculas pequenas podem ser otimizadas em busca de novas entidades químicas (NCE-*New Chemical Entities*) com potencial de desenvolvimento clínico.

6. Referências Bibliográficas

AMIEVA, M. R.; VOGELMANN, R.; COVACCI, A.; TOMPKINS, L. S.; NELSON, W. J.; FALKOW, S. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by Helicobacter pylori CagA. *Science,* 300: 5624, 1430-1434, 2003.

AHARI-MOSTAFAVI, M. M.; SHARIF, A.; MIRZAEI, M.; AMANLOU, M. Novel and versatile methodology for synthesis of β-aryl- β -mercapto ketone derivatives as potential urease inhibitors. *Journal Iranian Chemical Society*, 11: 1113–9, 2014.

AHMAD, I.; FATIMA, I.; AFZA, N.; MALIK, A.; LODHI, M. A.; CHOUDHARY, M. I. Urease and serine protease inhibitory alkaloids from Isatis tinctoria. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 23*:6, 918-921, 2008.

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanum species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40:9, 4168-4170, 2001.

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90:6, 1829-1845, 2011.

ANDRADE, C. H.; TROSSINI, G. H. G.; FERREIRA, E. I. Modelagem molecular no ensino de química farmacêutica. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 7:1, 23, 2010.

ANSARI F. L.; NAZIR S.; NOUREEN H.; MIRZA B. Combinatorial Synthesis and Antibacterial Evaluation of an Indexed Chalcone Library. *Chemistry & Biodiversity*, 2, 1652, 2005.

ANVISA. Antimicrobianos – Bases teóricas e uso clínico, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil, 2014. <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm> Acesso em 3 de Agosto de 2019.

ARROIO, A.; HONÓRIO, K.; SILVA, A. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. *Química. Nova*, 33:3, 694–699, 2010.

ASIRI, A.M.; KHAN, S.A. Synthesis and anti-bacterial activities of a bis-chalcone derived from thiophene and its bis-cyclized products. *Molecules* 16, 523–531, 2011.

ASSIS, M. A.; MORELLI-AMARAL, V. F.; PIMENTA, F. Grupos de pesquisa e sua produção científica sobre plantas medicinais: um estudo exploratório no Estado do Rio de Janeiro. *Revista Fitos*, 9:1, 45-54, 2015.

BALASUBRAMANIAN, A.; PONNURAJ, K. Crystal structure of the first plant urease from jack bean: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure. *Journal of Molecular Biology*, 400, 274-283, 2010.

BARRETT, A. J.; KEMBHAVI, A. A.; BROWN, M. A.; KIRSCHKE, H.; KNIGHT, C. G.,; TAMAI, M.; HANADA, K. (L-trans-Epoxysuccinyl-leucylamido (4-guanidino) butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochemical Journal*, 201:1, 189-198, 1982.

BARTH, J.; HAHNE, W. Review article: rabeprazolebased therapy in *Helicobacter pylori* eradication. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 16:3133, 2002.

BERNARDES, A. Síntese, citotoxicidade, reatividade a gsh e absorção intestinal ex vivo de hidroxichalconas e bases de mannich derivadassíntese, citotoxicidade, reatividade a glutationa e absorção intestinal ex vivo de hidroxichalconas e seus derivados. Universidade Federal de Goiás, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, 2018. Tese de Doutorado.

BRAGA, M. P.; DA SILVA, C. de B.; ADAMS, A. I. H. Inibidores da bomba de prótons: Revisão e análise farmacoeconômica. *Saúde (Santa Maria)*, 37:2, 19-32, 2011.

BRUSCKY, D. M. V.; ROCHA, L. A. R. da; COSTA, A. J. F. Recurrence of chronic urticaria caused by reinfection by Helicobacter pylori. *Revista Paulista de Pediatria*, 31: 2, 272-275, 2013.

CARLINI, C. R.; LIGABUE-BRAUN, R. Ureases as multifunctional toxic proteins: a review. *Toxicon*, 110: 90-109, 2016.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. *Revista Virtual de Química*, 421-437, 2013.

CLSI, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Testes for Bacteria That Grow Aerobically, approved Standard-Tenth Edition. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

COCCO, D. R.; DE SOUZA, M. R.; ALARCON, S. P.; KURITA, V. R. Uso de métodos computacionais para análise farmacológica e toxicológica do velutin. J*ournal of Medicine and Health Promotion*, 5:2, 88-99, 2020.

COELHO, L. G.; MAGUINILK, I.; ZATERKA, S.; PARENTE, J. M.; PASSOS, M. D. C. F.; MORAES-FILHO, J. P. P. 3rd Brazilian Consensus on *Helicobacter pylori*. *Arquivos de gastroenterologia*, 50:2, 1–17, 2013.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, São Paulo, 36: 599-607, 2003.

COPELAND, R. A. Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. *John Wiley & Sons*, 2, 270-286, 2000.

CORTÉS, A., CASCANTE, M., CÁRDENAS, M. L., CORNISH-BOWDEN, A. Relationships between inhibition constants, inhibitor concentrations for 50% inhibition and

types of inhibition; new ways of analysing data. *The Biochemical Journal*, 357: 263–268, 2001.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. iLOGP: a simple, robust, and efficient description of n-octanol/water partition coefficient for drug design using the GB/SA approach. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54: 12, 3284-3301, 2014.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific reports*, 7,42717, 2017.

DAME, Z. T.; SILIMA, B.; GRYZENHOUT, M. & VAN REE, T. Bioactive compounds from the endophytic fungus Fusarium proliferatum. *Natural Product Research*, 30: 11, 1301-1304, 2016.

DE CARVALHO, M. P; ABRAHAM, W. R. Antimicrobial and biofilm inhibiting diketopiperazines. *Current Medicinal Chemistry*, 19: 21, 3564-3577, 2012.

DE SOUSA, L. R. F., WU, H., NEBO, L., FERNANDES, J. B., DA SILVA, M. F. G. F., KIEFER, W., KANITZ, M.; BODEM, J.; DIEDERUCH, W. E.; SCHIRMEISTER, T.; VIEIRA, P. C. Flavonoids as noncompetitive inhibitors of Dengue virus NS2B-NS3 protease: Inhibition kinetics and docking studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23: 466–470, 2015.

DE SOUZA, D. H. F.; LIMA, M. I. S.; VIEIRA, P. C. Isolation of arginase inhibitors from the bioactivity-guided fractionation of Byrsonima coccolobifolia leaves and stems. *Journal Natural Product*, **77**: 392–396, 2014.

DIXON, N. E., GAZZOLA, C., WATTERS, J. J., BLAKELEY, R. L., ZERNER, B. Inhibition of jack bean urease (EC 3.5. 1.5) by acetohydroxamic acid and by phosphoramidate. Equivalent weight for urease. *Journal of the American Chemical Society*, *97*:14, 4130-4131, 1975.

DOMÍNGUEZ, M. J.; SANMARTÍN, C.; FONT, M.; PALOP, J. A.; SAN FRANCISCO, S.; URRUTIA, O.; HOUDUSSE, F; GARCÍA-MINA, J. M. Design, synthesis, and biological evaluation of phosphoramide derivatives as urease inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*: 10, 3721-3731, 2008.

DUTTA, S.; BHATTACHARYYA, D. Enzymatic, antimicrobial and toxicity studies of the aqueous extract of Ananas comosus (pineapple) crown leaf. *Journal of ethnopharmacology*, 150: 2, 451-457, 2013.

EGAN, B. J.; O'CONNOR H. J.; O'MORAIN, C. A. Treatment of Helicobacter pylori. Blackwell Publishing Ltd**.** Helicobacter (Suppl.1): 31–37, 2007.

EGAN, W. J.; LAURI, G. Prediction of intestinal permeability. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 273–289, 2002.

FAWCETT, J. K.; SCOTT, J. E. A rapid and precise method for the determination of urea. *Journal Clinical Pathology*, 13: 156−159, 1960

FERREIRA, R. S; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. *Química Nova*, 34: 10, 1770-1778, 2011.

FUKUSHIMA, R. S.; WEIMER, P. J.; KUNZ, D. A. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic Clostridium species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34:1, 22–26, 2003.

FRANÇA-SANTOS, A.; ALVES, R. S.; LEITE, N. S.; FERNANDES, R. P. M. Estudos bioquímicos da enzima bromelina do *Ananas comosus* (abacaxi*). Scientia Plena*, 5: 11, 2009.

FOLLMER, C. Ureases as a target for the treatment of gastric and urinary infections. *Journal of clinical pathology*, 63: 5, 424-430, 2010.

GARRO, M. F., IBÁÑEZ, A. G. S., VEGA, A. E., SOSA, A. C. A., PELZER, L., SAAD, J. R.; MARIA, A. O. Gastroprotective effects and antimicrobial activity of Lithraea molleoides and isolated compounds against Helicobacter pylori. *Journal of ethnopharmacology*, *176*, 469-474, 2015.

GHOSE, A.K.; VISWANADHAN, V.N.; WENDOLOSKI, J.J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *Journal Combinatorial Chemistry*, *1*, 55–68, 1999.

GOODWIN, A.; KERSULYTE, D.; SISSON, G.; VELDHUYZEN VAN ZANTEN, S. J.; BERG, D. E.; HOFFMAN, P. S. Metronidazole resistance in Helicobacter pylori is due to null mutations in a gene (rdxA) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. *Molecular microbiology*, *28*: 2, 383-393, 1998.

GOMES, L. E.; LAGO, A. P. M. C. Análise e Revisão De Métodos para Diagnóstico do *Helicobacter Pylori. Rev. Acadêmica Oswaldo Cruz*, 2, 7, 2014.

GSCHWEND, D. A.; GOOD, A. C.; KUNTZ, I. D. Molecular docking towards drug Discovery. *Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal*, 9: 2, 175-186, 1996.

HAGIWARA, S.; TAKAHASHI, M.; SHEN, Y.; KAIHOU, S.; TOMIYAMA, T.; YAZAWA, M.; TAMAI, Y.; SIN, Y.; KAZUSAKA, A.; TERAZAWA, M. A Phytochemical in the Edible Tamogi-take Mushroom (Pleurotus cornucopiae), D-Mannitol, Inhibits ACE Activity and Lowers the Blood Pressure of Spontaneously Hypertensive Rats. *Bioscience, Biotechnology e Biochemistry*, 69: 8, 1603–1605, 2005.

HAMEED, S., YASIN, K. A., AKHTAR, T., & KHAN, K. M. Design, synthesis, and urease inhibition studies of a series of 4-amino-5-aryl-3H-1, 2, 4-triazole-3-thiones. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 141:4, 479-484, 2010.

HEILOS D.; RORÍGUEZ-CARRASCO Y.;, ENGLINGER B.; TIMELTHALER G.; SUSHILLA V. S.; SULYOK M.; BOECKER S.; SÜSSMUTH R. D.; HEFFETER P.; LEMMENS-GRUBER R.; DORNETSHUBER-FLEISS R.; WALTER B. The natural fungal

metabolite beauvericin exerts anticancer activity in vivo: a pre-clinical pilot study. *Toxins* 9:258–263, 2017.

INCA: Instituto Nacional de Câncer Jose Alencar Gomes da Silva. Ministério da Saúde. Brasil, <https://www.inca.gov.br/> Acesso em: 24 de Setembro de 2019.

IBRAR, A.; KHAN, I.; ABBAS, N. Structurally diversified heterocycles and related privileged scaffolds as potential urease inhibitors: a brief overview. *Archiv der Pharmazie*, 346: 6, 423-446, 2013.

JADHAV, S. G.; MESHRAM, R. J.; GOND, D. S.; GACCHE, R. N. Inhibition of growth of Helicobacter pylori and its urease by coumarin derivatives: molecular docking analysis. *Journal of pharmacy research*, 7: 8, 705-711, 2013.

JALGAONWALA, R. E.; MOHITE, B. V.; MAHAJAN, R. T. A review: natural products from plant associated endophytic fungi. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1: 2, 21-32, 2011.

KAFARSKI, P.; TALMA, M. Recent advances in design of new urease inhibitors: A review. *Journal of Advanced Researc*h, 13, 101–112, 2018.

KAPPAUNA, K.; PIOVESANA, A. C.; CARLINIA, C. R.; LIGABUE-BRAUNC, R. Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – A review. *Journal of Advanced Research*, 13, 3-17, 2018.

KHAN, K. M.; ULLAH, Z.; LODHI, M. A.; ALI, M.; CHOUDHARY, M. I.; UR RAHMAN, A.; UL HAQ, Z. Successful computer guided planned synthesis of (4R)-thiazolidine carboxylic acid and its 2-substituted analogues as urease inhibitors. *Molecular diversity*, *10*: 2, 223-231, 2006.

KHARWAR, R. N.; MISHRA, A.; GOND, S. K.; STIERLE, A.; STIERLE, D. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Natural product reports*, 28: 7, 1208-1228, 2011.

KIM, H.; SEO, J. Y.; KIM, K. H. Effects of Mannitol and Dimethylthiourea on Helicobacter pylori-Induced IL-8 Production in Gastric Epithelial Cells. *Pharmacology*, 59: 4, 201-211, 1999.

KIRCHMAIR, J.; MARKT, P.; DISTINTO, S.; SCHUSTER, D.; SPITZER, G. M.; LIEDL, K. R.; LANGER, T.; WOLBER, G. The Protein Data Bank (PDB), its related services and software tools as key components for in silico guided drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51: 22, 7021–7040, 2008.

KITAGAWA, R. R.; BONACORSI, C.; FONSECA, L. M. D.; VILEGAS, W.; RADDI, M. S. G. Anti-Helicobacter pylori activity and oxidative burst inhibition by the naphthoquinone 5-methoxy-3, 4-dehydroxanthomegnin from Paepalanthus latipes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22: 1, 53-59, 2012.

KORNSAKULKARN, J.; DOLSOPHON, K. Dihydronaphthalenones from endophytic fungus Fusarium sp. *Tetrahedron*, 67: 39, 7540–7547, 2011.

KRAJEWSKA, B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59: 1–3, 9–21, 2009.

KUMAR, D.; THAKUR, K.; SHARMA, S.; KUMAR, S. NMR for metabolomics studies of Crataegus rhipidophylla Gand. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *411*(10), 2149-2159, 2019.

LADEIRA, M.S.P.; SALVADORI, D.M.F.; RODRIGUES, M.A.M. Biopatologia do Helicobacter pylori. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*., 39: 4, 335-342, 2003.

LAGE, T. C. A; MACIEL, T. M. S.; MOTA, Y. C. C.; SISTO, F.; SABINO, J. R.; SANTOS, J. C. C.; FIGUEIREDO, I. M.; MASIA, C. DE FÁTIMA, A.; FERNANDES, S.; MODOLO, L. V. In vitro inhibition of Helicobacter pylori and interaction studies of lichen natural products with jack bean urease. *New Journal of Chemistry*, 42: 7, 5356-5366, 2018.

LAI, C. H.; RAO, Y. K.; FANG, S. H.; SING, Y. T.; TZENG, Y. M. Identification of 3’,4’,5’-trimethoxychalcone analogues as potent inhibitors of Helicobacter pylori-induced inflammation in human gastric epithelial cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20: 5462–5465, 2010.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. New York: *Freeman and Company*, 6, 207-210, 2014.

LIMA, R. S.; NODA-PEREZ, C.; DA SILVA, C. C.; SANTANA, M. J.; JUNIOR, L. H. Q.; BARRETO, S.; DE MORAIS, M. O.; MARTINS, F. T. Structure and cytotoxic activity of terpenoid-like chalcones. *Arabian Journal of Chemistry*, *12*: 8, 3890-3901, 2016.

LIPINSKI, C.A. Lead and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1, 337-341. 2004.

LIPINSKI, C. A., LOMBARDO, F., DOMINY, B. W., & FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, *23*: 1-3, 3-25, 1997.

MALFERTHEINER, P.; MEGRAUD, F.; O'MORAIN, C. A.; ATHERTON, J.; AXON, A. T.; BAZZOLI, F.; GENSINI, G. F; GISBERT, J. P; ROKKAS, T; EL-OMAR, E. M. Management of Helicobacter pylori infection—the Maastricht IV/Florence consensus report. *Gut*, 61:5, 646-664, 2012.

MALFERTHEINER, P.; MEGRAUD, F.; O'MORAIN, C. A.; GISBERT, J. P.; KUIPERS, E. J.; AXON, A. T.; BAZZOLI, F; GASBARRINI, A; ATHERTON, J; GRAHAM, D. Y; HUNT, R.; MOAYYEDI , P; ROKKAS, T.; RUGGE, M.; SELGRAD, M.; SUERBAUM, S. SUGANO, K; EL-OMAR, E.M. Management of Helicobacter pylori infection—the Maastricht V/Florence consensus report. *Gut, 66*: 1, 6-30, 2017.

MARIÑO, P. A. Estudo de Chalconas como Antibacterianos Potenciais: Síntese, Avaliação da Ação Antibacteriana e das Propriedades Físico-químicas. 98f. Dissertação de Mestrado, Uruguaiana, 2014.

MODA, T. L.; MONTANARI, C. A.; ANDRICOPULO, A. D. Hologram QSAR model for the prediction of human oral bioavailability. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15:24, 7738-7745, 2007.

MODOLO, L. V.; DE SOUZA, A. X.; HORTA, L.P.; ARAÚJO, D.P.; DE FÁTIMA, A. An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: A review. *Journal of Advanced Research*, 6: 1, 35–44, 2015.

MOON, S.; LEE, J.; KIM, K. T.; PARK, Y. S.; NAH, S. Y.; AHN, D.; PAIK, H. D. Antimicrobial effect of 7-O-butylnaringenin, a novel flavonoid, and various natural flavonoids against Helicobacter pylori strains. *International journal of environmental research and public health*, 10: 11, 5459-5469, 2013.

MOTOSHIMA, R. A.; ROSA, T. F.; MENDES, L. C.; DA SILVA, E. V.; VIANA, S. R.; DO AMARAL, B. S.; DE SOUZA, D. H. F.; LIÃO, L. M.; DA SILVA, M. L. C.; DE SOUSA, L. R. F.; CARBONERO, E. R..Inhibition of Leishmania amazonensis arginase by fucogalactan isolated from Agrocybe aegerita mushroom. *Carbohydrate Polymers* 201, 532–538, 2018.

MUEGGE, I.; HEALD, S.L.; BRITTELLI, D. Simple selection criteria for drug-like chemical matter. *Journal. Medicinal Chemistry*, *44*, 1841–1846, 2001.

NEWMAN, D. J; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal Natural Products*, 83, 770−803, 2020.

O'CONNOR, A.; VAIRA, D.; GISBERT, J. P.; O'MORAIN, C. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 19, 38-45, 2014.

O´SHEA, R.; MOSER, H.E. Physicochemical properties os antibacterial compounds: implications for drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51:10, 2871-2878, 2008.

PALAFOX, M. A.; TARDAJOSA, G.; GUERRERO-MARTÍNEZ, A.; VATS, J. K.; HUBERT, J.; RASTOGI, V. K. Relationships observed in the structure and spectra of uracil and its 5-substituted derivatives. *Spectrochimica Acta Part A*, v. 75, p. 1261-126, 2010.

PAULA, V. F.; BARBOSA, L. C. A.; PILÓ-VELOSO, D.; DEMUNER, A. J.; HOWARTH, O.. Constituintes químicos da casca de Ochroma lagopus swartz (Bombacaceae). *Revista Eclética Química*, São Paulo, 23, 45-57, 1998.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; ENGEL, R. G. Química Orgânica Experimental: Técnicas de escala pequena. 2ª. Ed., Porto Alegre, Bookman, 2009 591-592.

PEYTAM, F.; ADIB, M.; MAHERNIA, S.; RAHMANIAN-JAZI, M.; JAHANI, M.; MASOUDI, B.; MAHDAVI, M.; AMANLOU, M. Isoindolin-1-one derivatives as urease inhibitors: Design, synthesis, biological evaluation, molecular docking and in-silico ADME evaluation. *Bioorganic chemistry*, *87*, 1-11, 2019.

PICCIRILLO, E.; AMARAL, A. T. Busca virtual de compostos bioativos: conceitos e aplicações. *Química Nova*, v. 41, n. 6, p. 662-677, 2018.

RASEKHI, F.; TAJICK, M.A.; RAHIMIAN, H.; SHARIFIMEHR, S. Some phytotoxic and antimicrobial compounds extracted from culture filtrates of Fusarium proliferatum FP85. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences, Dhaka,* v.4, n.5, p.245-251, 2014.

RAMALHO, S. D.; BERNADES, A.; DEMETRIUS, G.; NODA-PEREZ, C.; VIEIRA, P. C.; DOS SANTOS, C. Y.; DA SILVA, J. A.; MORAES, M. O.;MOUSINHO, K. C. Synthetic chalcone derivatives as inhibitors of cathepsins K and B, and their cytotoxic evaluation. *Chemistry & biodiversity*, *10*: 11, 1999-2006, 2013.

RAMSTEDT, M.; JIRJIS, R.; SODERHALL, K. Metabolism of Mannitol in Mycorrhizaland Non-Mycorrhizal Fungi. *New Phytologist*, 105, 281-287, 1987.

RAUF, A.; SHAHZAD, S.; BAJDA, M.; YAR, M.; AHMED, F.; HUSSAIN, N.; NADEEM, A;KHAN, A.; JOŃCZYK, J. Design and synthesis of new barbituric-and thiobarbituric acid derivatives as potent urease inhibitors: structure activity relationship and molecular modeling studies. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *23*: 17, 6049-6058, 2015.

REGO, Y. F.; QUEIROZ, M. P.; BRITO, T. O.; CARVALHO, P. G.; DE QUEIROZ, V. T.; DE FÁTIMA, Â.; MACEDO JR, F. A review on the development of urease inhibitors as antimicrobial agents against pathogenic bacteria. *Journal of Advanced Research*, *13*, 69-100, 2018.

RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.; VISMER, H.F. Production of fumonisin analogs by Fusarium species. *Applied Environmental Microbiology*, 68: 5, 2101-5, 2002.

RODRIGUES, F. E.; LIMA, J. Q.; OLIVEIRA, M. D. C. F. D.; VASCONCELOS, J. N.; SANTIAGO, G. M.; MAFEZOLI, J.; ARRIAGA, A. Diterpene and other constituents from Stemodia maritima (Scrophulariaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21:8, 1581-1586, 2010.

ROMERO, A. L.; SOUZA, J. P. A.; ROMERO, R. B. Propriedades farmacocinéticas e interação de híbridos de ibuprofeno e produtos naturais com prostaglandina g/h sintase 2. In*: Colloquium Exactarum.* ISSN: 2178-8332, 21-30, 2014.

ROZMER, Z; PERJÉSI, P. Naturally occurring chalconas and their biological activities. *Phytochem rev*, 15, 87-120, 2016.

SAEED, A.; CHANNAR, P. A.; LARIK, F. A.; ABBAS, Q.; HASSAN, M.; RAZA, H.; SEO, S. Y. Jack bean urease inhibitors, and antioxidant activity based on palmitic acid derived 1-acyl-3-arylthioureas: synthesis, kinetic mechanism and molecular docking studies. *Drug research*, *67*: 10, 596-605, 2017.

SAIFY, Z. S.; KAMIL, A.; AKHTAR, S.; TAHA, M.; KHAN, A.; KHAN, K. M.; JAHAN, S.; RAHIM, F.; PERVEEN, S.; CHOUDHARY, I. 2-(2'-Piridil) benzimidazole derivatives and their urease inhibitory activity. *Medicinal Chemistry Research*, 23, 4447-4454, 2014.

SANT, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. *Revista Virtual de Química*, 1:1, 49-57, 2009.

SANTOS, V. L. A; DE ASSIS GONSALVES, A.; ARAÚJO, C. R. M. Abordagem didática para o desenvolvimento de moléculas bioativas: regra dos cinco de lipinski e preparação de heterociclo 1, 3, 4-oxadiazol em forno de micro-ondas doméstico. *Química nova*, 41, 2017.

SCHÜRMANN, B.; SALLUM, W. ST; TAKAHASHI, J. A. Austin, dehydroaustin and other metabolites from Penicillium brasilianum. *Química Nova*, v. 33, n. 5, p. 1044-1046, 2010.

SHI, W. K.; DENG, R. C.; WANG, P. F.; YUE, Q. Q.; LIU, Q.; DING, K. L.; LIU, W. R. *3*-Arylpropionylhydroxamic acid derivatives as Helicobacter pylori urease inhibitors: Synthesis, molecular docking and biological evaluation. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 24: 19, 4519-4527, 2016.

SILVA, T. L.; TOFFANO, L.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA; M. F. G. F.; DE SOUSA, L. R. F.; VIEIRA, P. C. Mycotoxins from Fusarium proliferatum: new inhibitors of papain-like cysteine proteases. *Brazilian Journal of Microbiology* 51: 1169–1175, 2020.

STEPIÉN, L.; KOCZYK, G. WAŚKIEWICZ, A. Diversity of Fusarium species and mycotoxins contaminating pineapple. *Journal Applied Genetics*, 54: 3, 367, 2013.

SIQUEIRA, J. S.; LIMA, P. S.; BARRETO, A. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Aspectos Gerais nas Infecções por *Helicobacter pylori* Revisão. *RBAC*, 39: 1, 9-13, 2007.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. Química Orgânica. 2: 10, Rio de Janeiro: LTC, 2012. p. 282,283, 294,295.

SUN, W.; GUO, Z.; LU, C.; SHEN, Y. Fusaric acid modulates Type Three Secretion System of Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1–5, 2014.

TANAKA, M. A. S.; MAEDA, J. A.; PLAZAS, I. H. A. Z. Microflora fúngica de sementes de milho em ambientes de armazenamento. *Scientia Agricola* 58: 501-508. 2001.

TALEBI BEZMIN ABADI, A. Therapy of Helicobacter pylori: present medley and future prospective. *BioMed Research International*, 2014, 2014.

TEIXEIRA, T. F.; SOUZA, IKF de; ROCHA, R. D. R. Helicobacter pylori: infecção, diagnóstico laboratorial e tratamento. *Percurso Acadêmico*, 6:12, 1-11, 2016.

TREMACOLDI, C. R.; SOUZA FILHO, A. P da S. Toxinas produzidas por fungos fitopatógenos: possibilidades de uso no controle de plantas daninhas. Embrapa Amazônia Oriental-Documentos (INFOTECA-E), 2006.

TRISTÃO, T. C.; CAMPOS-BUZZI, F.; CORRÊA, R.; CRUZ, R. B.; CECHINEL FILHO, V.; CRUZ, A. B. Antimicrobial and cytotoxicity potential of acetamido, amino and nitrochalcones. *Arzneimittelforschung*, *62*: 12, 590-594, 2012.

TSUCHIYA, M.; IMAMURA, L.; PARK, J. B.; KOBASHI, K. Helicobacter pylori urease inhibition by rabeprazole, a proton-pump inhibitor. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 18: 1053. 6. 1995.

VAN DE WATERBEEMD, H.; GIFFORD, E. *A*DMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nature Reviews Drug Discovery*, 2, 192-204, 2003.

VÁSQUEZ-BONILLA, J. N., CABRERA-VEGA, E. J., VÁZQUEZ-OLVERA, J. I., GUTIÉRREZ-NAVA, M. A., HURTADO, M., & BARRANCO-FLORIDO, J. E. Actividad biológica de la micotoxina beauvericina en células cancerosas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, *48*: 4, 17-27, 2017.

WALKER, C.; MACIEL, C. G.; MILANESI, P. M.; MUNIZ, M. F. B.; MEZZONO, R. & POLLET, C. S. Caracterização morfológica, molecular e patogenicidade de *Fusarium acuminatum* e *Fusarium verticillioides* a cordia americana. *Ci. Fl*., 26: 2, 463, 2016.

VALLA, A.; VALLA, B.; CARTIER, D.; GUILLOU, R.; LABIA, R.; FLORENT, L.; CHARNEAU, S.; SCHREVEL, J.; PORTIER, P.; New syntheses and potential antimalarial activities of new retinoid-like chalcones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41,142-146, 2006.

VEBER, D.F.; JOHNSON, S.R.; CHENG, H.Y.; SMITH, B.R.; WARD, K.W.; KOPPLE, K.D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal Medicinal Chemistry, 45*, 2615–2623, 2002.

VERDONK, M. L., COLE, J. C., HARTSHORN, M. J., MURRAY, C. W., & TAYLOR, R. D. Improved protein–ligand docking using GOLD. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 52: 4, 609-623, 2003.

WAHID, S.; JAHANGIR, S.; VERSIANI, M. A.; KHAN, K. M.; SALAR, U.; ASHRAF, M.; FARZAND, U.; WADOOD, A.; KANWAL; REHAMAN, AU; ARSHIA; TAHA, M.; PERVEEN, S. Atenolol thiourea hybrid as potent urease inhibitors: Design, biology-oriented drug synthesis, inhibitory activity screening, and molecular docking studies. *Bioorganic chemistry*, 103359, 2019.

WARREN, J. R.; MARSHALL, B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *The lancet*, 321:8336, 1273-1275, 1983.

WEEKS, D. L.; ESKANDARI, S.; SCOTT, D. R.; SACHS, G. A H^+-gated urea channel; The link between Helicobacter pylori urease and gastric colonization. *Science*, 287: 482-485, 2000.

WHO- World Health Organization. Containing antimicrobial resistance: review of the literature and report of a WHO workshop on the development of global strategy for the containment of antimicrobial resistance. 1999.

XIAO, Z. P; PENG, Z. Y.; DONG, J. J.; DENG, R. C.; WANG, X. D.; OUYANG, H.; YANG, P.; HE, Y.; WANG, Y. F.; ZHU, M.; PENG, X. C.; PENG, W. X.; ZHY, H. L. Synthesis, molecular docking and kinetic properties of b-hydroxy-bphenylpropionyl-hydroxamic acids as Helicobacter pylori urease inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 68: 212-221, 2013.

XIAO, Z. P.; SHI, D.H.; LI, H. Q.; ZHANG, L. N.; XU, C.; ZHU, H. L. Polyphenols based on isoflavones as inhibitors of Helicobacter pylori urease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 3703−3710, 2007.

XIAO, Z. P.; WANG, X. D.; PENG, Z. Y.; HUANG, S.; YANG, P., LI, Q. S.; ZHU, H. L. Molecular docking, kinetics study, and structure–activity relationship analysis of quercetin and its analogous as Helicobacter pylori urease inhibitors. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60: 42, 10572-10577, 2012.

ZHOU, J. T; LI, C. L; TAN, L. H. XU, Y. F; LIU, Y. H.; MO, Z. Z.; DOU, Y. X.; SU, R;. SU, Z. R; HUANG, P.; XIE, J.H. Inhibition of *Helicobacter pylori* and its associated urease by palmatine: investigation on the potential mechanism. *PLoS one*, 12: 1, 2017.

YANG, X. Y., NIU, W. R., LI, R. T., CUI, X. M., LIU, J. K. Two new sesquiterpenes from cultures of the higher fungus Pholiota nameko. *Natural product research*, *33*(14), 1992-1996, 2019.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. *Natural product reports*, 23: 5, 753-771, 2006.

ZHANG, M.; ZHOU, Y. Z.; LI, X. Y.; TANG, Z.; ZHU, H. M.; YANG, Y.; CHHETRI, J. K. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in elderly people in the Beijing region, China. *World journal of gastroenterology: WJG*, *20*: 13, 3635, 2014.

ZHANG, Y.; LIU, Z.; NG, T. B.; CHEN, Z.; QIAO, W.; LIU, F. Purification and characterization of a novel antitumor with antioxidante and deoxyribonuclease activity from edible mushroom *Pholiota nameko*. *Biochimie*, 99, 28-37, 2014.

ZIEMSKA, J.; SOLECKA, J.; JAROŃCZYK, M. In Silico Screening for Novel Leucine Aminopeptidase Inhibitors with 3, 4-Dihydroisoquinoline Scaffold. *Molecules*, 25: 7, 1753, 2020.