

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA – PPGQB

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E DA INIBIÇÃO DE UREASES: ESTUDOS
BIOFÍSICOS DE INTERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS
ANALÍTICAS**

MARIA CÉLIA TAVARES

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martin

57072-970 - Maceió - AL

MARIA CÉLIA TAVARES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E DA INIBIÇÃO DE UREASES: ESTUDOS
BIOFÍSICOS DE INTERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS
ANALÍTICAS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas
Santos

Maceió – AL

2022

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

T231a Tavares, Maria Célia.
Avaliação da atividade e da inibição de ureases: estudos biofísicos de interação e desenvolvimento de metodologias analíticas / Maria Célia Tavares. – 2022.
172 f. : il. color.

Orientador: Josué Carinhanha Caldas Santos.
Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 145-167.
Anexos: f. 168-172.

1. Urease. 2. Inibidores de urease. 3. Urease – Interação. I. Título.

CDU: 54



Ata da sessão referente à defesa intitulada "Avaliação da atividade e da inibição de ureases: estudos biofísicos de interação e desenvolvimento de metodologias analíticas". Área de concentração: Química Analítica e linha de pesquisa: Química biológica e medicinal e Química analítica e ambiental pela discente MARIA CÉLIA TAVARES sob orientação do Prof. Dr. JOSUÉ CARINHANHA CALDAS SANTOS.

No décimo nono dia do mês de dezembro do ano de 2022, às 14 h, por meio de videoconferência, reuniu-se a Banca Examinadora em epígrafe, aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação. Tendo o orientador declarado aberta a sessão, mediante o prévio exame do referido trabalho por parte de cada membro da Banca, a discente procedeu a apresentação de seu Trabalho de Conclusão de Curso de Pós-graduação *stricto sensu* durante 30 min e foi submetido à arguição on-line pela Banca Examinadora por 4:10 h que, em seguida, deliberou sobre o seguinte resultado: APROVADA.

Nada mais havendo a tratar, o orientador declarou encerrada a sessão de Defesa, sendo a presente Ata lavrada e assinada pelos senhores membros da Banca Examinadora e pelo discente, atestando ciência do que nela consta.

Comissão Examinadora:

Dr. EMANUEL CARRILHO

Examinador(a) Externo(a) à Instituição

Documento assinado digitalmente
gov.br RODOLFO DE MELO MAGALHAES SANTANA
Data: 03/01/2023 11:31:02-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. RODOLFO DE MELO MAGALHÃES SANTANA, UFBA

Examinador(a) Externo(a) à Instituição

Documento assinado digitalmente
gov.br SILVIO DO DESTERRO CUNHA
Data: 03/01/2023 12:34:29-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. SÍLVIO DO DESTERRO CUNHA

Examinador(a) Externo(a) à Instituição

Documento assinado digitalmente
gov.br MARILIA OLIVEIRA FONSECA GOULART
Data: 03/01/2023 13:00:24-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dra. MARILIA OLIVEIRA FONSECA GOULART, UFAL

Examinador(a) Interno(a)

Documento assinado digitalmente
gov.br JOSUE CARINHANHA CALDAS SANTOS
Data: 03/01/2023 13:32:23-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. JOSUE CARINHANHA CALDAS SANTOS, UFAL

Presidente

MARIA CÉLIA TAVARES

Doutorando

Documento assinado digitalmente
gov.br MARIA CELIA TAVARES
Data: 05/01/2023 00:58:37-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>



USPAssina - Autenticação digital de documentos da USP

Registro de assinatura(s) eletrônica(s)

Este documento foi assinado de forma eletrônica pelos seguintes participantes e sua autenticidade pode ser verificada através do código WYYE-L38Y-JER2-ZCBN no seguinte link: <https://portalservicos.usp.br/iddigital/WYYE-L38Y-JER2-ZCBN>

Emanuel Carrilho

Nº USP: 61019

Data: 21/12/2022 14:20

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por me proporcionar viver essa experiência tão rica e encerrar esse ciclo com o sentimento de realização.

Aos meus familiares, pela compreensão e suporte, principalmente à Vanessa que sempre esteve disposta a cuidar dos detalhes, inclusive para quando eu chegasse cansada de Maceió, encontrar a casa aconchegante e uma comidinha afetuosa. Muito obrigada!

Gratidão ao Clewerton, por sempre estar disposto a ajudar e viver comigo cada detalhe do processo ao longo dos últimos 3 anos. Sempre amoroso, compreensivo e companheiro, desde a ouvir as minhas explicações dos experimentos, fazer viagens para Maceió ou acompanhar o GPS, passar a noite comigo no laboratório, ajudar a cortar florzinhas, entre tantas outras coisas. Obrigada por me motivar a seguir quando tudo não estava tão bem, quando os experimentos davam errado, por cuidar de cada detalhe ao longo desse processo. Você é incrível!

Ao meu orientador, que com certeza deve ter umas “cadeirinhas no céu” por tanta paciência e compreensão. Gratidão por compartilhar um pouco da sua inteligência, por ser focado, humilde e humano, disposto a ouvir, orientar e muitas vezes acreditar em mim muito mais que eu. Por todas as vezes que me motivou, deu bronca e até disse que eu era um passarinho e tinha que voar, me deixando livre para propor detalhes do trabalho, expressar meus anseios científicos e me ajudar a concretizá-los. Obrigada de coração! Foi uma experiência ímpar!

A todos os colegas do laboratório LINQA, que direta ou indiretamente contribuíram com esse trabalho: Aryanna, Wood, Mayara, Janaína, Karlly, Karine, Carla, Amanda, Alef, Fátima, Camila, Reginaldo, Karol, Alessandra, Emerson, Amidou e Francisco. Especialmente à Marina e à Dayane, que me auxiliaram no início dos experimentos de interação. Ao Ari, pelas conversas científicas e pelo apoio com os meus experimentos (UV-vis, FT IR, cinética enzimática e outros), conversas e por quase sempre me prestar socorros mecânicos e de saúde. À Thamilla pelos trabalhos em parceria, pelo ENQA, pela dupla na chefia, pelas conversas científicas e pessoais, por me acolher em sua casa, por todo carinho e compreensão. Ao Jaelson, por ter me acompanhado durante o estágio na UFG, por estar sempre disposto a ajudar durante o ano da chefia, por prestar os socorros quando solicitado e por contar inúmeras piadas sem graça, mas que sempre funcionavam para tirar o tédio.

Ao Professor Wendell, pelo suporte e acolhimento durante o estágio em seu laboratório (GME – UFG) e pela disponibilidade e parceria mesmo depois do estágio. Aos colegas do Laboratório GME da UFG: Lucas Rodrigues, Lucas Duarte, Habdias, Dany, Nikaely, Cyro, Fabrício,

Gerson, Kariolanda, Kemilly, Bárbara, Karine e Técnicos da UFG. Especialmente à Karoliny Almeida, um presente maravilhoso que Deus me deu durante o estágio. Muito obrigada por todo acompanhamento durante o meu estágio, pelas contribuições científicas e pessoais e por estar sempre disposta a ajudar.

Sou muito grata a Deus pela vida da minha amiga Carol Fradique, que desde o processo de seleção esteve ao meu lado, como um anjo, me mostrando caminhos e possibilidades. Por me ouvir, orientar e estudar comigo, por ser mais que uma amiga.

Gratidão à Larissa por me acolher sempre com amor e me enturmar no LPQNR onde eu usava a balança analítica no início do doutorado e acabei fazendo amizades e me sentindo acolhida pelas pessoas que encontrava por lá (Vanderson, Luciara, Isis, Jéssica e Igor), e aproveitando para tomar um cafezinho.

Agradeço ao apoio das minhas amigas Bruna e Késia durante todo o processo.

Obrigada Ingrid e Bruna Kélvia por todo apoio.

À Silvana por todo apoio e inspiração em ser uma mulher forte, competente e destemida.

Ao Clebson *in memoriam* por todo carinho, admiração, oportunidade de crescimento pessoal e profissional. Por ter acreditado no meu potencial quando nem mesmo eu sabia que era tão capaz.

Ao mesmo tempo que te agradeço, te dedico esta tese.

À Professora Marília por disponibilizar equipamentos em seu laboratório.

À Jadriane, por ser tão amorosa e acolhedora. Por doar fluorescamina, ajudar com o uso da microplaca, por se preocupar comigo, me trazendo lanchinho enquanto aguardava análises, pelas conversas, carinho e empatia. Muito obrigada!

Ao Professor Vinicius e ao Adeildo por terem permitido que eu usasse o Laboratório de Eletrocatalise e a Central Analítica na UFAL Arapiraca para que eu pudesse fazer meus experimentos durante o último ano do doutorado. Obrigada pelos reagentes, equipamentos, espaço, paciência e conversas científicas.

Aos professores do PPGQB, principalmente aos que tive a oportunidade de ser aluna nas disciplinas da pós e aos membros da banca de acompanhamento que contribuíram com o trabalho.

Às pessoas que fazem parte da secretaria do PPGQB.

Às professoras Daniela, Ana Catarina, Isis e Cyntia pelas contribuições científicas e pessoais.

À professor Cyntia por disponibilizar o microscópio de bancada e o seu tempo para me auxiliar nas análises.

Aos meus colegas do IFAL: Magno, Maria José, Kerol, Talita, Luam, Daniele, Luana, Cosme, João Batista, Jucelane, Filipe, Phelipe, Serafim, Susan, Walkiria, Eliaquim, Átila, Tarcísio,

Patrícia e Lorena por todo apoio. Especialmente à Rosangela, ao Junior, ao Wilton, à Petra, à Carla, e à Deysiane pelas conversas, motivação, apoio, paciência e compreensão. Eu sou muito grata a Deus por todos vocês!

Ao IFAL Campus Batalha por todo auxílio durante o doutorado e processo de afastamento.

Ao Instituto Federal de Alagoas (IFAL) pela oportunidade de afastamento durante os últimos 8 meses do doutorado, tornando mais leve a finalização dos experimentos e escrita.

À UFAL por toda infraestrutura!

Ao Professor Ângelo de Fátima da UFMG e seu grupo de pesquisa por toda a colaboração, especialmente à Prof.^a Luzia, Breno e Thamara. Ao Wellington e Taniris, pessoas que admiro e que se tornaram grandes amigos.

Aos professores da UFC (Conceição, Jair e Geraldo) pela parceria com o trabalho do MFC.

Às agências de fomento, pelos projetos aprovados que permitiram financiar essa pesquisa (CAPES, CNPq, FINEP e FAPEAL).

À FAPEAL pela bolsa concedida.

À Royal Society of Chemistry pelo prêmio Jovem Pesquisador durante a Reunião Anual da SQB 2022, que me possibilitou divulgar o meu trabalho a nível nacional e internacional.

À banca de qualificação e de defesa pelas contribuições.

A todos os meus alunos e alunas que sempre demonstraram admiração e fizeram valer a pena todo o meu esforço para conciliar o trabalho com o doutorado. Muito obrigada pelo carinho de vocês, momentos de partilha e crescimento mútuo.

RESUMO

A urease catalisa a hidrólise da ureia em $\text{NH}_3(\text{g})$ e $\text{CO}_2(\text{g})$, e está associada a problemas na agricultura como redução da eficiência do fertilizante ureia, e na saúde, pois proporciona um microambiente favorável à colonização do estômago humano pela bactéria *H. pylori*. Logo, é importante inibir e determinar a atividade da urease em diferentes matrizes. Assim, esse trabalho tem como objetivo principal avaliar o mecanismo de inibição da urease por compostos orgânicos (naturais e sintéticos) empregando estudos biofísicos, bem como desenvolver metodologias para a determinar a atividade das ureases de solos e saliva (sintética e humana), além de avaliar potenciais inibidores. Para o trabalho de interação da urease com isotiocianato natural (MFC) foi obtido $\text{IC}_{50} = 487 \mu\text{M}$ e classificação de inibidor misto pelo ensaio de cinética clássica e de fluorescência sincronizada. Estudos espectroscópicos indicaram alterações conformacionais da enzima decorrentes da interação MFC-urease, com constante de ligação (K_b) igual a $1,80 \times 10^2 \text{ L mol}^{-1}$ e estequiometria 1:1. Além disso, foi comprovado a formação de ditiocarbamatos e tioureias correspondentes após a reação do MFC com aminoácidos contendo grupos tiol e amina/guanidina. Assim, o mecanismo de inibição da urease pelo MFC ocorreu por meio de interações covalentes e não-covalentes. O MFC foi mais efetivo na microbiota do solo do que *in vitro*, com inibição equivalente ao NBPT para os solos avaliados. Para a interação da urease com cinco benzoiltioureias, foi constatado relação direta com o tamanho da cadeia do substituinte *N*-alquílica com os valores de IC_{50} (μM) e K_b . Verificou-se que a **BTU1** foi o composto mais ativo e, por isso, selecionada para estudos biofísico e em solos com a urease. Para o complexo **BTU1**-urease, K_b foi na ordem de 10^3 L mol^{-1} nas diferentes temperaturas avaliadas; baseado nos estudos termodinâmicos a estabilização do complexo urease-**BTU1** é preferencialmente por ligações de hidrogênio e forças de van der Waals. Os estudos de fluorescência sincronizada e ensaio de competição indicaram comportamento clássico de inibidor misto para **BTU1**. Nos diferentes solos avaliados, **BTU1** apresentou potencial de inibição equivalente ao NBPT ressaltando a importância de ensaios *in vitro* e aplicação em amostra real para a seleção de um potencial inibidor. Além disso, foram desenvolvidos dois dispositivos analíticos em papel (UrePAD e Multicolor PAD) para determinar a atividade da urease em solos, saliva e na avaliação de inibidores. O UrePAD é baseado na mudança de cor do indicador ácido-base vermelho de fenol, em função do aumento do pH pela hidrólise da ureia pela urease. O Multicolor PAD também é um dispositivo colorimétrico, no qual foram avaliados cinco indicadores ácido-base (vermelho de fenol, azul de bromotimol, roxo de bromocresol, roxo de *m*-cresol e vermelho neutro) e papel com superfície modificada por polieletrólito poli-4-estireno sulfonato de sódio ou polivinilpirrolidona. As imagens obtidas foram digitalizadas em um *scanner* de bancada, e a análise realizada no *software* Corel Draw X8. Os métodos apresentaram LOD médio de $0,10 \text{ U mL}^{-1}$ com linearidade entre $0,25$ e $4,0 \text{ U mL}^{-1}$. Ambos os dispositivos foram aplicados na determinação da atividade da urease em quatro amostras de solos com diferentes características e avaliação *in vitro* de inibidores clássicos. Os resultados obtidos não diferiram estatisticamente (95% de confiança) do método de referência do azul de indofenol, tendo como vantagens o baixo custo, reduzido volume dos reagentes/amostra aliado à simplicidade e portabilidade, mostrando a capacidade de simplificar a determinação da atividade da urease em solos e a avaliação de potenciais inibidores. Por fim, o Multicolor PAD foi aplicado para determinar urease em amostra de saliva sintética e saliva humana, com recuperações quantitativas (ente 80 – 120%) e apresentou maior variação de intensidade de cor para amostra de saliva humana de indivíduo infectado por *H. pylori*, indicando que é possível utilizar um método simples, rápido e de baixo custo para auxiliar no diagnóstico de infecção de bactérias ureolíticas como *H. pylori*.

Palavras-chave: urease, benzilisotiocianato, benzoiltioureias, interação, colorimetria, UrePAD, Multicolor PAD, indofenol.

ABSTRACT

Urease catalyzes the hydrolysis of urea in $\text{NH}_3(\text{g})$ and $\text{CO}_2(\text{g})$; it is associated with problems in agriculture, such as reduced efficiency of urea fertilizer, and health, because it provides a microenvironment favorable to the colonization of the human stomach by *H. pylori* bacteria. Therefore, inhibiting and determining urease activity in different matrices is important. Thus, the main objective is to evaluate the mechanism of urease inhibition by organic compounds (natural and synthetic) using biophysical studies, as well as the development of methodologies to determine the activity of ureases in soils and saliva (synthetic and human), in addition to evaluating potential inhibitors. For the interaction between urease and natural isothiocyanate (MFC), an $\text{IC}_{50} = 487 \mu\text{M}$ was obtained, and the compound was classified as a mixed inhibitor. The synchronized fluorescence assays corroborated the nature of the inhibition process. Spectroscopic studies indicated conformational changes in the enzyme resulting from the MFC-urease interaction, with a binding constant (K_b) equal to $1.80 \times 10^2 \text{ L mol}^{-1}$ and stoichiometry 1: 1. In addition, the formation of the corresponding dithiocarbamates and thioureas has been proven after the reaction of the MFC with amino acids containing thiol and amine/guanidine groups. Thus, the urease's inhibition mechanism by MFC occurred through covalent and non-covalent interactions. MFC was more effective in soil microbiota than in vitro, with inhibition equivalent to NBPT for the two soils evaluated. For the interaction of urease with five benzoylthioureas, a direct relationship was found with the size of the N-alkyl substituent with the IC_{50} (μM) and K_b values. It was found that **BTU1** was the most active and, therefore, selected for biophysical studies in soils with urease. For the **BTU1**-urease complex, K_b was on the order of 10^3 L mol^{-1} at the different temperatures evaluated; based on thermodynamic studies, the preferred forces for stabilizing the supramolecular complex were hydrogen bonds and van der Waal forces. Synchronized fluorescence and competition assay studies indicate that **BTU1** probably has classic mixed inhibitor behavior. In the different soils evaluated, **BTU1** showed an inhibition potential equivalent to NBPT, emphasizing the importance of in vitro assays and application in a real sample for selecting a potential inhibitor. Two analytical paper devices (UrePAD and Multicolor PAD) were developed to determine urease activity in soils, saliva, and in the absence/presence of inhibitors. UrePAD is based on the color change of the acid-base indicator phenol red, exploring the change in pH due to the hydrolysis of urea by urease. The Multicolor PAD is also a colorimetric device employing five acid-base indicators (phenol red, bromothymol blue, bromocresol purple, *m*-cresol purple, and neutral red) and surface-modified polyelectrolyte poly-4-styrene sulfonate paper, sodium or polyvinylpyrrolidone. The images obtained were digitalized in a bench scanner, and the analysis was performed in the Corel Draw X8 software. The methods showed a mean LOD of 0.10 U mL^{-1} with linearity between 0.25 and 4.0 U mL^{-1} . Both devices were applied to determine urease activity in four soil samples with different characteristics and in vitro evaluation of classic inhibitors. The results obtained did not differ statistically (95% confidence) from the reference method of indophenol blue, having as advantages the low cost, reduced volume of reagents/sample combined with simplicity and portability, showing the ability to simplify the determination of the activity of the urease in soils and the evaluation of potential inhibitors. Finally, the Multicolor PAD was applied to determine urease in a sample of synthetic and human saliva, with quantitative recoveries (between 80 - 120%) and to show a more significant variation in color intensity for a human saliva sample from an individual infected with *H. pylori*. Thus, it is possible to use a simple, fast, low-cost method to diagnose infection by ureolytic bacteria such as *H. pylori*.

Keywords: urease, benzylisothiocyanate, benzoylthiourea, interaction, colorimetry, UrePAD, Multicolor PAD, Indophenol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação de hidrólise da ureia na presença da urease	22
Figura 2 - Mecanismo de hidrólise da ureia catalisada por ureases. Enumeração correspondente aos resíduos de urease <i>Sporosarcina pasteurii</i>	22
Figura 3 - Comparação estrutural das ureases de (A) heterotrímero (α , β e γ) de <i>Sporosarcina pasteurii</i> (PDB ID 4CEX); (B) heterodímero (α , β) de <i>Helicobacter pylori</i> (PDB ID 1E9Z); e (C) homo-hexâmeros de subunidades α de <i>Canavalia ensiformis</i> (PDB ID 3LA4).	23
Figura 4 - Aplicação de ureia em solos (A) sem inibidor e (B) com inibidor.	25
Figura 5 – Colonização do estômago humano pela <i>H. pylori</i>	27
Figura 6 – Inibição reversível para inibidor competitivo, incompetitivo e misto (não-competitivo). Legenda: E = enzima, S = substrato, I = inibidor, P = produto. ES, EI e ESI são os complexos enzima-substrato, enzima-inibidor e enzima-substrato-inibidor, respectivamente.	30
Figura 7 - Principais classes de compostos orgânicos empregados como inibidores de urease	31
Figura 8 - Estrutura do 4-(4'-O-acetil- α -L-ramnose oxi) benzilisotiocianato (MFC).	34
Figura 9 – Estrutura química das benzoiltioureas avaliadas na interação com urease.	36
Figura 10 – Representação de interação macromolécula – ligante com (A) formação de complexo supramolecular por interações não-covalentes; (B) formação de aduto por ligação covalente.	37
Figura 11 - Mecanismo da reação de Berthelot modificada, em que NH_3 reage com salicilato na presença de nitroprussiato sob condições alcalinas para formar 2-2dicarboxil-indofenol. .	41
Figura 12 – Etapas de elaboração do dispositivo: (A) <i>layout</i> , (B) impressão à cera, (C) formação da barreira hidrofóbica usando estufa (D) Dispositivo após utilização e pronto para análise, (E) aquisição da imagem por scanner de bancada e (F) aquisição da intensidade de cor no canal CMYK.	54
Figura 13 – (A) Procedimento para extração das ureases dos solos; (B) Protocolo de aplicação do UrePAD; (C) Método espectrofotométrico do indofenol.	57
Figura 14 – Etapas de elaboração do dispositivo: (A) <i>layout</i> desenhado em Silhouette Studio, (B) corte do papel adesivo em Silhouette Cameo 4, (C) montagem, (D) adição dos reagentes, (E) dispositivo após adição dos reagentes e enzima, (F) obtenção das imagens com scanner e análise.	58
Figura 15 – (A) Perfil da inibição da atividade da urease com aumento da concentração de MFC, (B) Hipérbole de Michaelis-Menten e (C) Gráfico tipo Lineweaver-Burk para Jack bean	

urease em diferentes concentrações de ureia e de MFC. Condições: urease 12 mU, tampão fosfato pH 7,4.	63
Figura 16 – (A) Titulação espectrofluorimétrica da urease (5 μ M) com MFC (0 - 200 μ M); (B) Linearização da equação de Stern-Volmer; (C) Gráfico do duplo logaritmo obter constante de ligação (K_b) e número de sítios de ligação (n). Condições: tampão fosfato 20 mM; pH 7,4 a 30°C.	65
Figura 17 – Espectros obtidos para a titulação da urease com MFC empregando fluorescência sincronizada para o resíduo de A) Tir e B) Trp com adição de MFC (0 - 200 μ M). Condições: Urease (5 μ M), tampão fosfato 20 mM, pH 7,4 a 30°C.	66
Figura 18 – Espectros de absorbância molecular para os sistemas Ni(II), MFC e Ni(II): (1:1). Condições: tampão fosfato 20 mM, pH 7,4 a 30°C.	67
Figura 19 – Espectro de absorção molecular no UV para os sistemas (A) MFC (100 μ M) e Cis (60 μ M) livres, MFC + Cis; (B) MFC (3 μ M) e urease (3 μ M) livres, MFC + urease. Condições: tampão fosfato 20 mM, pH 7,4 a 30°C.	69
Figura 20 - Reação geral do ensaio de Ellman entre 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico ácido (DTNB) e um grupo tiol livre. Os produtos da reação são um dissulfito misto e um ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) de cor amarela com absorção máxima em 412 nm.	70
Figura 21 – Absorbâncias em 412 nm: (A) AMP; (B) Cis e (C) Urease. (1) = DTNB (50 μ M); (2) = R-SH (50 μ M de AMP ou Cis e 5 μ M de urease) + DTNB; (3, 4 e 5) = R-SH + MFC (50 μ M, 100 e 200 μ M, respectivamente). Condições: tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, 30°C.	70
Figura 22 – (A) Avaliação cinética (0-120 min) para urease (5 μ M) + MFC (200 μ M) na região UV.	72
Figura 23 – Espectros de absorção molecular no UV-vis na presença da fluorescamina para os sistemas contendo MFC e fontes de grupo amina (A) Arg (B) Lis e (C) urease. Condições: MFC e FRC a 100 μ M; Lis, Arg a 60 μ M; Urease 3 μ M; tampão fosfato 20 mM; pH 7,4 a 30 °C. A sonda foi adicionada após 30 min de incubação da Lis, Arg ou urease com MFC.	73
Figura 24 - Reação da fluorescamina com grupo amino, formando um produto fluorescente. A quantidade de fluoróforo gerada se correlaciona com a quantidade de grupo amino disponível e pode ser medida espectrofluorimetricamente. Quanto menos grupos RNH ₂ livres, menor o sinal do fluoróforo, indicando que RNH ₂ reagiu com MFC.	73
Figura 25 – Fluorescência molecular dos sistemas (A) Arg, (B) Lis e (C) urease na presença da sonda FRC e diferentes concentrações de MFC (60, 120 e 240 μ M para Arg e Lis e 2, 4 e 8	

<p>μM para urease). Condições: Lis e Arg (60 μM); Sonda (100 μM) em todos os sistemas; tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4 a 30 °C, $\lambda_{\text{ex}} = 385 \text{ nm}$; <i>slit</i> 3×5 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$).</p>	74
<p>Figura 26 – Fluorescência molecular dos sistemas (A) Gli, (B) 2-metilbutilamina na presença da sonda FRC e MFC. Condições: (A), (B) e MFC (40 μM); FRC (100 μM) em todos os sistemas; tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4 a 30 °C, $\lambda_{\text{ex}} = 385 \text{ nm}$; <i>slit</i> 3×5 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$).</p>	74
<p>Figura 27 – Espectros de massas para (A) MFC livre – aduto de sódio, e dos aminoácidos livres (B) cisteína, (C) lisina e (D) arginina.</p>	76
<p>Figura 28 – Espectros de massas obtidos por ESI(-)-MS para os sistemas (A) MFC:Cis, (B) MFC:Lis e (C) MFC:Arg na proporção (1:1), e fragmentação dos íons moleculares m/z (D) 473,11; (E) 498,19 e (F) 526,20.</p>	77
<p>Figura 29 – Adutos formados pela reação entre o grupo isotiocianato do MFC + tiol, amina/guanidina dos resíduos de Cis, Lis e Arg, formando ditiocarbamato e tioureas, respectivamente; e representação genérica dos adutos na estrutura da urease.</p>	78
<p>Figura 30 - Esquema do mecanismo químico proposto para inibição da urease pelo MFC. A) A urease livre com flap fechado e sítio catalítico livre para hidrólise da ureia; B) presença do MFC na região do flap aberto para inicialização da reação; C) Formação do aduto ditiocarbamato entre MFC e Cis592 reduzindo a mobilidade do flap e bloqueando o sítio ativo.</p>	79
<p>Figura 31 - Reação entre MFC e resíduo de Arg609 próximo ao sítio ativo. A) Aproximação do inibidor; B) Formação do aduto tiourea pela reação entre MFC e grupo -RNH₂ presente na arginina reduzindo a atividade da urease.....</p>	80
<p>Figura 32 - Proposta de mecanismo para inibição da urease pelo MFC com resíduo de lisina no sítio alostérico. A) Aproximação do ligante no sítio alostérico; B) Formação do aduto tiourea pela reação entre o MFC e o grupo -RNH₂ presente em Lis469 e reduzindo a atividade da urease.</p>	81
<p>Figura 33 - Inibição de ureases no solo na presença de inibidores clássicos e do MFC. Condições: 4 g de solo incubado com ureia (200 μL de 80 mM ureia) em tampão acetato de sódio, pH 5,5, na presença ou ausência de 0,5 mM de inibidor: Tiourea (TU), hidroxitiourea (HU), (NBPT) e MFC.....</p>	82
<p>Figura 34 – Determinação do IC₅₀ empregando Jack bean urease (A) e as BTUs (B-F). Condições: ureia 8 mM; urease 12 mU, tampão fosfato de sódio 20 mM contendo EtOH 10% (v/v), pH 7,4 a 30 °C. O valor de IC₅₀ para BTU5 obtido por extrapolação (Gráfico F).....</p>	84

Figura 35 – Relação entre $\log K_b$ e (A) IC_{50} e (B) número de carbono no grupo R. Condições: tampão fosfato de sódio 20 mM contendo EtOH 10% (v/v), pH $7,4 \pm 0,1$ a $30^\circ C$	85
Figura 36 - Interações de BTU1 (A), BTU2 (B), BTU3 (C), BTU4 (D) e BTU5 (E) com íons Ni de resíduos de Jack bean urease. A conformação de ligação dos ligantes é mostrada na representação em bastão e os dois íons Ni são representados por esferas verdes. A coordenação com Ni e as ligações de hidrogênio são mostradas como linhas pontilhadas.....	86
Figura 37 - Complexos de BTU1 nos sítios ativos (A) e alostérico (B) da Jack bean urease previstos por simulações de MD. (C) A conformação de ligação e interações mais representativas de BTU1 no sítio alostérico. O ligante é mostrado na representação em bastão. As ligações de hidrogênio e a interação π -alquílica são mostradas como linhas pontilhadas..	88
Figura 38 - (A) Hipérbole de Michaelis-Menten e (B) linearização de Lineweaver-Burk para Jack bean urease em diferentes concentrações de ureia e BTU1 . Condições: urease 12 mU, tampão fosfato 20 mM, pH 7,4.....	90
Figura 39 – (A) Perfil espectral da titulação espectrofluorimétrica da urease ($2 \mu M$) com BTU1 (B) Linearização da equação de Stern-Volmer; (C) Linearização para o cálculo de K_b e número de sítios de ligação (n). Condições: tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 a $30^\circ C$	92
Figura 40 – Espectros de absorção molecular no UV para os sistemas: urease ($5 \mu M$), BTU1 ($10 \mu M$), e urease + BTU1 (1:1). Condições: tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 e $30^\circ C$	94
Figura 41 - Espectros de absorção de UV de urease ($1 \mu M$) na presença de BTU 1 ($0,5 - 2 \mu M$). O espectro do complexo foi obtido subtraindo: [espectro complexo - espectro BTU1]. Condições: tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4 a $30^\circ C$	95
Figura 42 – Espectros de fluorescência tridimensional (3D) para (A) urease livre ($2 \mu M$) e (B) urease + BTU1 ($50 \mu M$). Condições: tampão fosfato de sódio 20 mM, pH $7,4 \pm 0,1$ a $30^\circ C$	96
Figura 43 – Titulação empregando fluorescência sincronizada para os resíduos de (A) Tir e (B) Trp com adição de BTU1 (0 - $100 \mu M$). Condições: urease ($2 \mu M$), tampão fosfato 20 mM pH 7,4 a $30^\circ C$	97
Figura 44 – Espectros de absorbância molecular para os sistemas: Ni(II) ($10 \mu M$); BTU1 ($10 \mu M$) e Ni(II): BTU1 (1:1). Condições: tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 a $38^\circ C$	98
Figura 45 – Sobreposição espectral da emissão de fluorescência da urease e absorção da BTU1 em (A) $5 \mu M$ e (B) $10 \mu M$. Condições: urease ($5 \mu M$), tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 e $30^\circ C$	100

Figura 46 – Inibição de ureases no solo por 0,5 mM de BTU1 e NBPT. Condições: 4 g de solo incubado com ureia (200 µL de 80 mM ureia) em tampão acetato de sódio, pH 5,5.....	102
Figura 47 – Reação de (A) hidrólise da ureia e (B) desprotonação do indicador vermelho de fenol.....	104
Figura 48 – Relação entre a sensibilidade analítica e (A) ordem de adição das soluções; (B) volume da solução; (C) tempo de análise; (D) concentração de vermelho de fenol; (E) concentração hidrogeniônica inicial; (F) tipo de tampão; (G) concentração de tampão de fosfato de sódio e (H) concentração de ureia.....	105
Figura 49 – Efeito da ordem de adição dos reagentes, em que a ordem A: indicador → urease → ureia é observada nas colunas 1 e 2, enquanto a ordem F: ureia → urease → indicador é observada nas colunas 3 e 4. Nas linhas do dispositivo (A – I) há um aumento da concentração da urease.	106
Figura 50 – (A) Ensaio de robustez para 20±1 min; (B) Sensibilidade normalizada para 20±1 min.	107
Figura 51 – (A) Ensaio de robustez para pH = 6,5, 6,6 e 6,7; (B) Sensibilidade normalizada para os valores de pH avaliados.	109
Figura 52 – (A) UrePAD com alterações cromáticas correspondentes à variação da concentração de urease até a saturação; (B) Intervalo linear de resposta de intensidade de cor (CI) em função da concentração de urease (C_{ure}) (n = 6).	111
Figura 53 – (A) UrePAD usado no ensaio de inibição com HU, onde na linha A está o branco analítico (ausência da urease); na linha B está a referência (sem inibidor = 100% atividade da enzima) e a partir de C até I há aumento na concentração do inibidor. Determinação do IC_{50} por intersecção dos eixos em 50% da atividade enzimática em função da concentração do inibidor: (B) NBPT; (C) $CuSO_4$; (D) Tioureia; (E) Hidroxiureia; (F) Ácido bórico(G) NaF; (H) Cisteamina; (I) (–) ácido úsnico.	116
Figura 54 – Avaliação do volume do indicador para delimitar a zona de detecção do Multicolor PAD. Condições: concentração do indicador = 1 mM, tampão fosfato de sódio 0,5 mM, pH = 6,0.	118
Figura 55 – Sensibilidade analítica normalizada para a avaliação do melhor canal de cor para cada indicador. Condições: Urease 0 – 4 U mL ⁻¹ , Ureia 20 mM, Indicador = 1 mM, tampão fosfato de sódio 0,5 mM, pH = 6,0.....	120
Figura 56 – Sensibilidade analítica normalizada para avaliação do pH inicial de cada indicador. Condições: Urease 0 – 4 U mL ⁻¹ , Ureia 20 mM, Indicador = 1 mM, tampão fosfato de sódio ou acetato de sódio 0,5 mM.....	121

Figura 57 – Desprotonação dos indicadores ácido-base (PR, BTB, BCP, mCP, NR) após hidrólise da ureia, resultando em mudança de cor do indicador.	122
Figura 58 – (A) Sensibilidade normalizada para avaliação do substrato de papel (P1 = filtro qualitativo grade 1, P2 = CHR N° 1, P3 = CHR 3MM). Condições: Urease 0 – 4 U mL ⁻¹ , Ureia 20 mM, Indicador = 1 mM, tampão fosfato de sódio 0,5 mM, pH = 6,5 ou tampão acetato de sódio 0,5 mM, pH 5,5. (B) Imagens comparativa entre o sistema na ausência (branco) e na presença da urease (3 U mL ⁻¹) para os papeis P1, P2 e P3 empregando os indicadores ácido base.	124
Figura 59 – (A) Sensibilidade normaliza para avaliação da concentração do substrato ureia com as respectivas representações de mudança de cor (B) empregando urease 3 U mL ⁻¹); (C) sensibilidade normaliza para avaliação da concentração do indicador com as respectivas representações de mudança de cor (D) empregando urease 3 U mL ⁻¹).	126
Figura 60 – Espectros de ATR- FTIR para o papel CHR 3MM não modificado (branco) e o papel na presença dos modificadores (PVP 10% (m/v), PSS 10% (v/v), CHI 4 mg mL ⁻¹ , TEOS 80% (v/v)).	128
Figura 61 – Valores de sensibilidade para os diferentes modificadores (A): PSS 1, 5 e 10 % (v/v); (B): PVP (1, 2 e 10 % (m/v)); (C): CHI 1, 2 e 4 mg mL ⁻¹ ; (D): TEOS 20, 50 e 80% (v/v). Condições: urease 0 – 4 U mL ⁻¹ . ureia 80 mM, indicador = 2 mM.	129
Figura 62 - Intensidade de cor normalizada em função do tempo para os indicadores (A) PR, (B) BTB, (C) BCP, (D) mCP (E) NR empregando o papel não modificado (SNM), com PSS 5% (v/v) ou PVP 2% (m/v), urease 3 U mL ⁻¹ , ureia 80 mM, indicador = 2 mM.	131
Figura 63 - Comparação da intensidade de cor para o sistema urease 3 U mL ⁻¹ empregando papel na ausência e na presença do modificador (PSS 5% (v/v) ou PVP 2 % (m/v) em diferentes intervalos de tempo, com e sem tratamento da imagem pelo programa Corel Photo-Paint. Condições: indicador PR 2mM, ureia 80 mM, tampão fosfato de sódio 0,5 mM pH = 6,5...	132
Figura 64 – (A) Imagens obtidas para as curvas analíticas empregando o Multicolor PAD; (B e C) Curvas analíticas para os indicadores ácido-base (PR, BTB, BCP, mCP e NR); (D – E) Ajuste linear para todos os sistemas. Condições: Urease 0-6 U mL ⁻¹ ; indicadores (2 mM) PR, BTB, mCP e NR preparados em tampão fosfato de sódio 0,5 mM pH = 6,5 ou tampão acetato de sódio 0,5 mM pH = 5,5 para BCP; ureia 80 mM.	133
Figura 65 – Imagens obtidas para o sistema na ausência de extrato de ureases de solos (branco) e na presença de ureases de solos (S1, S2, S3 e S4). Condições: Ureia 80 mM, indicador 2 mM, tampão acetato de sódio pH 5,5.	136

Figura 66 - Determinação do IC₅₀ por intersecção dos eixos em 50% da atividade enzimática em função da concentração do inibidor: (A) NBPT; (B) ácido acetohidroxâmico (AHA), (C) hidroxureia (HU) e (D) tioureia (TU). A imagem abaixo do gráfico é do multicolor PAD utilizado para o referido inibidor em concentrações crescentes..... 137

Figura 67 – Variação de intensidade de cor para o Multicolor PAD (A) PR, (B) BTB, (C) mCP e (D) NR para as amostras de saliva de pacientes *H. pylori* positivo (HP+) e *H. pylori* negativo (HP-). Condições: ureia 80 mM, indicador 2 mM, diluição em tampão fosfato de sódio 0,5 mM pH 6,5. 141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais informações, vantagens e limitações relacionadas às técnicas utilizadas neste trabalho para avaliação da interação macromolécula-ligante.....	39
Tabela 2 – Parâmetros de ligação para a interação da urease com diferentes ligantes a 30°C.	65
Tabela 3 – Razão entre as constantes de ligação do MFC com a urease na ausência (K_b) e na presença do substrato ou inibidores competitivos clássicos (K_b').....	68
Tabela 4 – Dados obtidos por ESI-MS para as reações entre os aminoácidos Cis, Lis e Arg com MFC.....	75
Tabela 5 – Parâmetros de ligação obtidos para a interação da urease com diferentes BTU . Condições: Urease (1 μ M); BTU (0 - 80 μ M); tampão fosfato de sódio 20 mM contendo EtOH 10% (v/v), pH 7,4 a 30 °C. $\lambda_{ex} = 280$ nm, slit 5×10 nm ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$).	85
Tabela 6 – Parâmetros de cinética clássica para o ensaio BUT1 -urease (12 mU mL ⁻¹), ureia (0,1 – 10 mM), tampão fosfato de sódio, pH 7,4 \pm 0,1.	90
Tabela 7 – Parâmetros de ligação e termodinâmicos para a interação entre urease e BTU1 em diferentes temperaturas. Condições: urease (2 μ M), BTU1 (0 - 120 μ M), tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4.	93
Tabela 8 – Parâmetros de fluorescência tridimensional para urease livre e na presença de BTU1 . Condições: Urease 2 μ M; BTU1 50 μ M, tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 a 30 °C. Pico 1: espalhamento <i>Rayleigh</i> ; pico 2: emissão dos resíduos Trp e Tir e pico 3: aminoácidos aromáticos.....	96
Tabela 9 – Parâmetros de Stern-Volmer e deslocamento no comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência sincronizada para urease na presença de BTU1	97
Tabela 10 – Cálculos de MM-PBSA para o complexo urease- BTU1 no sítio ativo e sítio alostérico.....	98
Tabela 11 – Relação das constantes de ligação da urease na ausência (K_b) e na presença (K_b') de substrato ou dos inibidores competitivos (HU, TU, NBPT). Condições: urease 2,0 μ M, 50 μ M de substrato ou inibidor, BTU1 (1,0 - 120 μ M).....	99
Tabela 12 – Parâmetros de FRET da interação urease- BTU1	101
Tabela 13 – Parâmetros otimizados para o UrePAD com detecção colorimétrica e determinação da urease usando o indicador vermelho de fenol.....	110
Tabela 14 – Comparação do desempenho analítico dos diferentes sistemas para determinação da urease.	112

Tabela 15 – Atividade das ureases do solo usando UrePAD e método espectrofotométrico do indofenol (n = 4).	114
Tabela 16 – Inibição das ureases do solo (n = 4) obtidos com UrePAD e pelo método do indofenol para NBPT 1 mM (concentração final no solo).	114
Tabela 17 – Valores de IC ₅₀ para os diferentes inibidores de urease, obtidos pelo UrePAD e pelo método de referência do indofenol.	115
Tabela 18 – Especificações dos substratos de papel filtro qualitativo grade 1, Whatman:cromatográficos N°1 e 3MM.	123
Tabela 19 – Resumo dos parâmetros utilizados para cada indicador no Multicolor PAD....	134
Tabela 20 – Figuras de mérito obtidos para o Multicolor PAD.	134
Tabela 21 – Atividade das ureases do solo usando o Multicolor PAD em comparação com o método de referência (indofenol) (n = 3).	136
Tabela 22 – Inibição das ureases do solo obtidos com Multicolor PAD e pelo método do indofenol para NBPT 1 mM (concentração final no solo).	136
Tabela 23 – Valores de IC ₅₀ obtidos pelo Multicolor PAD para os quatro inibidores clássicos de urease em comparação com o método de referência (indofenol).	138
Tabela 24 – Recuperações para determinação da urease empregando Multicolor PAD em amostra de saliva sintética diluída duas vezes para os valores 1 e 2 U mL ⁻¹ e quatro vezes para 4, 6 e 8 U mL ⁻¹ . Condições: ureia 80 mM, indicador 2 mM, tampão fosfato de sódio 0,5 mM pH = 6,5.	140
Tabela 25 – Recuperações para determinação da urease empregando Multicolor PAD em amostra de saliva humana diluída duas vezes. Condições: ureia 80 mM, indicador 2 mM, tampão fosfato de sódio 0,5 mM pH = 6,5. Os valores obtidos para as adições 1 e 4 U mL ⁻¹ correspondem aos valores após subtração do sistema sem adição de urease.	140

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	22
1.1 Ureases: estrutura e catálise	22
1.2 Inibição das ureases: uma alternativa para problemas agrícolas e clínicos	24
1.2.1 Ureia como fertilizante e ureases do solo	24
1.2.2 Ureia in vivo e bactérias ureolíticas	27
1.3 Inibidores de ureases	29
1.3.1 Benzilisotiocianato natural derivado de Moringa oleífera	33
1.3.2 Benzoiltioureias sintéticas	35
1.4 Estratégias para a avaliação da atividade e da inibição da urease em diferentes sistemas	36
1.4.1 Estudos biofísicos de interação macromolécula – ligante	36
1.4.2 Técnicas empregadas nos estudos de interação macromolécula-ligante	38
1.4.3 Estratégias analíticas para determinação da atividade da urease	40
1.4.4 Colorimetria e dispositivos em papel como alternativa para determinação da urease	42
1.5 Justificativa	44
1.6 Objetivo geral	45
1.7 Objetivos específicos	45
1.7.1 Estudos de interação Urease – MFC	45
1.7.2 Estudos de interação Urease – BTU	45
1.7.3 Desenvolvimento do UrePAD	46
1.7.4 Desenvolvimento do Multicolor PAD	46
EXPERIMENTAL	48
2.1 Equipamentos e Materiais	48
2.2 Soluções e procedimentos para os estudos de interação urease-MFC	48
2.2.1 Cinética clássica e inibição <i>in vitro</i>	49

2.2.2 Estudos biofísicos de interação Urease-MFC.....	49
2.2.3 Avaliação do mecanismo com base em reações com grupos tiol e amino.....	49
2.2.4 Avaliação da inibição de ureases do solo	50
2.3 Soluções e procedimentos para estudos de interação urease - BTU	50
2.3.1 Determinação dos parâmetros IC_{50} e K_b das BTUs.....	51
2.3.2 Estudos teóricos	51
2.3.3 Cinética enzimática e estudos biofísicos de interação Urease-BTU1 empregando espectroscopia de absorção molecular no ultravioleta.....	52
2.3.4 Estudos biofísicos de interação Urease-BTU1 empregando fluorescência molecular	53
2.3.5 Estudos de inibição das ureases do solo.....	53
2.4 Soluções e procedimentos para desenvolvimento do UrePAD	54
2.4.1 Fabricação do dispositivo analítico em papel (UrePAD)	54
2.4.2 Otimização experimental	54
2.4.3 Determinação colorimétrica da atividade da urease em papel.....	55
2.4.4 Determinação da atividade e inibição das ureases de solo no UrePAD.....	55
2.4.5 Determinação do parâmetro IC_{50} para diferentes inibidores pelo UrePAD.....	56
2.4.6 Método de referência (indofenol)	56
2.4.7 Análise estatística dos dados.....	57
2.5 Soluções e procedimentos para desenvolvimento do Multicolor PAD	58
2.5.1 Fabricação do dispositivo analítico em papel (Multicolor PAD)	58
2.5.2 Estratégia experimental para otimização.....	59
2.5.3 Preparo dos modificadores de superfície	59
2.5.4 Determinação da atividade da urease no Multicolor PAD e parâmetros de mérito.....	59
2.5.5 Determinação da atividade da urease frente inibidores clássicos e em amostras de solos empregando Multicolor PAD	60
2.5.6 Aplicação empregando amostras de salivas sintética e humana	60
2.5.7 Métodos de referência e análise estatística.....	61

RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
3.1 ESTUDOS DE INTERAÇÃO UREASE-MFC	63
3.1.1 Cinética clássica e inibição <i>in vitro</i> da urease	63
3.1.2 Parâmetros de ligação e avaliação de alterações conformacionais na urease.....	64
3.1.3 Avaliação do processo de interação no sítio ativo da urease	66
3.1.4 Avaliação do mecanismo de inibição baseado em reações químicas	68
3.1.4.1 Avaliação da reação do isotiocianato com o grupo tiol	68
3.1.4.2 Avaliação da reação com grupos amina/guanidina.....	72
3.1.4.1 Avaliação dos produtos majoritários das reações de Cis, Lis e Arg com MFC por Espectrometria de Massas (MS).....	75
3.1.5 Inibição das ureases presentes no solo.....	81
3.1.6. Conclusões	83
3.2 ESTUDOS DE INTERAÇÃO UREASE-BTUs	84
3.2.1 Ensaio de <i>screening</i>.....	84
3.2.1.1 Determinação dos parâmetros IC_{50} e K_b para todas as benzoiltioureias	84
3.2.1.2 Docking Molecular	86
3.2.1.3 Simulações de Dinâmica Molecular (MD).....	87
3.2.1.4 Cálculos de MM-PBSA.....	89
3.2.2 Estudo de interação entre urease e BTU1	89
3.2.2.1 Cinética Clássica.....	89
3.2.2.2 Parâmetros de ligação e termodinâmicos.....	90
3.2.2.3 Estudos por espectroscopia de absorção molecular no UV.....	94
3.2.2.4 Fluorescência tridimensional (3D)	95
3.2.2.5 Fluorescência sincronizada.....	97
3.2.2.6 Avaliação do sítio ativo	98
3.2.2.7 Ensaio de transferência de energia por ressonância de Förster (FRET).....	100
3.2.2.8 Atividade antiureolítica no solo	101

3.2.3 Conclusões	102
3.3. DESENVOLVIMENTO DO UrePAD	104
3.3.1 Otimização dos parâmetros para determinação da urease no UrePAD.....	104
3.3.1.1 <i>Ordem de adição das soluções na zona de detecção</i>	106
3.3.1.2 <i>Tempo de análise</i>	107
3.3.1.3 <i>Volume de solução adicionado na zona de detecção</i>	108
3.3.1.4 <i>Concentração do indicador vermelho de fenol</i>	108
3.3.1.5 <i>Efeito da concentração hidrogeniônica inicial (pH).....</i>	108
3.3.1.6 <i>Tipo e concentração da solução tampão</i>	109
3.3.1.6 <i>Efeito da concentração da ureia</i>	110
3.3.2. Desempenho analítico do método proposto.....	111
3.3.2. Aplicação do UrePAD	113
3.3.2.1 <i>Determinação da atividade e inibição das ureases do solo</i>	113
3.3.2.1 <i>Determinação do IC₅₀ para diferentes inibidores usando UrePAD</i>	115
3.3.3. Conclusões	117
3.4 DESENVOLVIMENTO DO MULTICOLOR PAD	118
3.4.1 Otimização dos parâmetros para determinação da urease no Multicolor PAD....	118
3.4.1.1 <i>Definição da zona de detecção</i>	118
3.4.1.2 <i>Canal de cor</i>	119
3.4.1.3 <i>pH inicial</i>	120
3.4.1.4 <i>Seleção do substrato de papel.....</i>	123
3.4.1.5 <i>Concentração da ureia</i>	125
3.4.1.6 <i>Concentração do indicador</i>	125
3.4.1.7 <i>Modificação da superfície do papel.....</i>	126
3.4.2 Desempenho analítico do Multicolor PAD	132
3.4.3 Aplicação do Multicolor PAD.....	135
3.4.3.1 <i>Determinação da atividade e inibição das ureases do solo</i>	135

3.4.3.2 Atividade da urease in vitro frente inibidores clássicos	137
3.4.3.3 Ensaio de recuperação empregando saliva sintética e saliva humana	138
3.4.3.4 Urease de bactérias ureolíticas presentes na saliva	141
3.4.4 Conclusões	142
4.1 CONCLUSÃO GERAL	144
4.1 REFERÊNCIAS	145
ANEXO I	168
ANEXO 2	171

INTRODUÇÃO

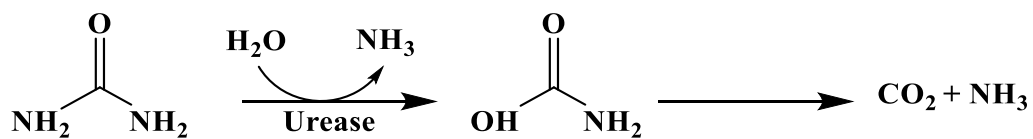
INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1.1 Ureases: estrutura e catálise

Ureases (ureia amidohidrolase EC 3.3.1.5) são enzimas níquel dependentes, produzidas por plantas, fungos e bactérias, que catalisam a hidrólise da ureia para formar amônia (NH_3) e dióxido de carbono (CO_2) (Figura 1) cerca de 10^{14} a 10^{17} vezes mais rápida do que a reação não catalisada (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2013; KAPPAUN *et al.*, 2018).

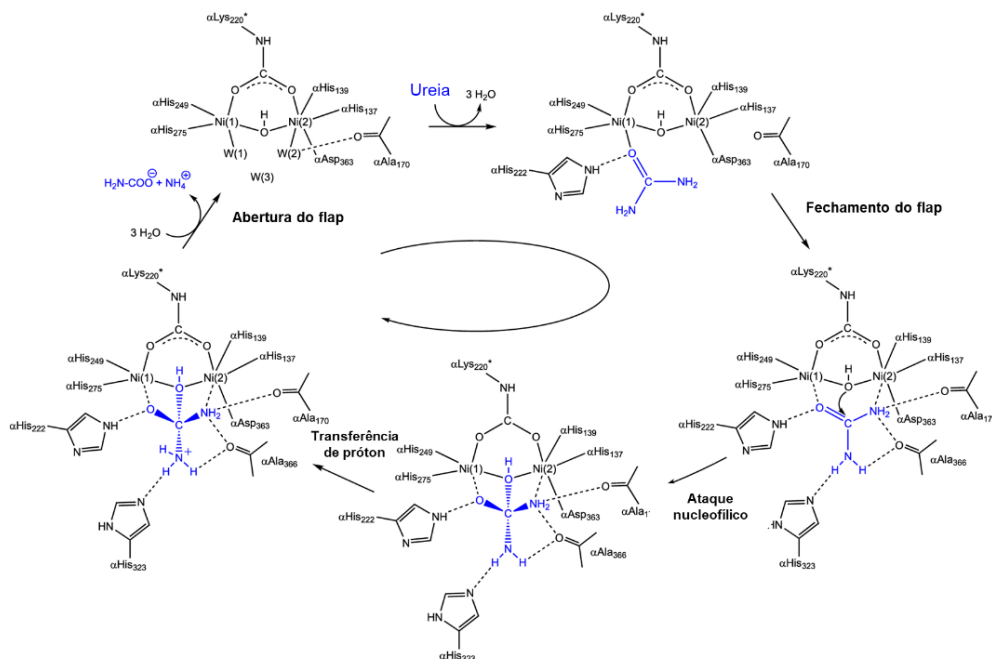
Figura 1 - Reação de hidrólise da ureia na presença da urease



Fonte: elaborado pela autora. Adaptado de Rego *et al.* 2018.

Um dos mecanismos propostos para a hidrólise da ureia pela urease destaca o deslocamento das moléculas de água presentes no sítio ativo da enzima e ligação entre ureia em um dos íons Ni(II) por meio do oxigênio carbonílico. Em seguida, a ureia se liga ao outro íon níquel via um dos átomos de nitrogênio estabelecendo uma ligação bidentada com o centro catalítico da urease, resultando em um intermediário tetraédrico, seguido da formação de NH_4^+ e $\text{H}_2\text{N-CO}_2^-$ (Figura 2) (BOER *et al.*, 2014; MAZZEI *et al.*, 2020).

Figura 2 - Mecanismo de hidrólise da ureia catalisada por ureases. Enumeração correspondente aos resíduos de urease *Sporosarcina pasteurii*.

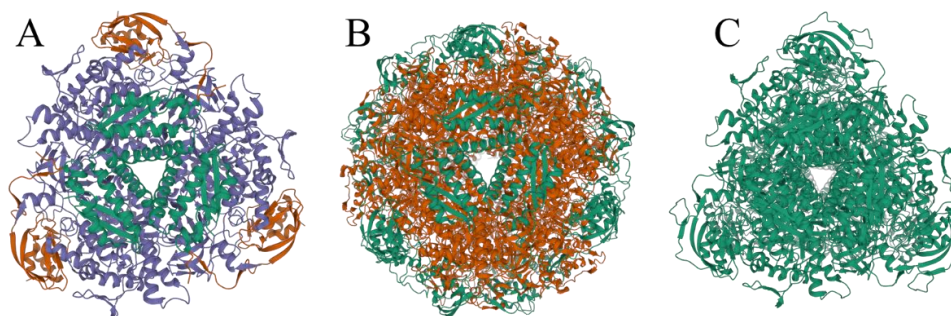


Fonte: Retirado de Mazzei *et al.*, 2020.

É possível observar a importância dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo, dos íons Ni(II) e, sobretudo, do *flap*. As informações estruturais e os possíveis mecanismos de ação das ureases de diferentes fontes permitem inferir sobre a influência e conformação do *flap*, estabilização do substrato e estado de transição no sítio ativo (MAZZEI *et al.*, 2020). A compreensão do sítio ativo e do mecanismo de hidrólise, facilita o desenho reacional e seleção de inibidores direcionados ou não para o sítio ativo (BENINI *et al.*, 1999).

Ureases vegetais e fúngicas são homo-hexâmeros com duas subunidades idênticas de 90 kDa e dois íons Ni(II) em cada uma. As ureases bacterianas são multímeros de duas ou três subunidades e formam trímeros ou hexâmeros de subunidades complexas (α , β e γ). Para a maioria das bactérias, essas três subunidades são organizadas como heterotrímeros formados de três subunidades α , três subunidades β e três subunidades γ , embora algumas ureases bacterianas sejam organizadas com diferentes estequiometrias (Figura 3) (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2013; BALASUBRAMANIAN; PONNURAJ, 2010; KAPPAUN *et al.* 2018). As diferenças em subunidades não refletem no sítio ativo nem no mecanismo catalítico, resultando em alta similaridade de sequência e estruturas secundárias altamente conservadas com centro bi-níquel no sítio ativo e mecanismo catalítico semelhante.

Figura 3 - Comparação estrutural das ureases de (A) heterotrímero (α , β e γ) de *Sporosarcina pasteurii* (PDB ID 4CEX); (B) heterodímero (α , β) de *Helicobacter pylori* (PDB ID 1E9Z); e (C) homo-hexâmeros de subunidades α de *Canavalia ensiformis* (PDB ID 3LA4).



Legenda: subunidades α , β e γ representadas pelas cores verde, laranja e roxo, respectivamente.
Fonte: elaborado pela autora com base nas imagens disponíveis no PDB, 2021.

De modo geral, as sequências de aminoácidos de ureases provenientes de plantas e bactérias estão intimamente relacionadas, embora algumas atividades biológicas difiram. Por exemplo, as ureases vegetais, mas não as ureases bacterianas, possuem propriedades inseticidas independentes de sua atividade ureolítica (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2013).

Dentre as diferentes ureases, a Jack bean (*Canavalia ensiformis*, JBU) merece destaque, pois foi a primeira enzima a ser cristalizada, permitindo avanços importantes, como o

conhecimento da natureza enzimática de proteínas, a possibilidade de cristalização de enzimas, além de mostrar a importância de cofator inorgânico (níquel) para a sua atividade catalítica (BALASUBRAMANIAN; PONNURAJ, 2010).

O sítio catalítico da urease *Canavalia ensiformis* consiste em um centro bi-níquel com os íons de níquel Ni1 e Ni2 separados por uma distância de 3,7 Å (CARTER *et al.*, 2009; IKRAM *et al.*, 2013; MAZZEI *et al.*, 2017; PADARIYA *et al.*, 2014). Os resíduos His519 N^{δ1}, His545 N^{ε1} e Lis490* O^{δ1} são ligados a Ni1, enquanto os resíduos His407 N^{ε2}, His409 N^{ε2}, Asp633 O^{δ1} e Lis490* O^{δ2} são ligados a Ni2. O resíduo Lis490* é carbamilado e funciona como um resíduo de ponte entre os dois Ni(II). A sequência de aminoácidos de JBU mostrou-se homóloga às ureases bacterianas como *K. aerogenes* (KAU), *B. pasteurii* (BPU) e *H. pylori* (HPU) (BALASUBRAMANIAN; PONNURAJ, 2010). Assim, JBU é amplamente empregada como modelo de urease para estudos *in vitro* independentemente de enfoque do trabalho.

1.2 Inibição das ureases: uma alternativa para problemas agrícolas e clínicos

As ureases são enzimas amplamente encontradas na natureza e em organismos vivos, pois são sintetizadas por plantas, bactérias, algas, fungos e invertebrados. Sua ocorrência no solo e no estômago humano requer atenção especial do ponto de vista econômico, agrícola e clínico, pois está associada a problemas na sociedade atual. O substrato da urease é a ureia, disponível em solos (pela excreção de urina por animais, decomposição de organismos e aplicação de fertilizantes) e no corpo humano (metabolismo proteico) (KRAJEWSKA, 2009).

A ureia (NH₂CONH₂), carbamida ou carbonildiamida, é um composto com 45% de nitrogênio, sólido à temperatura ambiente, na forma de grânulos ou cristais brancos com densidade 1,335 g cm⁻³, solúvel em água (5,45 × 10⁵ mg L⁻¹ a 25° C), amplamente distribuída em espécies vivas e produzida na indústria para diferentes finalidades (PUBCHEM, 2021).

Devido à ampla disponibilidade de ureia, a urease é considerada uma resposta natural para a sua degradação, contribui para o metabolismo de nitrogênio e proporciona microambiente favorável à sobrevivência de microrganismos. Entretanto, em muitas situações a inibição da atividade da urease apresenta-se como alternativa para minimizar efeitos direta ou indiretamente causados pela rápida hidrólise da ureia, os quais serão abordados a seguir.

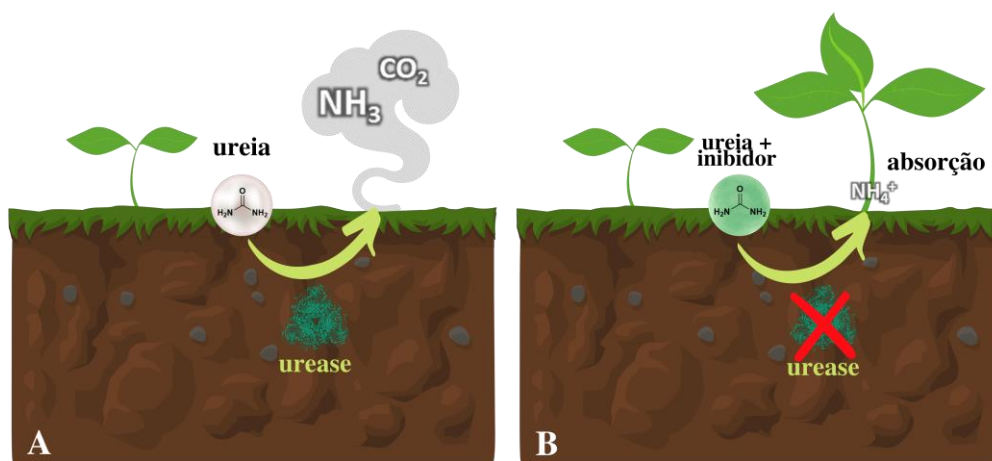
1.2.1 Ureia como fertilizante e ureases do solo

A produção mundial de ureia por ano deve ultrapassar 9,3 bilhões de toneladas até 2050, cuja principal aplicação é como fertilizante, tendo o Brasil como o quarto maior consumidor mundial e o sexto produtor. De acordo com a Associação Nacional para Difusão de Adubos

(ANDA), em 2016, a produção, a importação e o consumo de ureia no Brasil somaram mais de 10 milhões de toneladas, sendo 5.598.147 equivalentes ao consumo. Em 2020, o Brasil consumiu 7,5 milhões de toneladas de ureia, dos quais 6,8 milhões de toneladas foram de importação e 88% destinado à fertilização, indicando uma alta demanda desse insumo agrícola (GLOBALFERT, 2021). A alta aplicação da ureia como fertilizante nitrogenado na agricultura mundial é devido ao menor preço por unidade de nitrogênio, elevado teor do elemento (45%), menor custo de produção, transporte, armazenamento e aplicação, alta solubilidade, baixa corrosividade e facilidade de mistura com outras fontes (IPNI, 2007).

Em contrapartida, a ureia é o fertilizante nitrogenado que apresenta as maiores perdas de nitrogênio por volatilização devido à ação de ureases do solo (Figura 4A) (COSTA *et al.*, 2003). Essas ureases são produzidas por bactérias de solos (cerca de 17-30% da microbiota), cuja variação é dependente do tipo de solo, do ambiente circundante, pH e nitrogênio disponível. De modo particular, *Sporosarcina pasteurii* é capaz de produzir urease constitutivamente, ao passo que a adição de ureia ao meio de cultura proporcionou um ambiente alcalino adequado para crescimento de *S. pasteurii* e maior produção de urease e aumento na capacidade de biomineralização (SIGURDARSON *et al.*, 2018; MA *et al.*, 2020).

Figura 4 - Aplicação de ureia em solos (A) sem inibidor e (B) com inibidor.



Fonte: elaborado pela autora, 2022.

Assim, devido ao crescimento da população mundial e a diminuição das terras agricultáveis *per capita*, a demanda por maiores quantidades de fertilizantes, como a ureia, tende a aumentar e, paralelamente, perdas de N-ureia, além de outras desvantagens como aumento no custo de produção de alimentos, emissão de gases com impacto ambiental negativo e eutrofização de corpos de água (AZEEM *et al.*, 2014). As perdas de N-ureia nos sistemas

agrícolas e pecuários em todo o mundo são estimadas em 37 Mt e variam com as condições do solo, modo de aplicação (maiores perdas em solos leves/baixa capacidade de troca catiônica), temperatura e umidade. As perdas globais médias de N-ureia são estimadas em cerca de 14% (variação de 10-19%), mas podem chegar até 40% em solos tropicais devido às altas temperaturas (CANTARELLA *et al.*, 2018).

Para reduzir as perdas de N-ureia por ação das ureases dos solos, várias modificações são feitas nas formulações de ureia, como a adição de inibidores de urease (Figura 4B) (CANTARELLA *et al.*, 2018). O Regulamento da União Europeia (UE) 2019/1009 estabelece regras quanto à disponibilidade no mercado de produtos fertilizantes na UE, destacando a importância dos inibidores de urease para melhorar o padrão de liberação de nutrientes do produto, retardar ou prevenir a atividade enzimática, com o objetivo de reduzir a volatilização da amônia quando comparado com um sistema controle (REGULATION (EU) 2019/1009).

A Diretiva NEC 2016/2284/UE estabelece metas para a redução de emissões de NH₃ até 2030, sendo alguns países da UE obrigados a reduzi-las em mais de 30% até 2030 em relação aos níveis de 2005, resultando numa redução que varia de 0,1 a 187 (10³ × t NH₃ /ano) (DIRECTIVE (EU) 2016/2284). Países como Alemanha, França e Espanha têm metas de redução de NH₃ superiores a 10.000 t NH₃ /ano até 2030. Cada país apresenta uma proposta para atingir a meta, como proibição do uso de ureia sugerida pelo Reino Unido ou a alteração da Lei de Fertilizantes em 2017 pela Alemanha, na qual ficou aprovada a Portaria de Fertilizantes declarando que a partir de 1 de fevereiro de 2020, a ureia como fertilizante é aplicada com inibidores de urease (HU & SCHMIDHALTER, 2021).

No Brasil, a *Nationally Determined Contribution* de 2022 (NDC/2022) apresentada à Organização das Nações Unidas, indica uma meta de redução de 37% dos níveis de 2005 de emissões de gases de efeito estufa até 2025 e de 50% abaixo dos níveis de 2005 em 2030, mas não apresenta detalhes ou medidas setoriais de como a meta será alcançada. No que se refere aos inibidores de urease no Brasil, o NBPT incorporado à ureia é único aditivo autorizado e regulamentado pela Instrução Normativa MAPA 5/2007 (MAPA, 2007). Assim, a estratégia de utilizar inibidores de urease ainda é considerada a melhor prática pelos agricultores, mais economicamente viável em relação às outras fontes de nitrogênio, e segura do que nitrato de cálcio e amônio, resultando em maior absorção de nitrogênio pelas diferentes culturas e melhor custo-benefício (WATSON, 1990; AZEEM *et al.*, 2014).

Atualmente, o tiofosfato de N-(*n*-butil)-triamida (NBPT) é o principal inibidor comercial de urease para aplicação agrícola e o mais utilizado em todo o mundo. Entretanto, devido ao alto custo, comparando com ureia sem inibidor, fertilizantes de eficiência aumentada

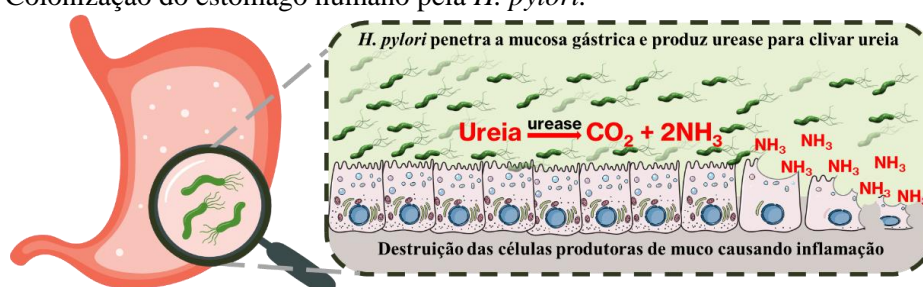
contendo inibidores de urease são utilizados somente em culturas com alto valor agregado (CANTARELLA *et al.*, 2018). O NBPT é comercializado no Brasil com o nome de Agrotain® (IPNI, 2007) e formulações como UremaxNBPT® com até 25% (ADFERT, 2021) e apresenta eficiência variável dependente das condições ambientais, características físico-químicas do solo e tempo de armazenamento. A inibição das ureases do solo é uma alternativa promissora para minimizar as perdas de N-ureia aplicados na agricultura, resultando em aumento da produtividade, redução dos custos e de emissões de gases nocivos ao ambiente. Para isso, estudos envolvendo novos compostos são estratégias eficazes para o desenvolvimento de inibidores de urease com diferentes aplicações.

1.2.2 Ureia *in vivo* e bactérias ureolíticas

In vivo, a ureia é formada no fígado a partir da amônia no ciclo da ureia e excretada pela urina como produto do metabolismo de proteínas. Os níveis normais de ureia no soro humano estão entre 1,7 e 8,3 mmol L⁻¹ (0,1 e 0,5 g L⁻¹) e em condições fisiopatológicas pode chegar a 100 mmol L⁻¹ (6,0 g L⁻¹). Assim, em análises clínicas, a ureia é um parâmetro significativo, pois seu excesso no soro sanguíneo pode causar problemas, como disfunção renal e, de modo geral, pode ser usada como um marcador do funcionamento do fígado, rins, catabolismo de proteínas, insuficiência cardíaca congestiva, desnutrição, gravidez e até estresse (DINDAR *et al.*, 2011; JAKHAR & PUNDIR, 2018).

As consequências da hidrólise da ureia pela urease, produzindo NH₃ e o aumento do pH são fatores relevantes para a saúde humana e animal. A ureia chega à mucosa gástrica a partir de canais seletivos nas células epiteliais, os quais são produzidos por genes *vacA* presentes em todas as cepas de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), uma bactéria ureolítica gram-negativa que infecta o trato intestinal (LADEIRA *et al.*, 2003). Essa bactéria coloniza o revestimento da mucosa gástrica, onde o aumento do pH (entre 6 - 8) do microambiente permite seu crescimento e a persistência em condições hostis, causando danos ao tecido e, conseqüentemente, gastrite e úlceras gastroduodenais (Figura 5) (KRAJEWSKA, 2009; SVANE *et al.*, 2020).

Figura 5 – Colonização do estômago humano pela *H. pylori*.



Fonte: elaborado pela autora, 2022 (Adaptado de HARVEY *et al.*, 2007).

Como observado na Figura 5, a hidrólise da ureia favorece a sobrevivência da *H. pylori* no estômago humano, mas NH_3 também é considerada uma citotoxina que destrói as células produtoras de muco, expondo o tecido conjuntivo do estômago ao ácido naturalmente produzido e resultando em processos inflamatórios (HARVEY *et al.*, 2007). Assim, a tolerância de *H. pylori* ao ácido estomacal é dependente da atividade da urease. O acesso da ureia à enzima é restrito pela presença de um canal de H^+ (UreI), de modo que em condições ácidas a ureia pode entrar no espaço citoplasmático e ser hidrolisada. A amônia produzida se difunde para o estômago (baixo pH), onde fica ionizada e limitada ao lúmen gástrico, enquanto o CO_2 segue para o sangue e em seguida é exalado (KRAJEWSKA, 2009; SCOTT *et al.*, 2016).

A infecção por *H. pylori* é comum em todo o mundo e sua prevalência varia entre 30 e 70% (HU, ZHU & LU, 2017), sendo diretamente relacionada à urease bacteriana. As grandes variações de prevalência dependem das condições socioeconômicas e de higiene. Nos Estados Unidos e Canadá, a prevalência varia entre 30 e 50%, enquanto no Brasil, essa infecção varia entre 50 e 70% (HU, ZHU & LU, 2017; BURKITT *et al.*, 2017). Devido a sua prevalência e significado clínico, a infecção por *H. pylori* constitui uma preocupação de saúde pública e a urease de *H. pylori* é um biomarcador para a infecção.

Várias espécies bacterianas como *Streptococcus salivarius*, *Actinomyces naeslundii*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, e *Proteus mirabilis*, demonstraram produzir urease embora o entendimento sobre a variação na atividade entre espécies e linhagens seja limitado, mas estão envolvidas em problemas como deposição de placa dentária, pneumonia, formação de cálculos renais e infecções do trato urinário (SVANE *et al.*, 2020; DAHLÉN *et al.*, 2018).

A ureia é liberada no fluido crevicular gengival (GCF) e em todas as secreções das glândulas salivares em concentrações que variam de 3 a 10 mM em indivíduos saudáveis, o que pode aumentar o pH basal do biofilme dental (placa) e neutralizar significativamente os efeitos da acidificação glicolítica na placa (DAHLÉN *et al.*, 2018). A atividade mais pronunciada de urease em saliva e placa dentária foi observada para *Staphylococcus epidermidis*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter ureolyticus* e algumas cepas de *Haemophilus parainfluenzae* que são consideradas bactérias patogênicas (DAHLÉN *et al.*, 2018; KONIECZNA *et al.*, 2012)

A função primária da urease expressa por *P. mirabilis* é fornecer uma fonte de nitrogênio para a bactéria, que vai hidrolisar ureia, provocar o aumento do pH da urina e a precipitação de íons cálcio e magnésio, promovendo a formação de cristais. Esses cristais se integram ao biofilme de *P. mirabilis* e aderem ao lúmen e balão de cateter, bloqueiam o fluxo da urina para

a bolsa de drenagem e podem permanecer dentro da bexiga entre as trocas de cateter. Assim, *P. mirabilis* pode causar infecções sintomáticas do trato urinário, incluindo cistite e pielonefrite, e está presente em casos de bacteriúria assintomática, principalmente em idosos e pacientes com diabetes tipo 2, além de causar formação de cálculos urinários (urolitíase), onde as infecções do trato urinário associadas a cateteres são as infecções hospitalares mais comuns, afetando cerca de 150-250 milhões de pacientes globalmente por ano (SCHAFFER & PEARSON, 2015; MILO *et al.*, 2021).

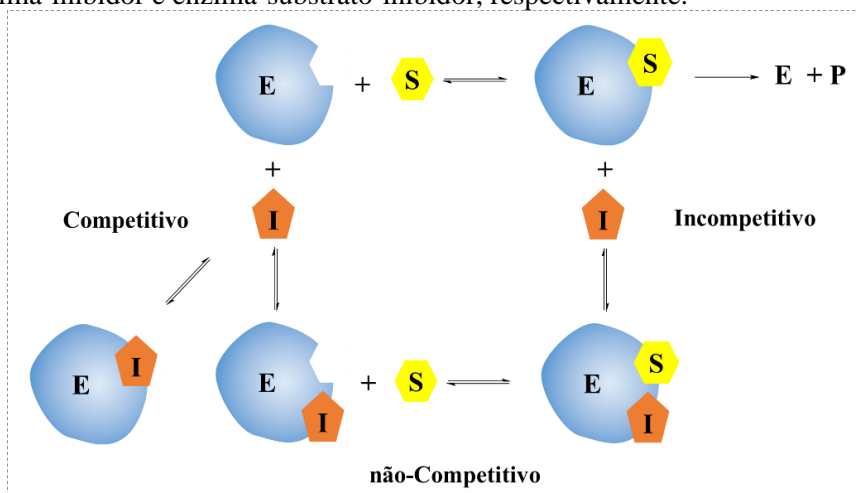
Nesse sentido, a atividade da urease é um importante fator patogênico, e dez dos doze patógenos resistentes a antibióticos designados “patógenos prioritários” pela Organização Mundial de Saúde nove são ureolíticos (SVANE *et al.*, 2020). Do ponto vista clínico, ureases bacterianas são fatores de virulência que implicam em patogêneses, ulceração e infecções gastrointestinais e estudos envolvendo potenciais inibidores de urease podem se úteis no desenvolvimento de medicamentos para auxiliar no combate à *H. pylori* e patogêneses associadas, bem como o desenvolvimento de metodologias analíticas podem auxiliar no diagnóstico precoce, de baixo custo e, conseqüentemente, no controle da atividade ureolítica associada a microrganismos (GRAHAM *et al.*, 2018; UPADHYAY 2012).

1.3 Inibidores de ureases

Estudos de inibição de ureases são amplamente difundidos devido às aplicações *i*) clínicas contra *H. pylori*; *ii*) agrícolas para produzir ureia de maior eficiência; *iii*) como estratégia analítica para determinar substâncias que atuam como inibidor da enzima e *iv*) planejar moléculas mais eficazes (UPADHYAY, 2012). Desenvolver inibidores orgânicos ou inorgânicos com aplicações terapêuticas e agrícolas é um desafio, mas também uma necessidade de mercado e científica. Nesse sentido, a seguir será feita uma breve apresentação de diferentes inibidores de urease para uso clínico e agrícola desenvolvidos ao longo dos anos.

Inibidores enzimáticos são espécies capazes de interferir no processo de catálise, diminuindo ou interrompendo as reações. Ou seja, inibidores possuem a capacidade de interagir com a enzima, com o complexo enzima-substrato ou até de alterar um grupo (ou região) da enzima que é essencial a sua atividade (KAFARSKI, P. & TALMA, 2018). De modo geral, a inibição enzimática pode ser reversível ou irreversível. Inibidores que atuam de forma reversível podem ser competitivos, incompetitivos, não-competitivos ou mistos (Figura 6).

Figura 6 – Inibição reversível para inibidor competitivo, incompetitivo e misto (não-competitivo).
 Legenda: E = enzima, S = substrato, I = inibidor, P = produto. ES, EI e ESI são os complexos enzima-substrato, enzima-inibidor e enzima-substrato-inibidor, respectivamente.

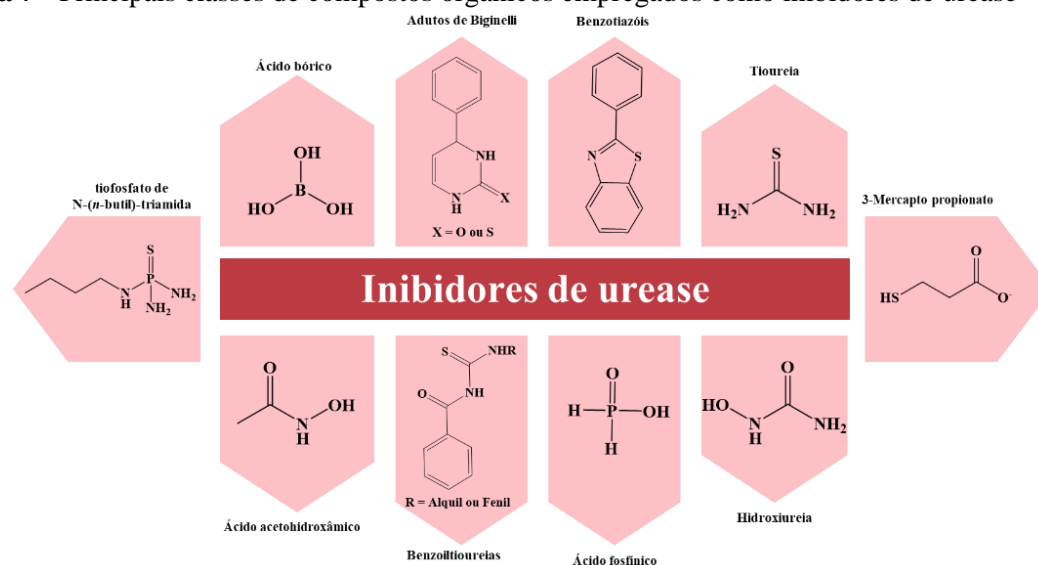


Fonte: elaborado pela autora, 2022, adaptado de Roskoski, 2007.

Inibidor competitivo é aquele que compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima e, geralmente, apresenta estrutura similar à estrutura do substrato. À medida que o inibidor ocupa o sítio ativo, formando um complexo EI, que impede a catálise. Um inibidor incompetitivo liga-se em um sítio distinto do sítio ativo do substrato e, ao contrário do inibidor competitivo, liga-se apenas ao complexo ES. Um inibidor misto (não-competitivo), afeta apenas a velocidade máxima da reação, pois liga-se tanto à enzima quanto ao complexo ES. Por mais transitórias que sejam essas ligações, elas reduzem consideravelmente a eficiência da enzima (NELSON & COX, 2014; PALMER & BONNER 2011).

Por outro lado, os inibidores irreversíveis ligam-se covalentemente ao grupo funcional da enzima, resultando na inativação permanente. Esses inibidores podem ser classificados como inativadores suicidas, os quais geram metabólitos que podem ligar-se irreversivelmente à enzima ou inativadores com base no mecanismo ou inibidores dependentes do tempo, pois simulam o mecanismo da reação para inativar a enzima (ROBERTSON *et al.*, 2012; NELSON & COX, 2014). Para a urease, inibidores reversíveis são mais reportados, como os compostos orgânicos apresentados na Figura 7.

Figura 7 - Principais classes de compostos orgânicos empregados como inibidores de urease



Fonte: elaborado pela autora, 2022.

Alguns inibidores de urease apresentam uma ou mais classificação de mecanismo, pois este depende da origem da enzima e das condições experimentais. Por exemplo, ânions F⁻ (competitivos, incompetitivos e não-competitivos), ácido acetohidroxâmico e seus derivados (competitivos e não-competitivos), íons Ag⁺, Hg²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺ (não-competitivos e irreversíveis), NBPT, hidroxiiureia e tiourea (competitivos), derivados de benzotiazóis, benzoiltioureas (mistos), entre outros (ARAUJO *et al.*, 2015; KAPPAUN *et al.*, 2018; UPADHYAY, 2012). Os inibidores de urease também são comumente reportados como (i) inibidores direcionados ao sítio ativo (estrutura análoga ao substrato) e (ii) inibidores que afetam o mecanismo da reação, mas sempre em corroboração com o mecanismo clássico de inibição (AMTUL *et al.*, 2013; UPADHYAY, 2012).

Uma forma de maximizar a eficiência da ureia aplicada em solos é a utilização de inibidores de urease e, ao longo dos anos, diferentes compostos orgânicos e inorgânicos têm sido testados como aditivos de fertilizantes, mas o NBPT é o que tem maior espaço comercial em todo o mundo. Seguido do NBPT, uma formulação contendo NBPT e NPPT (*N*-(*n*-propil) triamida tiosulfórica) apresentou bom desempenho no solo e chegou ao mercado com a marca *Limus*. Um novo inibidor de urease, *N*-(2-nitrofenil) triamida fosfórica (2-NPT), foi desenvolvido na Alemanha no início de 2000, sendo testado em condições de campo com potencial de mercado (CANTARELLA *et al.*, 2018, BYRNE *et al.*, 2020). Já em relação à infecção por *H. pylori*, ainda é desconhecida a terapia mais eficaz, fazendo-se necessário a combinação de diferentes tratamentos, os quais não são comumente relacionados às ureases

bacterianas (BURKITT *et al.*, 2017). Assim, esforços têm sido feitos para encontrar inibidores de urease que possam atuar no tratamento de infecção por *H. pylori*.

Upadhyay (2012), apresentou uma revisão com diferentes inibidores de ureases de plantas e bacterianas, como íons metálicos (Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} e Ni^{2+}), ácido bórico, ácido acetohidroxâmico, fosforamidas, α -hidroxicetonas, α -dicetonas, tióis e cumarinas. Saeed *et al.* (2017) relataram a síntese e atividade biológica de derivados cumarinil pirazolinil tioamida como inibidores não-competitivos da Jack bean urease.

Fluoreto (NaF) foi empregado como inibidor de urease de *S. pasteurii* (bactéria do solo) apresentando-se como inibidor competitivo, ao formar ligação coordenada (posição L1) e como inibidor não-competitivo ao formar ligação coordenada (posição LB), deixando Ni1 livre (BENINI *et al.*, 2014). Mathialagan *et al.* (2017) demonstraram o potencial de alicina, um bioinibidor natural obtido a partir do alho (*Allium sativum L.*) como inibidor de urease do solo, aplicando diferentes proporções de ureia/alicina na superfície do solo, mas não apresentou maior eficiência do que NBPT.

Braga *et al.* (2019) realizaram estudos de inibição de Jack bean urease empregando dezesseis adutos de Biginelli, dos quais, três mostraram-se inibidores tão eficientes quanto a hidroxiiureia. Benzotiazóis foram relatados como inibidores mistos de Jack bean urease, além de potencial aplicação de inibição das ureases do solo e como compostos precursores para projetar medicamentos contra doenças induzidas por ureases (ARAUJO *et al.*, 2015).

Macegoniuk (2013) apresentou uma revisão destacando íons metálicos, produtos naturais (como derivados de flavonoides), cetonas cíclicas, ácido acetohidroxâmico, amidas e fosforamidas como potenciais inibidores de ureases de plantas e bactérias (*Proteus vulgaris* e *Proteus mirabilis*, *S. pasteurii*, *H. pylori*). De forma análoga, o trabalho de Amtul *et al.* (2002) consistiu em uma revisão destacando os mecanismos de inibição de ureases de planta e bactérias por ácidos hidroxâmicos (AHA), imidazóis, fosfazeno e compostos relacionados. Krajewska *et al.* (2016) destacaram ácido bórico, fosfato e 2-mercaptoetanol como inibidores competitivos de ureases de planta e bactéria como Jack bean e *Klebsiella aerogenes*, respectivamente. Hanif *et al.* (2019) apresentaram estudos de síntese e inibição *in vitro* de urease para quinze quelatos de anéis triazólicos, com inibição comparável a da tiourea.

Aldeídos fenólicos naturais foram relatados como inibidores mistos de Jack bean urease, e eficiência em solo comparável ao NBPT (HORTA *et al.*, 2016). Estudos envolvendo polímeros maleico-itacônico demonstraram potencial inibição de Jack bean urease, mas não tão eficiente contra o crescimento celular de *S. pasteurii*, altamente relacionada à urease (MAZZEI

et al., 2018). Também se destacam quarenta aceptores de Michael avaliados na inibição de urease de *S. pasteurii*, com IC₅₀ na ordem de micromolar (MACEGONIUK *et al.*, 2017).

Produtos naturais, flavonoides, aceptores de Michael, compostos heterocíclicos, ácido fosfínico e complexos metálicos de Co²⁺, Cu²⁺ e Ag⁺ foram relatados como inibidores de ureases de *H. pylori* no trabalho de revisão de Kafarski e Talma (2018) e outros policíclicos aromáticos naturais foram destacados por Modolo *et al.* (2015) como inibidores de ureases de plantas e bactérias. Biglar *et al.* (2012) avaliaram vinte e um extratos de plantas medicinais na inibição de Jack bean urease com potencial aplicação para uso clínico, dos quais cinco apresentaram IC₅₀ entre 18-35 µg mL⁻¹. Diamidas bi-heterocíclicas apresentaram inibição *in vitro* de urease bacteriana associado a estudos de *docking* molecular *in silico*, e os resultados contribuem para a projeção de inibidores mais potentes (ABBASI *et al.* 2018). Derivados de bis-tiobarbitúrico também foram relatados como potenciais inibidores de urease (*Bacillus pasteurii*) com e IC₅₀ na ordem de milimolar (RAHIM *et al.*, 2016).

O trabalho de Jiang *et al.* (2016) relatou a síntese de 2-hidroxi-1-naftaldeído semicarbazona (HNDSC) e aplicação como potencial inibidor de Jack bean urease, apresentando-se como inibidor competitivo e IC₅₀ = 0,032 mmol L⁻¹. Lage *et al.* (2018) demonstraram que derivados de líquens apresentam potencial inibitório *in vitro* de *H. pylori* e de Jack bean urease como inibidores competitivo e não-competitivo.

Nesse sentido, fica notório a importância de estudos *in vitro* e *in vivo* envolvendo ureases de plantas e bacterianas, aplicações clínicas e agrícolas como estratégia analítica para compreender os mecanismos de inibição de cada inibidor, obter parâmetros que permitam melhorar sistemas e, por fim, a elaboração de produtos. Além disso, o desenvolvimento de metodologias para determinar atividade/inibição da urease em diferentes matrizes, bem como avaliar potenciais inibidores é uma necessidade científica e de mercado que visa minimizar os efeitos causados pela ação das ureases.

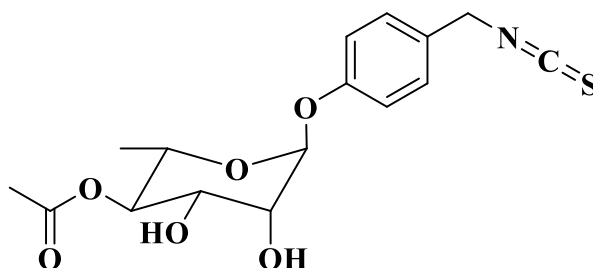
1.3.1 Benzilisotiocianato natural derivado de *Moringa oleífera*

Isotiocianatos são compostos encontrados em vegetais, como couve (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) e brócolis *Brassica oleracea* var. *Italica* L, e plantas como a *Moringa oleífera* L., amplamente distribuída no mundo, cujas folhas, flores, vagens e sementes são fontes de alimento de alto valor nutricional (BRILHANTE *et al.*, 2017). No Brasil, é comumente encontrada no Nordeste brasileiro, utilizada para fins agrícolas e para limpeza de águas turvas que serão consumidas pelo ser humano em regiões de difícil acesso à água potável

Estudos envolvendo extratos de compostos naturais ou derivados isolados como polifenóis de *Acacia decurrens L.*, resíduos de chá preto foram apresentados por Modolo *et al.*, (2015) e Rana *et al.*, (2021), extratos de *Chamomile recutita L.* por Li *et al.*, (2021), alicina obtida de alho por Mathialagan *et al.*, (2017), cloreto de nitidina de *Zanthoxylum nitidum L.* por Lu *et al.*, (2021) e até mesmo extrato de *Moringa oleífera L.* por Rana *et al.*, (2021) vêm sendo aplicados como inibidores de urease de interesse agrícola, tanto *in vitro*, quanto em solos. Entretanto, para os derivados de *Moringa oleífera*, tradicionalmente, extratos e derivados de bioativos isolados são mais utilizados para estudos clínicos, criação de bibliotecas ou estudos de relação de atividade de estrutura, alimentação animal ou até mesmo como aditivo funcional para a dieta humana (PAUL *et al.*, 2013; ALMEIDA *et al.*, 2017; SU *et al.*, 2020).

Os isotiocianatos apresentam propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes e anticâncer (BRILHANTE *et al.*, 2017; TANG *et al.*, 2013; WATERMAN *et al.*, 2014). Dos diferentes estudos, pode-se destacar avaliação da atividade anti-inflamatória relacionada à óxido nítrico sintase (TUMER *et al.*, 2015); a ação antinociceptiva, anti-inflamatória e toxicológica de moléculas derivadas de um produto natural benzilisotiocianato isolado de *Moringa oleífera* Lam. (SANTOS *et al.*, 2018); além da melhoria na saúde metabólica de camundongos obesos e resistentes à insulina induzidos por dieta utilizando um isotiocianato de *Moringa oleífera* (JAJA-CHIMEDZA *et al.*, 2018). Adicionalmente, isotiocianatos derivados do composto natural 4-(4'-O-acetil- α -L-ramnose oxi) benzilisotiocianato (MFC) (Figura 8) apresentaram atividade citotóxica como indutores de apoptose em diferentes linhagens de células cancerígenas do cólon, leucemia e próstata (ALMEIDA *et al.*, 2017).

Figura 8 - Estrutura do 4-(4'-O-acetil- α -L-ramnose oxi) benzilisotiocianato (MFC).



Fonte: Adaptado de Almeida *et al.* 2017.

Em relação aos estudos de interação com proteínas e enzimas, destaca-se a inibição de anidrase carbônica por isotiocianatos ($IC_{50} = 0,7 - 20$ nM), estes sendo considerados melhores inibidores da enzima quando comparados às aminas correspondentes (KHOBZAOU; I;

TILLEKERATNE; HUDSON, 2004). Lawson *et al.* (2015) propuseram um mecanismo de interação de três isotiocianatos com deubiquitinase por fluorescência em gel, concluindo-se que esses compostos inibiram USP9x e UCH37 associadas à carcinogênese. Nakamura *et al.* (2009) avaliaram a reatividade de um isotiocianato de alila com albumina do soro bovino (BSA) em condições fisiológicas por LC-MS, e observaram diminuição nos resíduos de lisina livres.

Por outro lado, os estudos de interação de isotiocianatos com a urease são pouco reportados, sendo possível destacar os trabalhos de Fahey *et al.* (2013) e Biglar *et al.* (2012), que apresentaram inibição da urease por isotiocianatos, mas indicaram a necessidade de mais investigações. Diante desse cenário, explorar inibição de um benzilisotiocianato de *Moringa oleífera* para interesse agrícola corresponde a um diferencial para aplicação do composto e da planta, contribuir com a compreensão do mecanismo da inibição da urease frente a essa classe de compostos e, conseqüentemente, ampliar as possibilidades de desenho estrutural de novos inibidores de interesse agrícola. Uma das principais vantagens para a utilização de benzilisotiocianatos obtidos a partir de *Moringa oleífera* é a facilidade na obtenção da matéria-prima, pois essa planta possui rápido crescimento e fácil adaptação ao ambiente mesmo em condições adversas de fenômenos naturais, além da ampla distribuição no nordeste brasileiro (ALMEIDA *et al.*, 2017; SU *et al.*, 2020), e estabilidade térmica dessa classe de compostos e em diferentes solos (POULSEN *et al.*, 2008). Nesse sentido, os estudos apresentados neste trabalho são importantes para avaliar o potencial de um benzilisotiocianato natural de *Moringa oleífera* como inibidor de urease como alternativa promissora do ponto de vista econômico e biotecnológico para minimizar problemas associados a perdas de nitrogênio no solo.

1.3.2 Benzoiltioureias sintéticas

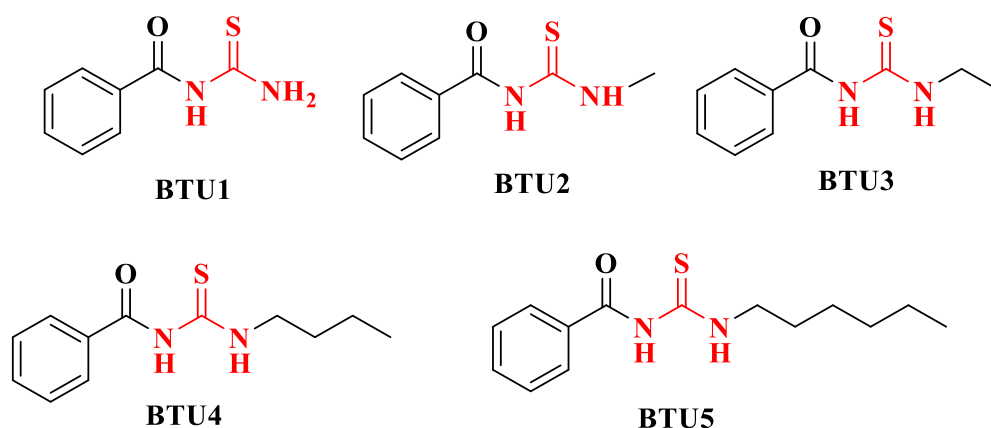
Compostos contendo fragmentos de ureia ou tioureia são de escolha assertiva para o desenvolvimento de inibidores de urease. A tioureia é considerada um inibidor clássico da urease e seus derivados apresentam potencial igual ou melhor em inibir essa enzima, como (4-clorofenil)-3-palmitoiltioureia (KAFARSKI & TALMA, 2018), compostos de função mista que incluem a tioureia (KANWAL *et al.*, 2019), dihidropirimidina-*tionas* sintéticas (BRAGA *et al.*, 2019) ou derivados naturais (HORTA *et al.*, 2016).

Brito *et al.* (2015), sinterizaram e avaliaram a inibição de 65 benzoiltioureias (**BTUs**) frente Jack bean urease *in vitro* e ureases do solo, demonstrando potencial aplicação de 28 **BTUs** como inibidores mistos. Barberena *et al.* (2019) avaliaram o potencial de uma bezoiltioureia em reduzir a volatilização de amônia em solos amazônicos após aplicação de ureia e demonstraram que para os solos avaliados esse composto não foi mais eficaz do que NBPT.

Uma série de benzoiltioureias mono e dissustituídas foram destacadas por Rego *et al.*, 2018 em uma revisão de potenciais inibidores de urease para aplicação antimicrobiana com resultados satisfatórios.

Para o desenvolvimento de compostos para aplicação biotecnológica relacionada à urease, faz-se necessário estudos de interação macromolécula-ligante, os quais vão desde a cinética clássica, sítios preferenciais de interação, alterações conformacionais na estrutura da enzima até a aplicação *in vivo*. Dessa forma, neste trabalho foi realizado um estudo de interação da urease com cinco benzoiltioureias (**BTUs**), nomeadamente *N*-carbamotioilbenzamida (**BTU1**), *N*-(metilcarbamotioil)benzamida (**BTU2**), *N*-(etilcarbamotioil)benzamida (**BTU3**) *N*-(butilcarbamotioil)benzamida (**BTU4**) *N*-(hexilcarbamotioil)benzamida (**BTU5**), as quais diferem entre si quanto grupo R (N-alquílica) (Figura 9).

Figura 9 – Estrutura química das benzoiltioureias avaliadas na interação com urease.



Fonte: elaborado pela autora, 2021.

Essas benzoiltioureias (Figura 9) foram reportadas como inibidores de urease (**BTU1**, **BTU2**, **BTU3**) por Brito *et al.*, (2015) ou como anti*Trypanosoma cruzi* (**BTU4**, **BTU5**) no trabalho de Pereira *et al.*, (2021). Todas essas **BTUs** também foram reportadas contra *M. tuberculosis* (Brito *et al.*, 2020). Entretanto, nenhum desses trabalhos explorou o mecanismo de inibição desses compostos frente a urease e, portanto, a abordagem feita aqui é inédita.

1.4 Estratégias para a avaliação da atividade e da inibição da urease em diferentes sistemas

1.4.1 Estudos biofísicos de interação macromolécula – ligante

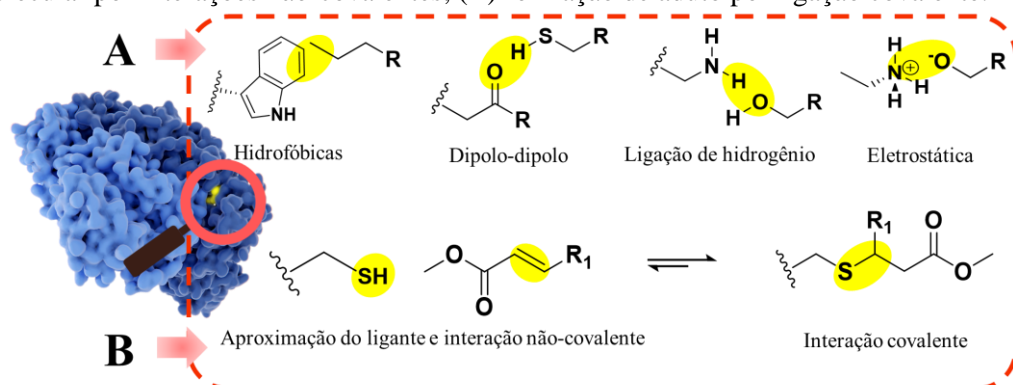
Macromoléculas são espécies químicas com elevada massa molecular, como proteínas/enzimas, ácidos nucleicos (RNA/DNA) e polissacarídeos, formados por unidades

monoméricas de baixa massa molecular. As macromoléculas são muito maiores do que suas unidades monoméricas, como por exemplo, a alanina que tem aproximadamente 0,5 nm de comprimento, enquanto a hemoglobina, formada por cerca de 600 resíduos de aminoácidos, possui uma estrutura de 5,5 nm de diâmetro. Ligantes são espécies de baixa massa molecular que se ligam a macromoléculas por interações intermoleculares (não-covalentes), formando complexos supramoleculares (NELSON & COX, 2014; WILLIAMS & DEVITER, 2013).

Proteínas e enzimas são macromoléculas dinâmicas, cujas funções dependem de interações com outras moléculas gerando mudanças sutis ou súbitas em suas conformações. A interação macromolécula-ligante é um processo dependente das estruturas e conformações químicas. As interações podem ocorrer ou não no sítio de ligação para proteínas, enquanto para as enzimas, podem ser no sítio ativo ou no sítio alostérico, resultando em alterações conformacionais que afetam a função exercida. Essas interações são seletivas, e permitem à proteína/enzima diferenciar milhares de moléculas e interagir somente com uma ou algumas (PETROVIC *et al.*, 2018; NELSON & COX, 2014).

O equilíbrio entre os estados ligados e não ligados do complexo é o resultado de algumas ou todas as interações, como ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, interações de van der Waals, ligações iônicas e interações de dispersão de London (ALJOUNDI *et al.*, 2020; NELSON & COX, 2014; WILLIAMS & DEVITER, 2013). Além das interações não-covalentes, as proteínas/enzimas podem ser modificadas covalentemente na presença de grupos funcionais reativos do ligante com resíduo de aminoácido como cisteína, serina, treonina, lisina, arginina, formando adutos covalentes. As interações não-covalentes variam de intensidade de força, entretanto, de modo geral, são muito mais fracas do que as covalentes (ALJOUNDI *et al.*, 2020; SINGH *et al.*, 2011). As principais interações não-covalentes e a formação de aduto entre macromolécula-ligante estão representadas na Figura 10.

Figura 10 – Representação de interação macromolécula – ligante com (A) formação de complexo supramolecular por interações não-covalentes; (B) formação de aduto por ligação covalente.



Fonte: elaborado pela autora, 2022.

Os mecanismos de reconhecimento de ligantes pelas macromoléculas, são baseados em três modelos principais: *i*) chave-fechadura, que considera apenas estruturas rígidas; *ii*) ajuste induzido, onde o ligante induz mudança conformacional na macromolécula, que alterna entre dois estados (aberta e fechada) para formar um complexo supramolecular; e *iii*) seleção conformacional, que considera as diferentes conformações da macromolécula no equilíbrio e o ligante liga-se seletivamente à conformação mais favorável, deslocando-o para a formação do complexo (NUSSINOV *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2020).

Esses modelos são empregados para justificar a atividade de enzimas ou seletividade de proteínas, mas inferências análogas podem ser feitas quando se busca monitorar a inativação ou redução da atividade de enzimas frente a um novo composto. A interação macromolécula-ligante resulta em alterações conformacionais em proteínas e enzimas, as quais podem ajudar a compreender vários processos biológicos, desenvolver medicamentos e outros compostos com potencial biotecnológico. Para isso, faz-se necessário monitorar e investigar a formação desses complexos empregando diferentes técnicas como estratégia analítica para obtenção de parâmetros de ligação.

1.4.2 Técnicas empregadas nos estudos de interação macromolécula-ligante

Dentre as diferentes técnicas capazes de fornecer informações *quali* e quantitativas do processo de interação macromolécula-ligante, pode-se destacar espectroscopia de absorção molecular por UV-vis, fluorescência molecular, dicroísmo circular, ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas, eletroforese capilar, titulação calorimétrica, dinâmica molecular entre outras (LAKOWICZ, 2006; WILLIAMS & DAVITER, 2013). Assim, algumas dessas técnicas estão apresentadas na Tabela 1 incluindo informações obtidas, vantagens e limitações.

Tabela 1 – Principais informações, vantagens e limitações relacionadas às técnicas utilizadas neste trabalho para avaliação da interação macromolécula-ligante

Parâmetros	Vantagens	Limitações	Referências
Fluorescência molecular			
<ul style="list-style-type: none"> Mecanismo de <i>quenching</i>; Parâmetros de ligação (K_b e n); Parâmetros termodinâmicos (ΔH, ΔS, ΔG); Distâncias intermoleculares; Monitoramento em 3D; Alterações conformacionais; Interações intermoleculares; Sítios preferenciais de interação. 	<ul style="list-style-type: none"> Elevada sensibilidade; Respostas quali e quantitativas; Maior seletividade do que absorção molecular no UV-vis; Não-destrutiva; Monitoramento em tempo real 	<ul style="list-style-type: none"> Número limitado de espécies fluorescentes; Determinações indiretas empregando sondas fluorescentes; Fotodecomposição; Efeito de filtro interno. 	ZHENG <i>et al.</i> 2017; CHAVES <i>et al.</i> 2017; WANI <i>et al.</i> 2017; LOKOWICZ, 2006; ALANAZI; ABDELHAMEED, 2016; PIGNATARO <i>et al.</i> , 2020;
Absorção molecular no UV-vis			
<ul style="list-style-type: none"> Mecanismo de <i>quenching</i>; Formação de complexo; Constante de ligação; Parâmetros termodinâmicos; Alterações conformacionais. 	<ul style="list-style-type: none"> Aplicação para a muitos compostos e/ou elementos; Análise rápida e barata; Revela a presença de contaminantes; Não-destrutiva. 	<ul style="list-style-type: none"> Baixa seletividade; Menor sensibilidade comparada à Fluorescência molecular Efeito de filtro; Deve seguir a Lei de Beer. 	PIGNATARO <i>et al.</i> , 2020; ROY; SENGUPTA; GUIN, 2018; LIU <i>et al.</i> 2018; ALANAZI <i>et al.</i> 2019; LOKOWICZ, 2006.
Espectrometria de Massas			
<ul style="list-style-type: none"> Constante de ligação e estequiometria do complexo; Variação de massa; Sítio de ligação e alterações conformacionais; Principais produtos formados. 	<ul style="list-style-type: none"> Ampla aplicação; Elevada sensibilidade; Monitoramento de principais produtos, de forma direta e indireta; 	<ul style="list-style-type: none"> Aplicação dependente dos analisadores e detectores; Alto custo; Destrutiva. 	CHALMERS <i>et al.</i> 2011; ISHII <i>et al.</i> 2016 PACHOLARZ <i>et al.</i> 2012; SIRTORI <i>et al.</i> 2018
Dinâmica molecular			
<ul style="list-style-type: none"> Formação do complexo; Parâmetros de ligação; Sítio e orientação da ligação. 	<ul style="list-style-type: none"> Simula interações ligante-receptor; Compreensão dos mecanismos; Resposta rápida; Possibilidade de muitos ensaios; Facilita a otimização de ensaios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> Não considera solvatação e protonação; Considera macromolécula rígida. 	AGRAWAL <i>et al.</i> , 2019; HERNÁNDEZ-SANTOYO <i>et al.</i> 2013; AAMIR <i>et al.</i> 2018; MUSYOKA <i>et al.</i> 2016; ALJOUNDI <i>et al.</i> 2020.

Fonte: elaborado pela autora, 2021

As técnicas de fluorescência molecular e dinâmica molecular são empregadas para monitoramento da macromolécula livre e do complexo macromolécula-ligante, enquanto absorção molecular no UV-vis e espectrometria de massas fazem monitoramento desses dois sistemas e do ligante livre (WANI *et al.* 2017; LOKOWICZ, 2006). Para informações como razão massa carga (m/z), produtos resultantes de interações covalentes e informações do ligante, recorre-se à técnica mais específica, independentemente das limitações (ISHI *et al.* 2016). A técnica de dinâmica molecular permite obtenção da energia de ligação e estrutura espacial do complexo, sítios preferenciais de interação com destaque em cada resíduo de aminoácido, tipo de força associada e é empregada de forma complementar ou como *screening* de compostos (DU *et al.*, 2016; ALJOUNDI *et al.*, 2020).

As diferentes técnicas (Tabela 1) associadas ao protocolo experimental e às equações lineares e não lineares, permitem obter um conjunto considerável de parâmetros, mas a disponibilidade de equipamentos, custo operacional e quantidade de material são fatores decisivos para elucidar o mecanismo de ação das ureases em diferentes matrizes e desenvolvimento de potenciais inibidores para aplicações biotecnológicas.

1.4.3 Estratégias analíticas para determinação da atividade da urease

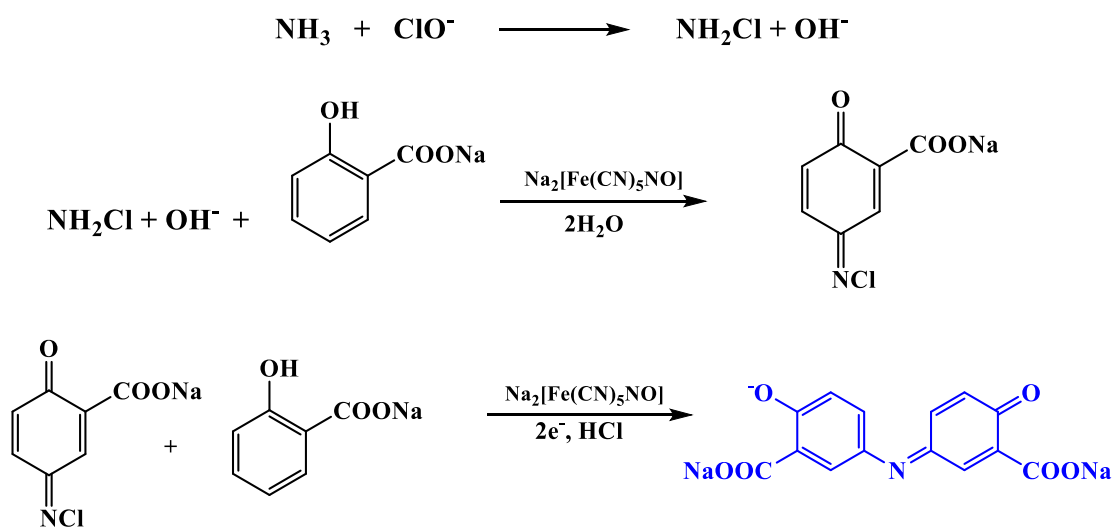
Para quantificação da atividade de uma enzima livre ou frente a um potencial inibidor, recorre-se a diferentes estratégias analíticas. Os produtos de muitas reações enzimáticas não são cromóforos, fazendo-se necessário adicionar reagentes colorimétricos para o monitoramento da atividade enzimática ou recorrer a técnicas não colorimétricas. Como exemplos, a adição de indicadores ácido-base (variação do pH) ou redox (variação do potencial do meio), os quais revelam uma coloração ou alteração de cor em função das variações ocorridas no meio reacional devido ação da enzima sob o substrato (JANNAH & KIM, 2019).

O método do indofenol baseado na reação de Berthelot é referência para quantificar a atividade da urease (WEATHERBURN, 1967) em solos (CORDERO *et al.*, 2019), na avaliação de potenciais inibidores e determinação da concentração mínima necessária desses compostos para inibir 50% da atividade da enzima (IC₅₀) (ARAUJO *et al.* 2015). Consiste na determinação indireta de NH₃ (produto da hidrólise da ureia pela urease), utilizando nitroprussiato de sódio em meio básico, salicilato de sódio e NaClO para formar o indofenol, cuja intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração de ureia hidrolisada (Figura 11).

Embora o método do azul do indofenol seja uma referência para a determinação de NH₃ ou NH₄⁺, apresenta limitações como: elevada quantidade de reagentes na maioria dos protocolos, controle rigoroso das proporções, elevado pH, baixa frequência analítica quando se

usa protocolos de análise discreta em batelada, baixa estabilidade do produto formado e reprodutibilidade das medidas analíticas, como os diferentes comprimentos de onda de absorção máxima do cromóforo formado (variações entre 540 e 700 nm) a depender do sistema reacional em análise (AFKHAMI & NOROOZ-ASL, 2008; CASTRO & KORN, 2004; KROM, 1980; KIM *et al.*, 2019; MA *et al.*, 2018).

Figura 11 - Mecanismo da reação de Berthelot modificada, em que NH_3 reage com salicilato na presença de nitroprussiato sob condições alcalinas para formar 2-2dicarboxil-indofenol.



Fonte: elaborado pela autora, 2022.

Nos últimos anos vêm sendo desenvolvidos métodos alternativos para quantificação da atividade da urease visando melhorar a sensibilidade e reprodutibilidade. Dentre os quais, destacam-se os sistemas cromatográficos (MUÑOZ-BALNCO & CÁRDENAS, 1986) eletroforese capilar (LIU *et al.*, 2016), ELISA (IIZUMI *et al.*, 2005), métodos eletroquímicos (HUBALEK *et al.*, 2007), detecção colorimétrica com nanopartículas (DENG *et al.*, 2016) vesículas de polidiacetileno (JANNAH & KIM, 2019) ou indicadores ácido-base (pH) (OKYAY & RODRIGUES, 2013; MCINTOSH *et al.*, 2010; MALEKGSHASEMI *et al.*, 2016).

Os trabalhos envolvendo indicadores ácido-base (variação de pH) merecem destaque, uma vez que simplifica o número de reagentes empregados quando comparado ao método do indofenol, baixa toxicidade dos reagentes, maior possibilidade de aplicação em outras plataformas, entre outros fatores. No trabalho de Okayay *et al.* (2013) um sistema colorimétrico, usando o indicador vermelho de fenol, foi descrito para determinar a atividade da urease de sete bactérias ureolíticas de diferentes origens ambientais. Nesse sistema, as reações e as análises foram processadas em batelada (solução) e utilizou-se um espectrofotômetro para obtenção das absorvâncias em 430 e 540 nm. McIntosh *et al.* (2010) usou um sistema em batelada avaliando

diferentes indicadores de pH, dos quais o vermelho de fenol e o roxo de bromocresol apresentaram os melhores resultados, com o objetivo de melhorar a localização visual da atividade da urease de *H. pylori* na mucosa gástrica.

Malekghasemi *et al.* (2016) compararam diferentes modificações em papel de filtro para o desenvolvimento de um dispositivo microfluídico (μ PADs) e usaram teste rápido de urease como modelo de aplicação, empregando o indicador vermelho de fenol, processamento da reação em papel e a intensidade de cor avaliada pelo software ImageJ. Nesse sentido, fica notório a necessidade do desenvolvimento de alternativas simples e de baixo custo para a determinação da atividade da urease.

1.4.4 Colorimetria e dispositivos em papel como alternativa para determinação da urease

A colorimetria é uma técnica que se baseia na medida ou intensidade de cor, amplamente utilizada nos últimos vinte anos para detecção de analitos em diferentes plataformas, devido à simplicidade, baixo custo e integração com sistemas de análise como *smartphones* e *scanners* (MORBIOLI *et al.*, 2017; GILCHRIST & NOBBS, 2017). Nos dispositivos colorimétricos, as reações podem ser processadas e analisadas em solução ou em plataformas como papel, que é um material acessível, versátil, de baixo custo, aplicado em sistemas microfluídicos ou microzonas circulares (fabricadas por fotolitografia, corte a laser, tratamento a plasma, impressão a jato de tinta e impressão à cera, por exemplo) delimitadas por uma barreira hidrofóbica, dando origem aos chamados dispositivos analíticos baseados em papel (*paper-based analytical devices*) (PADs) (NAMWONG *et al.*, 2018; MARTINZEZ *et al.*, 2007).

PADs são ferramentas versáteis de fácil fabricação, baixo custo da análise, portabilidade, análise simples e rápida, com alta resolução, além de serem descartáveis (NAMWONG *et al.*, 2018). Os PADs colorimétricos são baseados na alteração ou surgimento de uma cor após o processamento de uma reação química, podendo ser utilizada como uma forma rápida para obtenção de respostas *quali* ou quantitativas. A coloração pode ser monitorada visualmente, apenas para respostas qualitativas binárias “sim” ou “não” ou empregando sistemas eletrônicos de captura como *scanners*, câmeras digitais, *smartphones* ou dispositivos móveis para obtenção da intensidade de cor e associações quantitativas (MORBIOLI *et al.*, 2017).

Diferentes sistemas colorimétricos empregando indicadores ácido-base são relatados para determinação de ureia, NH_3 , CO_2 e urease ou outras enzimas. Por exemplo, roxo de bromocresol empregado para sensor de ureia (ALHARTHI *et al.* 2022); dispositivo à base de papel microfluídico de amarelo nitrazina ou azul de bromotimol para NH_3 (PETERS *et al.*,

2019); laranja de metila para dispositivo colorimétrico 3D baseado em papel para NH₃ gasoso no ponto de necessidade (KHACHORNSAKKUL *et al.*, 2021); uma mistura de roxo de *m*-cresol e vermelho de fenol para sensor de CO₂ produzido por impressora térmica a jato de tinta (ZHANG & LIM, 2016). Roxo de bromocresol, azul de bromotimol e vermelho de fenol para ensaio colorimétrico de base líquida da atividade da lisina descarboxilase (KIM *et al.*, 2015); vermelho neutro como sensor luminescente de pH/pCO₂ (ERICSON *et al.*, 2021); antocianinas naturais de repolho roxo (*Brassica oleracea*) para detecção rápida e sensível de urease de *H. pylori* (CELIK *et al.*, 2021), entre outros. Nesse sentido, indicadores ácido-base sintéticos ou naturais, ou outros agentes colorimétricos podem ser empregados para determinação da urease em diferentes sistemas no ponto de necessidade.

Em relação aos dispositivos portáteis, destacam-se os testes rápidos (RUT, do inglês *rapid urease test*) como o PylotestTM (ROY *et al.*, 2016), o CLO_{test}, o hp_{fast} (GRAHAM & MIFTAHUSSURUR, 2018) e o AMA RUT Pro (TY 20.59.52-008-59483502-2017), que é um dispositivo com papel indicador (STAROTIN, 2020), comercializados para detectar urease na mucosa gástrica em amostras de biópsias de forma simples e de baixo custo. O princípio reacional desses dispositivos está associado à mudança de cor do indicador vermelho de fenol, e têm por finalidade a complementaridade de exames histopatológicos da presença de *H. pylori* na mucosa gástrica humana, com resposta qualitativa binária “sim” ou “não”, contudo, em determinadas situações, apresentam resultado inconclusivo e necessitam de 120 a 180 min para obtenção de resposta (ROY *et al.*, 2016; UOTANI & GRAHAM, 2015).

Para a avaliação de inibidores de urease, pode-se destacar o desenvolvimento de um *chip* microfluídico à base de polidimetilsiloxano (PDMS) de três camadas para realizar o ensaio de inibição da enzima com detecção por fluorescência, usando *o*-ftalaldeído (OPA) para gerar produtos fluorescentes ($\lambda_{ex} = 420$ nm e $\lambda_{em} = 475$ nm) e o ácido acetohidroxâmico (AHA) como inibidor competitivo para validação do método (ZHANG *et al.*, 2013).

Outros métodos e dispositivos envolvendo urease também são relatados, mas a enzima é imobilizada ou adicionada ao sistema para quantificação de ureia em amostras de leite adulterado (LUTHER *et al.*, 2017) em matrizes ambientais (SURESH *et al.*, 2018) e em saliva (SONI *et al.*, 2018).

A maioria dos dispositivos envolvendo determinação da urease têm por finalidade obter apenas respostas qualitativas empregando o vermelho de fenol e visando aplicação para *H. pylori*, enquanto os trabalhos quantitativos apresentam sistemas de complexa obtenção do material de partida ou portabilidade. Diante disso, surge a necessidade do desenvolvimento de dispositivos analíticos que possam ser utilizados no *Point-of-Care* (POC) trazendo

confiabilidade, simplicidade, custo reduzido, facilidade de operação e sem a necessidade de instrumentação de alto custo. Um teste que fornece um *screening* com resultados em curto intervalo de tempo pode ser útil em laboratórios de pesquisa (Química Orgânica, Analítica, Medicinal, Agronomia) que atuam na síntese e avaliação de novas moléculas como potenciais inibidores de urease para aplicação agrícola e clínica. Além disso, dispositivos dessa natureza podem ser utilizados em clínicas de diagnóstico de infecções causadas por bactérias ureolíticas, ou por indústrias de fertilizantes nitrogenados, as quais podem fornecer aos consumidores um dispositivo capaz de indicar a necessidade da aquisição de suas formulações com inibidor em função da atividade da urease no solo.

1.5 Justificativa

Uma estratégia eficaz na regulação da hidrólise da ureia é a inibição da urease, empregando inibidores naturais ou sintéticos, para reduzir as perdas de nitrogênio, os impactos ambientais e econômicos, além de ser uma alternativa para a erradicação da *H. pylori* (KAPPAUN *et al.*, 2018; GRAHAM & MIFTAHUSSURUR, 2018). Em 2021, a produção sustentável de amônia foi considerada uma das dez principais tecnologias emergentes em química (GOMOLLÓN-BEL & MARTÍNEZ, 2022). Assim, nos últimos anos, diferentes compostos foram sintetizados visando se obter inibidores eficientes para a urease, seja para aplicações na produção de fertilizantes de eficiência aumentada (fertilizantes nitrogenados com liberação controlada ou contendo inibidores de urease) ou para fins medicinais no combate à bactéria *H. pylori*. Observa-se a importância da determinação da atividade urease para diferentes campos da ciência, que incluem estudos ambientais, avaliação e aplicação de novas moléculas, além da atividade relativa desta enzima ser usada como indicativo da demanda de ureia em diferentes solos e da necessidade de aquisição de fertilizante contendo inibidores.

Assim, este trabalho será dividido em duas partes principais com dois trabalhos independentes em cada uma. A primeira parte trata de estudos de interação da urease com ligantes orgânicos de diferentes classes (benzilisotiocianato natural derivado de *Moringa oleífera* L. e benzoiltioureas sintéticas) e a segunda parte trata do desenvolvimento de metodologias analíticas de baixo custo empregando apenas o indicador ácido-base vermelho de fenol e papel cromatográfico com impressão à cera e um segundo trabalho explorando cinco indicadores ácido-base, diferentes papéis e modificação da superfície.

1.6 Objetivo geral

Avaliar o mecanismo de inibição da urease por um benzilisotiocianato natural e cinco benzoiltioureas sintéticas, bem como desenvolver metodologias simples e de baixo custo para determinação da atividade da urease em diferentes matrizes e na avaliação de potenciais inibidores.

1.7 Objetivos específicos

1.7.1 Estudos de interação Urease – MFC

Investigar o potencial e o mecanismo de inibição do 4-(4'-O-acetil- α -L-ramnose oxí) benzilisotiocianato (MFC) frente à urease a partir de ensaios biofísicos.

- Determinar o IC_{50} e cinética clássica do MFC frente à urease;
- Empregar fluorescência molecular para determinar constante de ligação e estequiometria;
- Avaliar a interação do isotiocianato com o sítio ativo da urease por fluorescência molecular na presença do substrato e de competidores clássicos (HU, TU, NBPT);
- Monitorar reações com resíduos de cisteína, lisina e arginina empregando absorção molecular, fluorescência molecular e espectrometria de massas;
- Avaliar o potencial de inibição do MFC frente às ureases do solo.

1.7.2 Estudos de interação Urease – BTU

Realizar estudos biofísicos de interação entre a urease e cinco benzoiltioureas sintéticas, e aplicação em ureases de solo.

- Determinar a cinética clássica e o IC_{50} das **BTUs** frente à urease;
- Determinar K_b por fluorescência molecular para selecionar a **BTU** mais ativa *in vitro*;
- Determinar os parâmetros de ligação (tipo de *quenching*, K_b e estequiometria) e termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG) entre urease- **BTU1** por fluorescência molecular;
- Realizar estudos teóricos
- Avaliar alterações conformacionais na urease decorrentes do processo de interação, empregando fluorescência sincronizada, fluorescência 3D e UV-vis;
- Determinar distâncias intermoleculares entre urease e **BTU1** por transferência de energia (FRET);
- Avaliar possíveis interações com o sítio ativo da urease por fluorescência molecular na presença do substrato e de competidos clássicos (TU, HU, NBPT);

- Aplicar a **BTU** mais ativa *in vivo* para inibição das ureases do solo;
- Empregar estudos teóricos para todas as **BTUs** e relacionar com IC_{50} e K_b .

1.7.3 Desenvolvimento do UrePAD

Desenvolver um método colorimétrico empregando papel como plataforma analítica para determinação da atividade das ureases do solo e avaliação de potenciais inibidores (UrePAD).

- Selecionar o *layout* e o papel do dispositivo;
- Otimizar os parâmetros experimentais e obter as figuras de mérito;
- Extrair ureases do solo e avaliar a atividade no UrePAD;
- Obter IC_{50} de diferentes inibidores empregando UrePAD;
- Empregar o método de referência do indofenol para fins comparativos;

1.7.4 Desenvolvimento do Multicolor PAD

Avaliar sistematicamente a influência do tipo de papel, modificação da superfície e indicadores ácido-base no desenvolvimento de um PAD para determinação da atividade de urease em amostras de solo e saliva (sintética e humana), e avaliação de inibidores.

- Selecionar o *layout* do dispositivo e otimizar os parâmetros físico-químicos para obter o melhor desempenho analítico do método;
- Aplicar o PAD para determinar atividade residual de urease padrão frente a inibidores clássicos *in vitro*;
- Determinar a atividade de ureases do solo e em amostras de saliva sintética empregando o multicolor PAD;
- Aplicar o multicolor PAD para evidenciar a presença de bactérias ureolíticas em saliva humana;
- Comparar os resultados obtidos com o multicolor PAD com o método de referência.

EXPERIMENTAL

EXPERIMENTAL

EXPERIMENTAL

2.1 Equipamentos e Materiais

Jack bean urease (*Canavalia ensiformis*) Tipo III 40150 U g⁻¹ de sólido ou 500-800 U mL⁻¹ em glicerol, mono e di-hidrogenofosfato de sódio, ácido 3-morfolinopropano 1-sulfônico (MOPS) citrato de sódio, 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (TRIS), acetato de sódio, L-cisteína, L-lisina, arginina, 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), ácido 3-mercaptopropiônico, fluorescamina, glicerol, ureia, vermelho de fenol, vermelho neutro, roxo de *m*-cresol, azul de bromotimol, roxo de bromocresol, polivinilpirrolidona (PVP), tetraetoxisilano (TEOS), poli-(4-estireno sulfonato de sódio (PSS) hipoclorito de sódio, nitroprussiato de sódio, salicilato de sódio, NBPT, tiourea, hidroxiaurea, ácido acetohidroxâmico, cisteamina, ácido bórico, NaCl, MgCl₂, CaCl₂, albumina do soro bovino (BSA), amilase, NaF, NiSO₄, CuSO₄ e KCl foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Os demais reagentes usados apresentavam grau de pureza analítica superior a 95%. Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura (18,2 MΩ cm Master system MS2000 Gehaka, São Paulo, Brasil).

Para ensaios de absorção molecular e fluorescência molecular foram utilizados, respectivamente, espectrofotômetro Micronal (Modelo AJX-6100PC, Brasil) de duplo feixe e espectrofluorímetro Shimadzu (modelo RF-5301PC, Japão) equipado com lâmpada de Xenônio de 150 W, equipado com cubetas de quartzo de 1,0 cm (caminho óptico). As medidas de absorção na região do infravermelho foram realizadas em espectrofotômetro FT IR (IRPrestige-21, Shimadzu, Japão) usando a técnica reflexão total atenuada (ATR). Para os ensaios de atividade antiureolítica em microplaca, foi utilizado uma leitora de microplaca (Tecan Infinite 200 PRO RCHISTO) e microplaca de poliestireno (96 poços). Os espectros de massas foram obtidos a partir de um espectrômetro Shimadzu (LCMS-IT-TOF) equipado com fonte de ionização electrospray (ESI) e vazão de 4 μL min⁻¹.

2.2 Soluções e procedimentos para os estudos de interação urease-MFC

O benzilisotiocianato natural (MFC) foi isolado a partir de flores de *Moringa Oleífera* L. (Moringaceae) e caracterizado por Almeida *et al.* (2017). A solução estoque do MFC (2 mM) foi preparada por dissolução do sólido em etanol, enquanto o estoque de fluorescamina (3 mM) foi preparado dissolvendo-se o sólido em acetonitrila. A solução de trabalho do MFC, solução estoque e de trabalho da urease (10 μM) e dos aminoácidos lisina, cisteína e arginina foram preparadas em tampão fosfato de sódio (20 mM, pH 7,4 ± 0,1).

2.2.1 Cinética clássica e inibição *in vitro*

Os ensaios de inibição *in vitro* foram realizados em triplicata ($n = 3$), usando Jack bean urease (*Canavalia ensiformis*) com base na reação do indofenol (Weatherburn, 1967) e metodologia adaptada de Araujo *et al.* 2015. Para isso, 12 mU de urease (em tampão fosfato de sódio 20 mM, 10 mM EDTA, pH 7,0) foram incubados com concentrações crescentes de cada inibidor por 15 min (MFC, TU, HU e NBPT), seguindo com adição de 20 μL de ureia 80 mM, por 15 min para processamento da reação em 200 μL de volume final. A concentração de NH_4^+ foi determinada em 700 nm após 30 min de incubação com 90 μL da solução A (salicilato de sódio 1% (v/v) e nitroprussiato de sódio 5 mg L^{-1}) e 140 μL da solução B (NaOH 0,5 % (m/v) e NaOCl 0,1 % (v/v)). Os experimentos foram realizados em triplicata ($n = 3$) e IC_{50} foi calculado com base no método gráfico de intersecção entre a abscissa (concentração do inibidor) e a ordenada (% inibição) (Díaz-Sánchez *et al.*, 2016; Tavares *et al.*, 2021a).

2.2.2 Estudos biofísicos de interação Urease-MFC

Os espectros de emissão referentes à fluorescência intrínseca da urease (5 μM) no estado estacionário ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ / pH 7,4), na ausência e na presença do MFC foram obtidos por titulação espectrofluorimétrica da enzima com quantidades crescentes do ligante (0 - 200 μM). O estudo por fluorescência sincronizada foi realizado para monitorar separadamente os fluoróforos Tir e Trp presentes na urease. Neste experimento se manteve fixa a diferença entre os comprimentos de onda de emissão e excitação ($\Delta\lambda = \lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{ex}}$), variando ambos os monocromadores. Assim, aplicou-se $\Delta\lambda = 15$ e $\Delta\lambda = 60$ nm para monitorar o comportamento espectroscópico dos resíduos de Tir e Trp, respectivamente (BRAGA *et al.*, 2019; LYRA *et al.*, 2020). Para o ensaio de competição, o substrato (ureia) e os inibidores (HU, TU ou NBPT) foram usados numa concentração fixa, seguindo a proporção 1:5 urease: substrato/inibidor e MFC (10 - 200 μM) (LAGE *et al.*, 2018). A interação com níquel foi feita avaliando os espectros de absorção entre 210 e 280 nm para os sistemas: Ni(II) 10 μM a partir de NiSO_4 , MFC 10 μM e Ni(II): MFC 1:1 em tampão fosfato 20 mM pH 7,4 a 30 °C.

2.2.3 Avaliação do mecanismo com base em reações com grupos tiol e amino

A quantificação dos grupos tióis livres na ausência e na presença do MFC foi realizado com base no ensaio de Ellman, o qual é baseado na reação entre DTNB e um grupo tiol (1:1), formando o cromóforo (TNB) que apresenta $\lambda_{\text{max}} = 412 \text{ nm}$ (ELLMAN *et al.*, 1961). Para avaliar os grupos amina livres foi empregada a sonda fluorescamina ($\lambda_{\text{ex}} = 385 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}} = 490$

nm) usando a lisina/arginina e urease como modelos, tanto nos experimentos empregando fluorescência molecular, como por UV-vis, na ausência e na presença do ligante MFC (MOHAMMED; BADR EL-DIN; DERAYEA, 2018).

Os espectros de massas foram obtidos na Universidade Federal de Goiás a partir de um espectrômetro Shimadzu (LCMS-IT-TOF) equipado com fonte de ionização electrospray (ESI) e vazão de 4 $\mu\text{L min}^{-1}$. Os espectros foram obtidos nos modos positivos e negativos. Metanol puro foi usado para ajuste no procedimento de calibração interna e limpeza do capilar.

2.2.4 Avaliação da inibição de ureases do solo

A inibição da atividade ureolítica de urease na microbiota do solo foi realizada de acordo com a metodologia adaptada de Cordero *et al.* (2019) usando amostras de dois solos classificados como latossolos (S1 e S2) coletados entre 0-20 cm de profundidade, secos ao ar e peneirados em 2 mm (SiBCS, 2018). Os solos S1 e S2 apresentam texturas franco-argiloarenosa e franco-arenosa, respectivamente, e diferentes teores de matéria orgânica (Tabela 1A – Anexo I) (TAVARES *et al.*, 2021b).

Para isso, 4 g de cada solo foram transferidas para Erlenmeyer com 0,5 mM de TU, HU e NBPT e volume final de 10 mL com tampão acetato de sódio pH $5,5 \pm 0,1$. Seguiu-se com agitação a 650 rpm por 30 min em mesa agitadora. Foram retirados 500 μL de cada suspensão e transferidos para tubos Falcon e adicionados 200 μL de ureia 80 mM ou 200 μL de tampão (sistema controle), com agitação contínua por 2 h. Em seguida, 2 mL de KCl foram adicionados em cada tubo e o sistema agitado por mais 30 min. Por fim, as suspensões foram centrifugadas (2900 rpm por 10 min) e o sobrenadante separado do resíduo. A concentração de N-NH_4^+ foi determinada em 700 nm usando 75 μL do sobrenadante centrifugado, 75 μL de água ultrapura e incubação por 30 min com 75 μL da solução A e 30 μL da solução B.

2.3 Soluções e procedimentos para estudos de interação urease - BTU

As BTUs foram sintetizadas, purificadas e caracterizadas por Brito *et al.* 2015. As soluções estoques das BTUs (10 mM) foram preparadas dissolvendo-se o sólido em etanol, enquanto as soluções de trabalho e estoque da urease (10 μM) foram preparadas em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH $7,4 \pm 0,1$). Inicialmente foram realizados ensaios de *screening* com base na concentração mínima para inibir 50% da atividade enzimática (IC_{50}) na constante de ligação (K_b) e nos estudos teóricos, para inferir sobre o composto mais ativo frente à urease e prosseguir com a elucidação do mecanismo.

2.3.1 Determinação dos parâmetros IC₅₀ e K_b das BTUs

Os ensaios de inibição enzimática *in vitro* foram realizados empregando-se urease Jack bean (*Canavalia ensiformis*) e metodologia análoga ao ensaio *in vitro* para o MFC, baseada na reação de formação do azul de indofenol (ARAÚJO *et al.*, 2015). Para obtenção da K_b por titulação espectrofluorimétrica foram obtidos espectros de fluorescência molecular da urease livre (1 μM) e na presença de cada BTU (0-80 μM), monitorando-se a intensidade de fluorescência da urease λ_{em} = 340 nm após excitação λ_{ex} = 280 nm. Para contornar possíveis problemas de solubilidade, as diluições foram feitas em tampão fosfato de sódio 20 mM/EtOH 10% (v/v) (pH 7,4 ± 0,1).

2.3.2 Estudos teóricos

Os estudos teóricos foram realizados pelo grupo de pesquisa do Professor Thiago Aquino (IQB/UFAL). Para os estudos *in silico*, a estrutura da Jack bean urease co-cristalizada (PDB: 4H9M) foi extraída a partir do banco de dados *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank database* (RCSB PDB, <https://www.rcsb.org/>) (BERNSTEIN *et al.*, 1977; BEGUM *et al.*, 2012), e submetida às simulações de dinâmica molecular (MD) como descrito por Braga *et al.*, (2019) usando o software *Gromacs*[®] (BERENDSEN *et al.*, 1995) Em seguida, os compostos **BTU1-5** foram desenhados usando o software *MarvinSketch*[®] (CSIZMADIA, 1999) e minimizados energeticamente (método semiempírico Austin Model – AM1) usando o software *Orca*[®] (NEESE, 2012). Todas as simulações de *docking* foram realizadas utilizando o software *Gold*[®] (VERDONK, 2003). Para a validação do protocolo de *docking*, os valores de desvio quadrático médio (RMSD) foram obtidos comparando o ácido aceto hidroxâmico (HAE) co-cristalizado extraído do PDB e os modos de ligação do HAE gerados pelo *docking* molecular, em uma região de 6 Å ao redor do ligante co-cristalizado, utilizando todas as funções de pontuação do software *GOLD*[®], sendo eles CHEMPLP, GoldScore, ChemScore, e Astex Statistical Potential – ASP (Tabela 2A - Anexo I).

O RMSD foi calculado usando o software *PyMol*[®] (LILL & DANIELSON, 2011). Utilizando a função CHEMPLP, foram realizadas as simulações de *docking* envolvendo todos os compostos estudados e Jack bean urease, selecionando todos os alvos, e as figuras de interação 3D foram geradas usando o software *Chimera*[®] (GODDARD *et al.*, 2005). Para ambas os compostos, as posições de ligação de energia mais baixa foram escolhidas como as conformações iniciais para as simulações MD dos complexos proteína-ligante por 50 ns. Finalmente, RMSD de proteína e ligantes, flutuação quadrática média (RMSF), raio de giro

(R_g) e área de superfície acessível ao solvente (SASA) foram calculados com base na análise das trajetórias MD, e os gráficos foram gerados usando o software *Xmgrace*[®] (KUMARI et al., 2014).

Os cálculos do MM-PBSA foram realizados pelo método Kumari, através da ferramenta *g_mmpbsa* KUMARI et al., 2014) e os arquivos de trajetória obtidos após as simulações de MD a 50 ns, utilizando o software *GROMACS*[®]. Em seguida, os valores de $\Delta G_{\text{binding}}$ foram determinados como a média das energias de interação livre e de solvatação (SARMA & MATTAPARTHI, 2019). Por fim, a estimativa de energia de ligação foi empregada por meio da equação (1):

$$\Delta G_{\text{binding}} = \Delta E_{\text{MM}} + \Delta E_{\text{SOLV}} - T\Delta S \quad \text{equação (1)}$$

onde ΔE_{MM} é a mudanças de energia da interação durante a simulação da fase gasosa da mecânica molecular durante a interação proteína-ligante, ΔE_{SOLV} representa as mudanças nas energias livres de solvatação e $T\Delta S$ representa a contribuição da entropia e temperatura absoluta do sistema (KUMAR et al., 2020).

2.3.3 Cinética enzimática e estudos biofísicos de interação Urease-BTU1 empregando espectroscopia de absorção molecular no ultravioleta

Após avaliações com base nos parâmetros IC_{50} , K_b , e dos estudos teóricos, **BTU1** foi selecionada como mais ativa e prosseguiu-se com outros ensaios para elucidação do mecanismo e aplicação biotecnológica. A cinética enzimática foi realizada empregando procedimento similar ao adotado para o *screening in vitro* para o IC_{50} , diferenciando-se nas concentrações de **BTU1** (0,5 a 10 μM) e ureia (0,1 a 10 mM) no meio reacional. Os parâmetros cinéticos (constante de Michaelis-Menten, K_m , velocidade máxima, V_{max}) para urease livre e na presença de **BTU1** foram obtidos a partir do gráfico de Lineweaver-Burk ($1/v$ versus $1/\text{ureia}$).

Os espectros de absorção molecular da urease (5 μM) e da **BTU1** (10 μM) e urease + **BTU1** na proporção 1:2 foram obtidos entre 220 e 340 nm, para avaliação de possível mudanças conformacionais na estrutura da enzima na presença do ligante. A interação da **BTU1** com níquel foi feita com base nos espectros de absorção molecular entre 200 e 340 nm para os diferentes sistemas, Ni(II) 10 μM ; **BTU1** μM e Ni(II) + **BTU1** na proporção 1:1 em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,4 \pm 0,1) a 38 °C.

2.3.4 Estudos biofísicos de interação Urease-BTU1 empregando fluorescência molecular

Os espectros de fluorescência no estado estacionário foram obtidos com janelas (*slit*) de excitação e emissão ajustados em 5×10 nm, respectivamente. Todos os sistemas foram preparados em tampão fosfato 20 mM (pH $7,4 \pm 0,1$). Os espectros da emissão da fluorescência intrínseca da urease na ausência e na presença de **BTU1** foram obtidos por titulação espectrofluorimétrica da urease (2 μ M) com **BTU1** (0 - 100 μ M), em três temperaturas (22, 30 e 38 °C) para obter os parâmetros termodinâmicos de interação (BRAGA *et al.*, 2019).

O estudo por fluorescência tridimensional (3D) foi realizado para avaliar possíveis mudanças conformacionais na estrutura secundária da enzima (BRAGA *et al.*, 2019; LAGE *et al.*, 2018). Neste estudo, os espectros de emissão em 3D da fluorescência intrínseca da urease (2 μ M) na ausência e na presença da **BTU1** (50 μ M) foram obtidos empregando intervalo de comprimento de onda de excitação e emissão de 220-400 nm.

Fluorescência sincronizada foi realizada para monitorar separadamente os fluoróforos tirosina (Tir) e triptofano (Trp) presentes na urease e possíveis mudanças da polaridade de seus microambientes. Para tanto, os espectros foram obtidos por meio da variação simultânea dos monocromadores de emissão e excitação, em que valor do $\Delta\lambda$ ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$) entre os comprimentos de onda de emissão e excitação foi mantido fixo. Aplicou-se $\Delta\lambda = 15$ nm e $\Delta\lambda = 60$ nm para monitorar o comportamento espectroscópico dos resíduos de tirosina e triptofano, respectivamente (LYRA *et al.*, 2020).

Para calcular a distância crítica entre o doador (fluoróforos da urease) e receptor de energia (ligante) durante o processo de interação da urease (2 μ M) com a **BTU1** (5 e 10 μ M) foi realizada o ensaio baseado na transferência de energia por ressonância de Förster (FRET) (ZHANG *et al.*, 2009). Um ensaio de competição com o substrato (ureia) e inibidores clássicos (HU, TU e NBPT) foi realizado para avaliar a natureza do processo de inibição da enzima. O procedimento foi realizado a partir de uma titulação do sistema urease (2 μ M) e substrato/inibidor (50 μ M) na presença de diferentes concentrações da **BTU1** (0 - 100 μ M) (LAGE *et al.*, 2018; BRAGA *et al.*, 2019).

2.3.5 Estudos de inibição das ureases do solo

O ensaio da atividade antiureolítica foi feito empregando quatro amostras de solos (S1, S2, S3, S4), coletados e caracterizados previamente (TAVARES *et al.*, 2021b; SILVA *et al.*, 2019), com diferentes teores de matéria orgânica e características físico-químicas (Tabela A1 - Anexo I). O procedimento experimental para extração das ureases do solo e a determinação de N-NH₄⁺ foram feitos de forma análoga aos ensaios para o MFC. As únicas diferenças foram: o

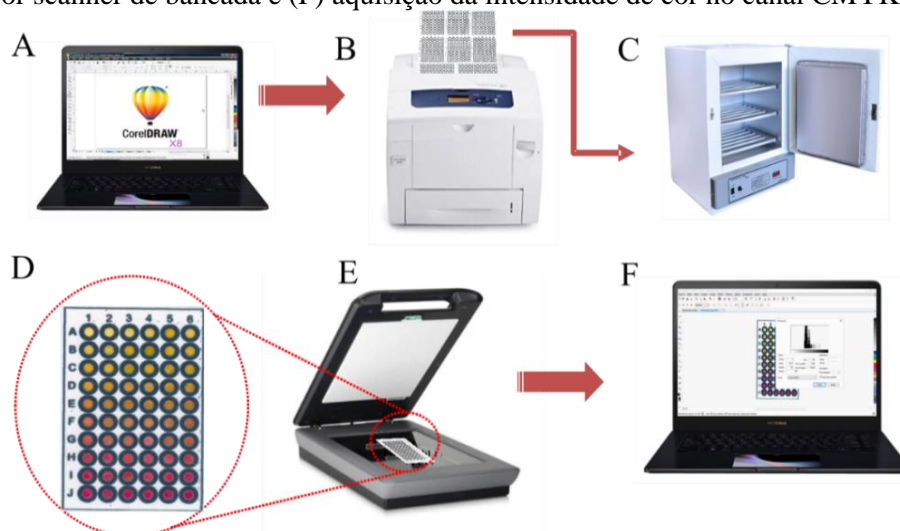
comprimento de onda de absorvância máxima (680 nm) e a utilização de sistema de medição em microplaca de 96 poços para obtenção dos valores de absorvância.

2.4 Soluções e procedimentos para desenvolvimento do UrePAD

2.4.1 Fabricação do dispositivo analítico em papel (UrePAD)

O PAD foi produzido pela técnica de impressão à cera (CARRILHO *et al.*, 2009). O *layout* foi desenhado usando o software Corel Draw™ versão X8 contendo 60 microzonas (7 mm diâmetro cada) distribuídas em 6 colunas e 10 linhas. O *layout* foi impresso em papel cromatográfico (Whatman Nº 1, 20 cm × 20 cm) usando uma impressora à cera (modelo ColorQube 8570, Xerox Corporation, Rochester, NY, EUA), e seco a 150 °C por 2 min para formação da barreira hidrofóbica no papel (Figura 12). Por fim, uma das superfícies do dispositivo em papel foi coberta com fita adesiva térmica para evitar vazamento da amostra.

Figura 12 – Etapas de elaboração do dispositivo: (A) *layout*, (B) impressão à cera, (C) formação da barreira hidrofóbica usando estufa (D) Dispositivo após utilização e pronto para análise, (E) aquisição da imagem por scanner de bancada e (F) aquisição da intensidade de cor no canal CMYK.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

2.4.2 Otimização experimental

Os principais parâmetros experimentais do método proposto foram otimizados de modo univariado para obter a melhor sensibilidade: *i*) ordem de adição de reagentes (A: indicador → urease → ureia, B: indicador → ureia → urease, C: urease → ureia → indicador, D: urease → indicador → ureia, E: ureia → indicador → urease, ou F: ureia → urease → indicador); *ii*) tempo de análise (20, 30 ou 40 min); *iii*) volume da solução (0,5, 0,6, 0,8, 1,0 ou 1,5 µL); *iv*) concentração do indicador de vermelho de fenol (0,013, 0,025 ou 0,05% m/v); *v*) valores de pH iniciais (5,0, 5,5, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6 ou 6,8); *vi*) tipo de tampão (fosfato de sódio, citrato de sódio

ou MOPS); *vii*) concentração de tampão (0,5, 1 ou 1,5 mM); e, *viii*) concentração de ureia (0,1, 1,0, 2,5, 5,0 ou 10 mM). Embora a temperatura influencie na atividade enzimática, esse parâmetro não foi considerado e todos os experimentos no UrePAD foram realizados em temperatura ambiente (25 °C), que também é a temperatura considerada por Karmali *et al.* (2004) para a relação de hidrólise da ureia empregada nos cálculos deste trabalho. Além disso, temperaturas menores do que 25 °C diminuem a atividade enzimática (KRAJEWSKA *et al.*, 2016) enquanto maiores temperaturas, para o sistema em questão, podem propiciar perdas de NH₃ e comprometer a mudança de cor do indicador.

2.4.3 Determinação colorimétrica da atividade da urease em papel

As soluções foram adicionadas na ordem: ureia (preparada em água), urease padrão (preparada em tampão fosfato de sódio 0,5 mM/ EDTA 10 mM; Tris – HCl 100 mM, glicerol 0,5 M, pH = 7,4). As diluições da urease e o indicador vermelho de fenol (0,025 % m/v) foram preparados em tampão fosfato de sódio 0,5 mM, pH = 6,6). Inicialmente, 1,0 µL de cada solução foi adicionada de forma independente na zona de detecção do UrePAD e um tempo de 2 min entre a adição de uma solução e outra foi necessário para absorção considerável da solução no papel. O tempo foi monitorado desde a adição da primeira alíquota na zona de detecção, até secagem homogênea em temperatura ambiente (25 °C), totalizando 20 min. As imagens foram adquiridas por *scanner* de bancada (600 dpi) e a intensidade de cor no canal ciano (*Cyan*), magenta (*Magenta*), amarelo (*Yellow*) e preto (*Black Key*) (CMYK) a partir da análise das imagens no *software* Corel Photo-Paint™. As curvas analíticas foram construídas diariamente, com uma zona de controle (ausência da urease) para determinar a atividade enzimática, e uma zona de referência (ausência de inibidor) para o ensaio IC₅₀.

O indicador de vermelho de fenol apresenta uma transição de cor do amarelo para magenta em valores de pH entre 6,6 e 8,0. A hidrólise da ureia leva ao aumento do pH; assim, quando uma concentração maior da enzima era empregada, mais ureia era hidrolisada, mudando a cor da zona de detecção (do amarelo para magenta). Por outro lado, em testes de inibição enzimática uma menor quantidade de ureia foi hidrolisada devido a presença do inibidor e a cor mudou de magenta para amarelo (MCINTOSH *et al.*, 2010).

2.4.4 Determinação da atividade e inibição das ureases de solo no UrePAD

Quatro amostras de solos foram coletadas entre 0-20 cm de profundidade nas cidades de Maceió, Alagoas (AL) nas proximidades do Rio Pratagi (9° 33' 56.5" S e 35° 39' 08.0" W) sem manejo e com vegetação de cobertura (S1) Arapiraca, AL (9° 41' 59.4" S e 36° 41' 11.8"

W) numa área de cultivo de vegetais (S2); Sorocaba, São Paulo (SP) (23° 34' 35.76" S; 47° 30' 58.95" W) com cultivo de *Citrus* e manejo orgânico (S3) e convencional (S4). As amostras foram secas ao ar, peneiradas em 2 mm, armazenadas a temperatura ambiente e caracterizadas (Tabela A1 – Anexo I) de acordo com o manual de métodos da EMPRAPA solos (TAVARES *et al.*, 2021; EMBRAPA, 1997; SILVA *et al.*, 2019).

A extração das ureases dos solos foi feita de acordo com o procedimento descrito por Cordero *et al.* (2019) com modificações (Figura 13 A-B). Todo o procedimento foi análogo ao descrito para os ensaios do MFC e da **BTU1**, exceto para a adição de ureia, pois a ureia foi adicionada no UrePAD, na sequência otimizada. No ensaio de inibição, empregou-se 1 mM de NBPT (concentração final no sistema) junto do tampão acetato de sódio. Por fim, a intensidade de cor na ausência e na presença do inibidor foi comparada com a curva analítica obtida para o UrePAD com concentrações conhecidas da urease (solução padrão).

2.4.5 Determinação do parâmetro IC₅₀ para diferentes inibidores pelo UrePAD

Para o ensaio de inibição *in vitro* e determinação do IC₅₀ de cada inibidor (NBPT, tiourea, hidroxitiourea, CuSO₄, ácido bórico, NaF, cisteamina, e (-) ácido úsnico), a urease foi incubada por 15 min com diferentes concentrações do inibidor. Em seguida, cada alíquota de amostra foi adicionada ao UrePAD e as análises foram realizadas. Sistemas controle (ureia, tampão e indicador) e referência (ureia, urease e indicador) foram usados em todos os testes.

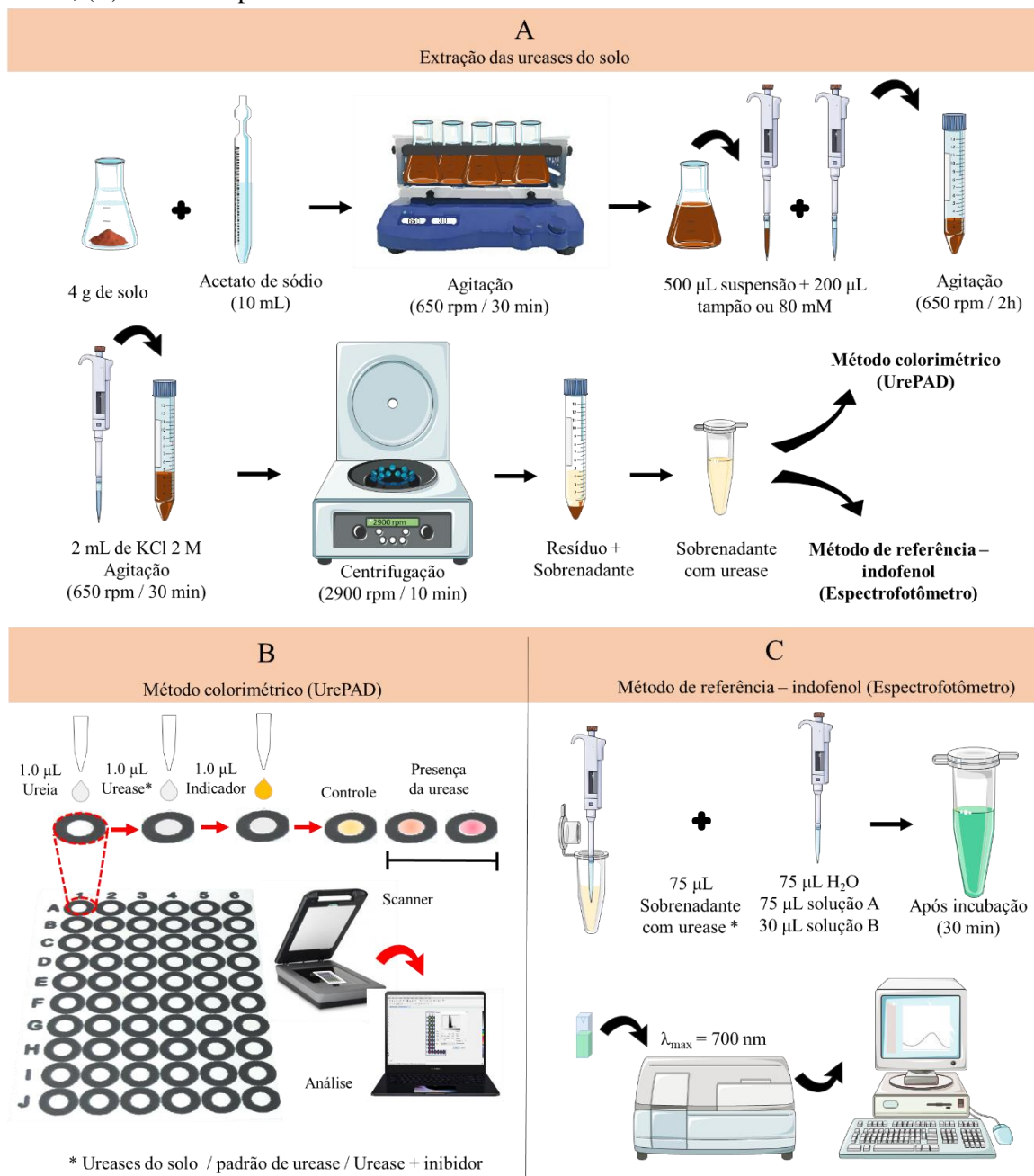
2.4.6 Método de referência (indofenol)

A extração das ureases do solo foi realizada de forma análoga para o UrePAD, diferenciando-se apenas na adição de 200 µL de ureia 80 mM ou 200 µL de tampão acetato de sódio (controle) com agitação contínua por 2 h. A concentração de N-NH₄⁺ foi determinada em 700 nm usando 75 µL de sobrenadante após centrifugação, adição de 75 µL de água ultrapura e incubação por 30 min com 75 µL das soluções colorimétricas A e B (Figura 13) descritas no trabalho do MFC. A atividade da urease (µmol N-NH₄⁺ g⁻¹ de solo) foi calculada com base nos valores obtidos na curva analítica usando NH₄Cl como padrão e considerando o volume total (2,7 mL) em que a reação ocorreu e o resíduo do solo (0,2 g) em 500 µL de suspensão.

Para avaliação da inibição *in vitro* e determinação do IC₅₀ pelo método espectrofotométrico do indofenol, os ensaios foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Araujo *et al.* (2015) com adaptações. Neste experimento, 12 mU de urease (em tampão de fosfato de sódio 25 mM, EDTA 10 mM, pH 7,0) foram incubados com concentrações crescentes de cada inibidor por 15 min, seguido pela adição de ureia (8 mM, concentração final)

em um tempo de reação de 15 min. A concentração de NH_4^+ foi determinada em 700 nm após 30 min de incubação com as soluções colorimétricas A e B da reação de Berthelot.

Figura 13 – (A) Procedimento para extração das ureases dos solos; (B) Protocolo de aplicação do UrePAD; (C) Método espectrofotométrico do indofenol.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

2.4.7 Análise estatística dos dados

Os experimentos foram realizados com $n = 3$ ou 6 e expressos como média \pm desvio padrão. A sensibilidade analítica foi usada como o critério de otimização, com base na inclinação da curva analítica de cada condição de estudo, que foi construída com pelo menos

oito pontos de acordo com a relação da Intensidade de Cor (CI) (*u.a.*) = $S \times C_{ure} + \mathbf{b}$, no sistema CMYK, S onde a inclinação, e \mathbf{b} o intercepto. O coeficiente de correlação linear (r) foi calculado para avaliar a adequação do comportamento linear. O limite de detecção (LOD, 3σ) foi calculado de acordo com: $LOD = 3\sigma_b/S$, onde σ_b é o desvio padrão do branco analítico ($n = 10$), S corresponde à inclinação da curva analítica empregada. O desvio padrão relativo (RSD) foi calculado de acordo com: $RSD = (s_p/x_p) \times 100$, onde s_p é equivalente ao desvio padrão de um determinado padrão analítico dentro do intervalo linear, e x_p é o valor médio encontrado para repetibilidade deste padrão ($n = 10$). Quando necessário, um teste de hipótese (teste t de *Student*) e comparações múltiplas (ANOVA, análise de variância) foram usados para avaliar os resultados. Foi considerada a distribuição normal dos dados ao nível de 95% de confiança.

2.5 Soluções e procedimentos para desenvolvimento do Multicolor PAD

2.5.1 Fabricação do dispositivo analítico em papel (Multicolor PAD)

Os dispositivos em papel com zonas de detecção em forma de flor (16 mm de diâmetro) (Figura 14) foram confeccionados com papel (papéis Whatman: filtro, CHR n° 1, CHR 3MM), cortadora (*Silhouette Cameo 4*), plástico adesivo preto e *layout* projetado em *Silhouette Studio*. Após o corte do adesivo, o papel foi impermeabilizado (frente e verso) para evitar vazamento das soluções e definição da zona de trabalho no papel. As imagens foram obtidas sem compressão de dados com um *scanner* de bancada (Canon Lide 300) com resolução definida para 300 dpi e processadas no programa Corel Photo-Paint software™ para obter os valores médios de intensidade de cor para cada microzona.

Figura 14 – Etapas de elaboração do dispositivo: (A) *layout* desenhado em *Silhouette Studio*, (B) corte do papel adesivo em *Silhouette Cameo 4*, (C) montagem, (D) adição dos reagentes, (E) dispositivo após adição dos reagentes e enzima, (F) obtenção das imagens com *scanner* e análise.



Fonte: elaborado pela autora, 2022.

2.5.2 Estratégia experimental para otimização

Os parâmetros experimentais do método proposto foram otimizados de modo univariado visando alcançar a melhor sensibilidade: *a*) canal de cor RGB (vermelho, verde e azul) ou CMYK (ciano, magenta, amarelo e preto), *b*) volume para zona definição de detecção (0,3, 0,5, 0,7, 1,0 e 1,5 μL), *c*) pH inicial (5,5, 6,0 e 6,5), *d*) substrato de papel (papeis: filtro qualitativo grade 1, Whatman CHR n°1 e CHR 3MM), *e*) concentração de ureia (20, 40, 80 e 120 mM), *f*) concentração do indicador (1, 2, e 3 mM), *g*) modificador da superfície do papel (PSS, PVP, CHI e TEOS). Todos os experimentos no *Multicolor* PAD foram realizados em temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$).

2.5.3 Preparo dos modificadores de superfície

A solução do PSS foi preparada diluindo o estoque (M_w médio ~ 200.000 , 30% em peso em H_2O) para sistemas de trabalho (1, 5 e 10% v/v) em água ultrapura. Para preparar as soluções de PVP (1, 2 e 10% m/v), o sólido foi dissolvido e diluído em água ultrapura, seguido de agitação por 15 min (KHAN *et al.*, 2020). Uma alíquota de 1 μL da solução de PVP ou PSS foi adicionada à zona de detecção, aguardou-se a secagem à temperatura ambiente antes de adicionar os outros reagentes.

A solução estoque (20 mg mL^{-1}) de quitosana (CHI) foi preparada em solução de ácido acético 1% (v/v) e as diluições preparadas em água ultrapura para obter concentrações as 1, 2 e 4 mg mL^{-1} . O papel antes da construção do Multicolor PAD foi imerso por 3 h em temperatura ambiente, seguindo-se com três lavagem usando água ultrapura e finalmente seco em estufa a 37°C por cerca de 4 h (TANG *et al.*, 2020).

O TEOS foi selecionado como agente sililante alternativo, devido à sua menor toxicidade quando comparado a outro precursor de silano. O TEOS foi primeiramente aquecido a 50°C , e a água ultrapura foi adicionada lentamente mantendo-se o percentual de TEOS igual a 20, 50 ou 80% (v/v) sob agitação magnética durante 30 min para garantir o processo de hidrólise. Em seguida, a plataforma de papel antes da construção do Multicolor PAD foi imersa na dispersão hidrolisada de TEOS durante 5 min, retirado e seco a 80°C em estufa durante a noite (GUAN *et al.*, 2020).

2.5.4 Determinação da atividade da urease no Multicolor PAD e parâmetros de mérito

Foi utilizado 1 μL de cada solução de forma independente na seguinte ordem: modificador de superfície (PSS ou PVP preparados em água), ureia (preparada em água), urease padrão (preparada em tampão fosfato de sódio 0,5 mM pH = 7,4) e o indicador (em tampão

fosfato de sódio 0,5 mM, pH = 6,5 ou 5,5). O tempo foi monitorado desde a adição da primeira alíquota na zona de detecção, totalizando 5 min até a análise da variação de cor. As imagens foram adquiridas empregando *scanner* de bancada (300 dpi) e a intensidade de cor no canal ciano (*Cyan*), magenta (*Magenta*), amarelo (*Yellow*) e preto (*Black Key*) (CMYK) a partir da análise das imagens no *software* Corel Photo-Paint™. As curvas analíticas foram construídas diariamente, utilizando papel Whatman CHR 3MM, concentração fixa do modificador de superfície (5% (v/v) para PSS e 2% (m/v) para PVP), da ureia (80 mM) e do indicador (2 mM), diferentes concentrações da urease até atingir o patamar (0 - 6 U mL⁻¹), uma zona de controle (ausência da urease) para determinar a atividade enzimática, e uma zona de referência (ausência de inibidor) para o ensaio IC₅₀.

2.5.5 Determinação da atividade da urease frente inibidores clássicos e em amostras de solos empregando Multicolor PAD

As extrações das ureases do solo e determinação da atividade e inibição da enzima nas amostras de solos e na presença de inibidores clássicos (NBPT, AHA, TU e HU) se procederam de forma análoga ao procedimento utilizado no UrePAD, diferindo apenas no tempo total até a análise empregando o Multicolor PAD (5 min).

2.5.6 Aplicação empregando amostras de salivas sintética e humana

As amostras de saliva sintética foram preparadas com adaptações de diferentes protocolos já descritos (FAWAD, 2015; NOIPHUNG *et al.*, 2018; SCARANO *et al.*, 2010), buscando mimetizar a composição do fluido salivar. A solução de saliva sintética foi preparada com a seguinte composição (g L⁻¹): KCl (0,62), NaCl (0,87), MgCl₂ (0,06), CaCl₂ (0,17), Na₂HPO₄ (0,8), NaF (0,004), xilitol (29,95), ureia (1,0) e 1% de conteúdo proteico, dos quais 25% de amilase e 75% de BSA representando as demais proteínas. O pH da saliva artificial foi ajustado para 6,75 (BALIGA *et al.*, 2013).

As recuperações foram realizadas adicionando-se urease em um sistema estoque e seguindo-se com diluições de quatro vezes para as maiores concentrações de urease (8 e 6 U mL⁻¹) e duas vezes para menores concentrações (4, 2 e 1 U mL⁻¹). Os ensaios de recuperação com amostras de saliva humana (Comitê de Ética em Pesquisa da UFAL – CAAE: 58121322.7.0000.5013) foram procedidos de forma análoga.

As amostras de saliva humana foram coletadas em tubos esterilizados e congeladas até a utilização (- 20 °C), seguindo o protocolo descrito por Reyes *et al.* (2014), com adaptações,

em que foi solicitado jejum de no mínimo 8 h e não higienização da boca até a hora da coleta. A detecção de ureases produzidas por bactérias ureolíticas presentes em amostras de saliva humana foi realizada adicionando 1 μ L de saliva no papel, substituindo a urease padrão dos ensaios de atividade, e um sistema controle sem saliva e um branco (saliva sem adição de ureia).

2.5.7 Métodos de referência e análise estatística

O método do indofenol foi empregado como referência para determinação da atividade da urease em solos e frente aos inibidores clássicos de forma análoga ao procedimento descrito para o UrePAD. Para a determinação das ureases de bactérias ureolíticas da saliva, o método de referência utilizado foi histopatológico e teste rápido de urease realizados por clínicas especializadas com o tecido de estômago retirado durante a endoscopia. Todas as análises foram realizadas em triplicata ($n = 3$) e empregada a equação do ajuste linear para fazer relação com unidades de urease e atividade. Os parâmetros de mérito e os testes estatísticos foram realizados conforme descrito previamente para o UrePAD.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ESTUDOS DE INTERAÇÃO UREASE-MFC

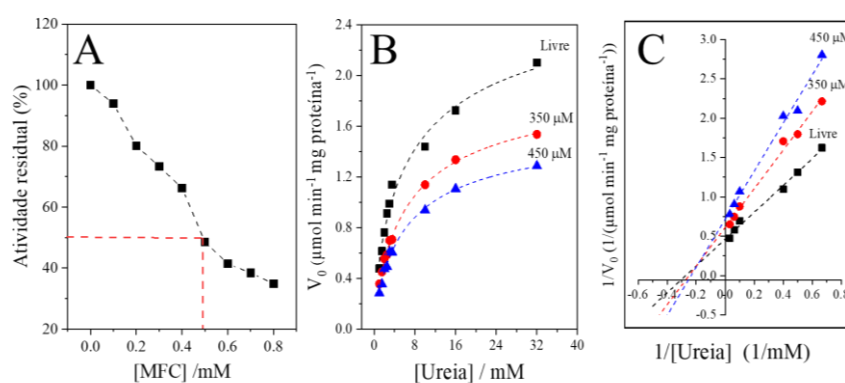
3.1.1 Cinética clássica e inibição *in vitro* da urease

A concentração mínima necessária para reduzir 50% da atividade enzimática (IC_{50}) foi calculada com base no método gráfico de intersecção (Figura 15A) entre o eixo do intercepto (% de inibição) e o valor correspondente à concentração do inibidor no eixo da abscissa, tendo-se como referência (100 % de atividade da enzima) a produção de NH_4^+ em reações da enzima com o substrato na ausência do inibidor (BALTAS, 2017).

O MFC apresentou atividade inibitória frente à Jack bean urease (*Canavalia ensiformis*) com $IC_{50} = 487 \mu M$ similar a compostos sulfurados como captopril ($IC_{50} = 523 \mu M$) e bitionol $IC_{50} = 376 \mu M$) (DÍAZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2016), e outros compostos do tipo α -hidroxicetonas e α -dicetonas ($IC_{50} = 180 - 2900 \mu M$) (UPADHYAY, 2012). Entretanto, o MFC não foi mais ativo do que os inibidores clássicos TU ($IC_{50} = 29,9 \pm 3,9 \mu M$) HU ($IC_{50} = 81,1 \pm 1,0 \mu M$), e NBPT ($IC_{50} = 0,11 \pm 0,02 \mu M$) submetidos às mesmas condições reacionais.

Estudos cinéticos na presença de diferentes concentrações do MFC foram realizados a fim de estabelecer o mecanismo clássico do inibidor. O comportamento hiperbólico típico do gráfico da velocidade inicial *vs.* concentração da ureia indica que a urease é uma enzima Michaeliana (Figura 15B) e os parâmetros cinéticos K_m e V_m determinados a partir do gráfico de Lineweaver–Burk. O K_m e a velocidade máxima (V_{max}) nos sistemas sem inibidor foram, respectivamente 3,67 mM e $2,15 \mu mol NH_4^+ min^{-1} mg^{-1}$ de proteína. A adição do MFC ao meio reacional causou um incremento na concentração dependente de ureia (constante aparente de Michaelis: K'_m) e diminuição de V_{max} (velocidade máxima aparente: V'_{max}). A partir do gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 15C), pode-se inferir que o MFC é um inibidor misto.

Figura 15– (A) Perfil da inibição da atividade da urease com aumento da concentração de MFC, (B) Hipérbole de Michaelis-Menten e (C) Gráfico tipo Lineweaver-Burk para Jack bean urease em diferentes concentrações de ureia e de MFC. Condições: urease 12 mU, tampão fosfato pH 7,4.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Um inibidor misto apresenta retas com intercepção em valores negativos (Figura 15C) no eixo correspondente ao inverso da concentração do substrato no gráfico do duplo-recíproco de Lineweaver-Burk (LAGE *et al.*, 2018). Os inibidores do tipo misto, como o MFC, são capazes de se ligar tanto à enzima livre (formando complexo EI) quanto ao complexo enzima-substrato (formando um outro complexo ESI) (BRITO *et al.*, 2015).

3.1.2 Parâmetros de ligação e avaliação de alterações conformacionais na urease

Para avaliar a interação não-covalente urease-MFC, realizou-se uma titulação espectrofluorimétrica monitorando a fluorescência intrínseca da urease ($\lambda_{em} = 340$ nm), proveniente dos resíduos de Trp e Tir após excitação ($\lambda_{ex} = 280$ nm) (YAN-QING; HONG-MEI, 2012) na ausência e na presença do MFC (0 - 200 μ M) (Figura 16A). A emissão máxima em torno de 340 nm ($\lambda_{em} = 338, 339$ e 340 nm) foi reportada por outros trabalhos (BHOWMICK & JAGANNADHAM 2006; YAN-QING & HONG-MEI; 2012) ao excitar Jack bean urease em 280 nm, indicando que os resíduos de triptofano da urease estão parcialmente protegidos do solvente aquoso. À medida que a concentração do MFC aumentou, ocorreu supressão da fluorescência sem deslocamento do máximo de emissão. O MFC livre não apresenta emissão de fluorescência nesta região, logo não há interferência espectral, indicando que o *quenching* foi devido à formação do complexo urease-MFC.

A análise quantitativa da interação urease-MFC foi realizada pelo tratamento matemático das intensidades de fluorescência na ausência e na presença do MFC, de acordo com a equação de Stern-Volmer, relacionada ao processo de supressão do sinal analítico:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[\text{MFC}] \quad \text{equação (2)}$$

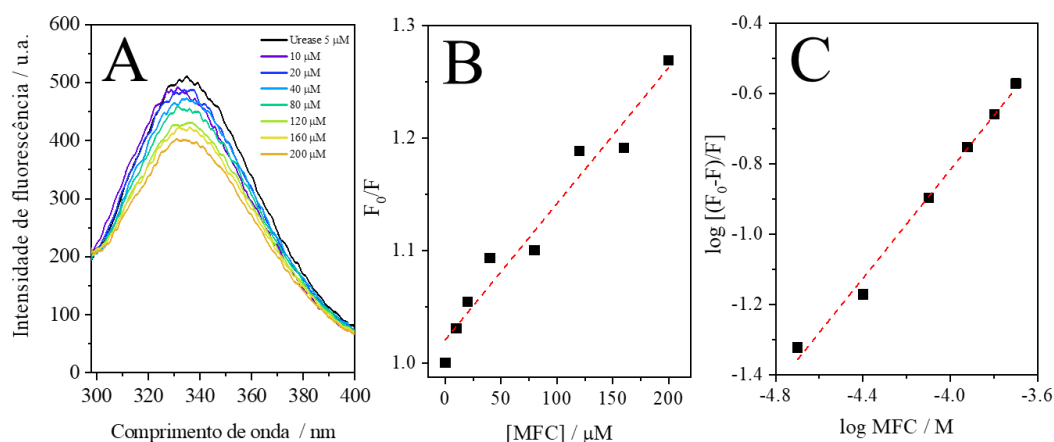
onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do ligante, respectivamente e K_{sv} é a constante de Stern-Volmer (BRAGA *et al.*, 2019). O valor de K_{sv} foi calculado a partir da regressão linear do gráfico de F_0/F vs. $[\text{MFC}]$ (Figura 16B).

A intensidade da interação urease-MFC foi avaliado a partir do cálculo da constante de ligação (K_b), relacionada à força da ligação, e n , que corresponde ao número de sítios de ligação do complexo formado, foram obtidos pela equação a seguir (YAN-QING; HONG-MEI, 2012):

$$\log \left[\frac{(F_0 - F)}{F} \right] = \log K_b + n \log [\text{MFC}] \quad \text{equação (3)}$$

A partir do regressão linear de $\log[(F_0 - F) / F]$ vs $\log[\text{MFC}]$ (Figura 16C), foi possível calcular os parâmetros relacionados a constante de ligação.

Figura 16– (A) Titulação espectrofluorimétrica da urease (5 μM) com MFC (0 - 200 μM); (B) Linearização da equação de Stern-Volmer; (C) Gráfico do duplo logaritmo obter constante de ligação (K_b) e número de sítios de ligação (n). Condições: tampão fosfato 20 mM; pH 7,4 a 30°C.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Os valores de K_{sv} e K_b indicam, respectivamente, a magnitude da supressão de fluorescência e intensidade da ligação urease-MFC (Tabela 2), os quais são relativamente menores quando comparados a íons metálicos (Cu(II) e Cr(VI)) e (+)-ácido úsnico, que, assim como MFC, é um derivado natural.

Tabela 2 – Parâmetros de ligação para a interação da urease com diferentes ligantes a 30°C.

Ligante	Constante de Stern-Volmer		Parâmetros de ligação			Referência
	K_{sv} (10^3 L mol^{-1})	r	K_b (10^3 L mol^{-1})	r	n	
MFC	1,30	0,991	0,18	0,989	0,77	Este trabalho
Cu(II)	11,3	0,985	0,40	0,993	0,56	YAN-QING <i>et al.</i> , 2012
Cr(VI)	20,6	0,999	19,6	0,999	0,96	ZHANG <i>et al.</i> , 2009
(+)-ácido úsnico	50,5	0,995	355	0,982	1,42	LAGE <i>et al.</i> , 2018

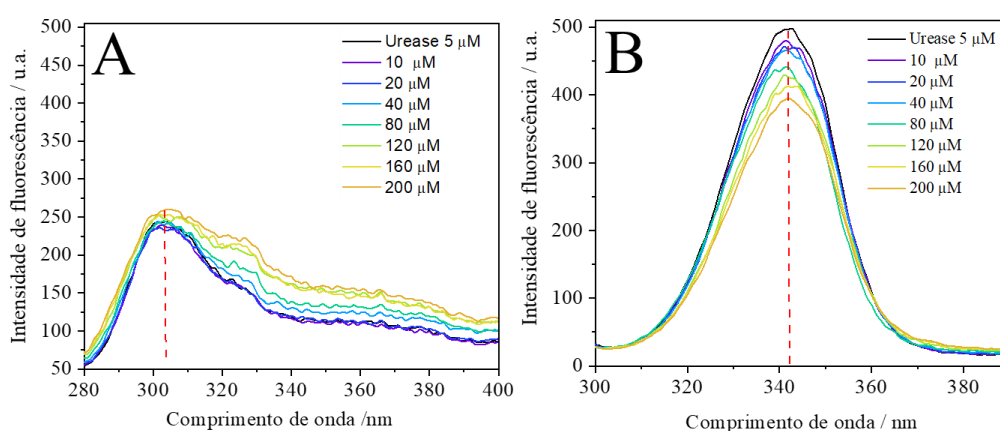
Fonte: elaborado pela autora, 2020.

O valor de n próximo a 1 indica que a estequiometria do complexo urease-MFC é 1:1, ou seja, há um sítio preferencial de ligação na enzima para interação com MFC, resultando na supressão da fluorescência (BRAGA *et al.*, 2019; LAGE *et al.*, 2018).

A técnica de espectroscopia de fluorescência sincronizada apresenta maior sensibilidade do que a fluorescência normal, além de simplificação e resolução espectral devido ao estreitamento das bandas, e maior seletividade (YAN-QING *et al.*, 2011; RAHIMPOUR *et al.*, 2021). Empregando essa técnica foi possível monitorar os resíduos de Trp e Tir separadamente e avaliar qual microambiente foi mais afetado no processo de interação, uma vez que a urease

contém quatro resíduos de Trp (495, 648, 708 e 728) e 19 resíduos de Tir (18, 32, 46, 171, 179, 188, 279, 283, 306, 349, 410, 417, 544, 676, 693, 750, 778, 814 e 837) (YAN-QING *et al.*, 2012). Para isso, manteve-se constante um intervalo de comprimento de onda entre os monocromadores de excitação e emissão, sendo para Tir ($\Delta\lambda = 15$ nm) (Figura 17A) e para Trp ($\Delta\lambda = 60$ nm) (Figura 17B). Além disso, essa técnica permite inferir sobre mudanças na polaridade do microambiente desses aminoácidos na presença do ligante (LAGE *et al.*, 2018)

Figura 17 – Espectros obtidos para a titulação da urease com MFC empregando fluorescência sincronizada para o resíduo de A) Tir e B) Trp com adição de MFC (0 - 200 μM). Condições: Urease (5 μM), tampão fosfato 20 mM, pH 7,4 a 30°C.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

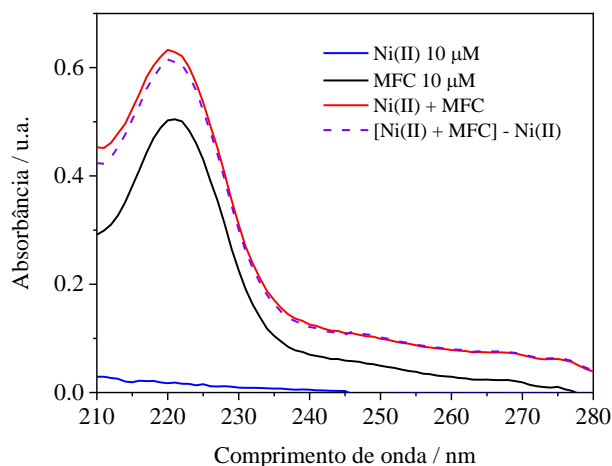
Com o aumento da concentração do MFC não houve deslocamento no λ_{max} , ou seja, a polaridade dos microambientes de Tir e Trp não são afetados na presença do ligante. Entretanto, ocorreu a supressão da fluorescência em ambos os sistemas com o aumento da concentração do MFC, sendo mais efetiva para os resíduos de Trp ($1,28 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$), em comparação a Tir ($0,59 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$). Esses resultados reforçam a atuação do MFC como inibidor misto, pois os resíduos Trp495 e Trp648 estão distantes do sítio catalítico (BRAGA *et al.*, 2019; LAGE *et al.*, 2018). Como consequência, pode-se inferir que ocorreram mudanças conformacionais na enzima, em decorrência das variações nesses microambientes, as quais influenciam no mecanismo de inibição.

3.1.3 Avaliação do processo de interação no sítio ativo da urease

Como o MFC é um ligante misto, ele pode atuar tanto no sítio ativo, como em um sítio alostérico da enzima. Nesse sentido, para mimetizar o sítio ativo foram realizados ensaios do MFC com o íons Ni(II) por absorção no UV e ensaios de competição frente aos inibidores

competitivos clássicos por fluorescência molecular. A capacidade do MFC em coordenar com os íons Ni(II) em solução foi realizado considerando as espécies livres e na proporção 1:1 (Figura 18). A solução de Ni(II) não apresentou absorvância significativa na região espectral avaliada (210 - 280 nm).

Figura 18 – Espectros de absorvância molecular para os sistemas Ni(II), MFC e Ni(II): (1:1). Condições: tampão fosfato 20 mM, pH 7,4 a 30°C.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

O sistema Ni(II) + MFC (1:1) apresentou maior absorvância do que o MFC livre, assim, a subtração do espectro do Ni(II) livre do espectro do complexo [MFC-Ni(II) - Ni(II)] não levou à sobreposição do espectro do MFC livre, indicando que o perfil obtido não é relativo ao efeito aditivo da lei de Beer. Esses resultados podem ser extrapolados à enzima e corroboram com outros estudos, em que doadores de elétrons como N, O e S podem interagir com os íons níquel presentes no sítio ativo da urease, contribuindo para o processo de inibição (DONG *et al.*, 2012; KAFARSKI & TALMA, 2018).

Foi avaliada a influência do substrato (ureia) e de alguns inibidores clássicos (TU, HU e NBPT) na interação da urease-MFC através do ensaio de competição. Este ensaio consiste em titulações espectrofluorimétricas independentes entre MFC e urease, na ausência e na presença do substrato ou dos inibidores clássicos. Assim, para cada sistema foi calculada a constante de ligação. Desta forma, foi empregado como critério de avaliação a razão das constantes de ligação (K_b'/K_b), em que K_b' e K_b são, respectivamente, a constante de ligação na presença e na ausência do competidor. A formação de complexo urease-MFC é favorecida quando $K_b'/K_b > 1$, enquanto $K_b'/K_b < 1$ indica que a formação do complexo é desfavorecida (Tabela 3).

Tabela 3 – Razão entre as constantes de ligação do MFC com a urease na ausência (K_b) e na presença do substrato ou inibidores competitivos clássicos (K_b').

Critério	Competidores			
	Substrato	Inibidores competitivos		
K_b'/K_b	Ureia	HU	TU	NBPT
	$0,358 \pm 0,003$	$0,285 \pm 0,003$	$0,323 \pm 0,003$	$0,177 \pm 0,004$

K_b' = Constante de ligação na proporção 1:5 urease: substrato/inibidor e MFC (10 - 200 μ M).

Na presença do competidor, K_b' diminui, o que implica em $K_b'/K_b < 1$ como consequência da maior afinidade da enzima pelo substrato ou inibidor clássico no sítio ativo, dificultando a interação do MFC nessa região, o qual pode interagir no sítio alostérico. O estudo de competição permitiu avaliar apenas se houve interação com o sítio ativo da enzima, não sendo possível avaliar o sítio alostérico. Contudo, os estudos por fluorescência sincronizada indicaram a interação no sítio alostérico, como regiões próximas aos resíduos de triptofano, corroborando com os resultados de cinética clássica.

Uma vez que o MFC é um inibidor misto de urease, e que o carbono do grupo $S=C=N$ atua como um centro eletrofílico eficiente, é possível que a inibição da urease pelo MCF seja também resultado de reações com grupos nucleofílicos presentes na urease, como aminas/guanidinas, e tióis, além do processo de interação. Nesse sentido, buscou-se elucidar o mecanismo de inibição monitorando estes grupos em sistemas modelo e na enzima a partir de ensaios seletivos.

3.1.4 Avaliação do mecanismo de inibição baseado em reações químicas

Inicialmente os ensaios se procederam com os aminoácidos livres (cisteína, lisina e arginina), uma vez que Jack bean urease (*Canavalia ensiformis*) possui cerca de 27-35 resíduos de cisteína, mas apenas Cis592 (grupo tiol reduzido) é essencial para atividade enzimática e está na região rica em histidina próximo ao sítio catalítico. No sítio ativo também possui Arg609 que pode participar de reação com compostos contendo centros eletrofílicos (DONG *et al.*, 2013; TAKISHIMA; SUGA; MAMIYA, 1988). Além disso, a urease possui 49 resíduos de lisina, dentre os quais 14 foram suscetíveis a modificações no trabalho apresentado por Guerra *et al.* (2013), indicando a disponibilidade de grupos aminas para reação. Portanto, a inibição da urease pode estar relacionada à ligação do MCF aos resíduos de Lis, Cis, ou Arg, presentes ou não no sítio ativo (Cis592, Arg609, Lis319, Cis443, Lis612, Lis613, Arg611, Arg639, Arg646).

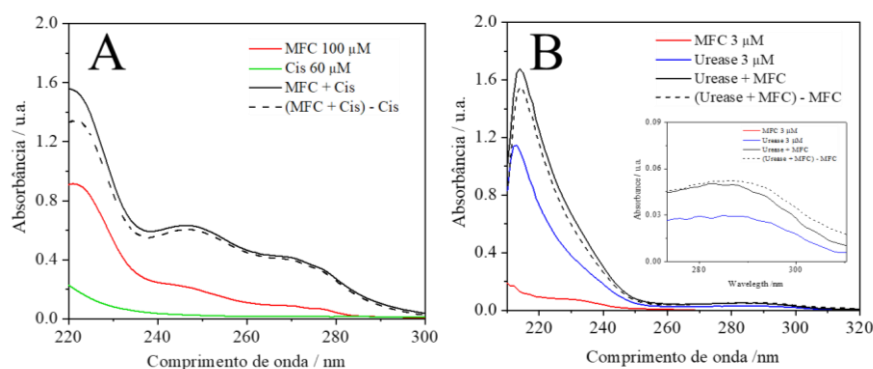
3.1.4.1 Avaliação da reação do isotiocianato com o grupo tiol

Isotiocianatos reagem com tióis formando, preferencialmente, ditiocarbamatos (KASCHULA; HUNTER, 2016; SHIBATA *et al.*, 2011). Considerando a presença de resíduos

de aminoácidos com tiol livre na estrutura urease, ensaios seletivos são importantes para compreensão do mecanismo de inibição da urease por isotiocianatos. Inicialmente, a reação entre estes diferentes sistemas foi monitorada por UV a partir dos espectros de absorção molecular do MFC, da cisteína (modelo) e do produto da reação MFC + cisteína (Figura 19A), MFC e urease livres e, urease + MFC (Figura 19B). É possível observar que o MFC tem λ_{\max} em 220 nm e outras duas bandas em 245 e 270 nm, enquanto a Cis apresenta λ_{\max} em 220 nm (Figura 19A). Por outro lado, a urease apresenta λ_{\max} em 220 e 280 nm, sendo a última, correspondente às transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ dos resíduos de Phe, Tir e Trp da urease (Figura 19B) (YAN-QING; HONG-MEI, 2012).

O espectro de absorção do produto formado entre MFC e Cis apresentou aumento significativo na absorbância e o espectro de absorção resultante da subtração do espectro do produto formado e da cisteína livre [(MFC + Cis) - Cis] não é sobreponível ao espectro do MFC livre. O mesmo se observa para [(MFC + Urease) - MFC], e um deslocamento de 2nm para o azul (MFC + urease) em relação à urease livre, indicando que ocorreu interação (e não efeito aditivo da lei de Beer) e mudanças conformacionais na urease (LYRA *et al.*, 2020).

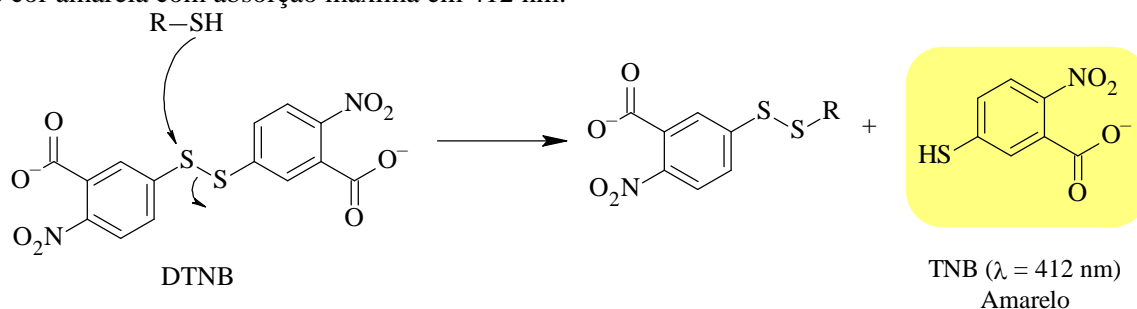
Figura 19 – Espectro de absorção molecular no UV para os sistemas (A) MFC (100 μM) e Cis (60 μM) livres, MFC + Cis; (B) MFC (3 μM) e urease (3 μM) livres, MFC + urease. Condições: tampão fosfato 20 mM, pH 7,4 a 30°C.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Foi realizado o ensaio de Ellman, que é empregado para a quantificação de tióis livres com base na formação de um cromóforo (TNB, $\lambda_{\max} = 412 \text{ nm}$), como resultado da reação entre ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) e o grupo tiol (ELLMAN *et al.*, 1961) (Figura 20).

Figura 20 - Reação geral do ensaio de Ellman entre 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico ácido (DTNB) e um grupo tiol livre. Os produtos da reação são um dissulfeto misto e um ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) de cor amarela com absorção máxima em 412 nm.

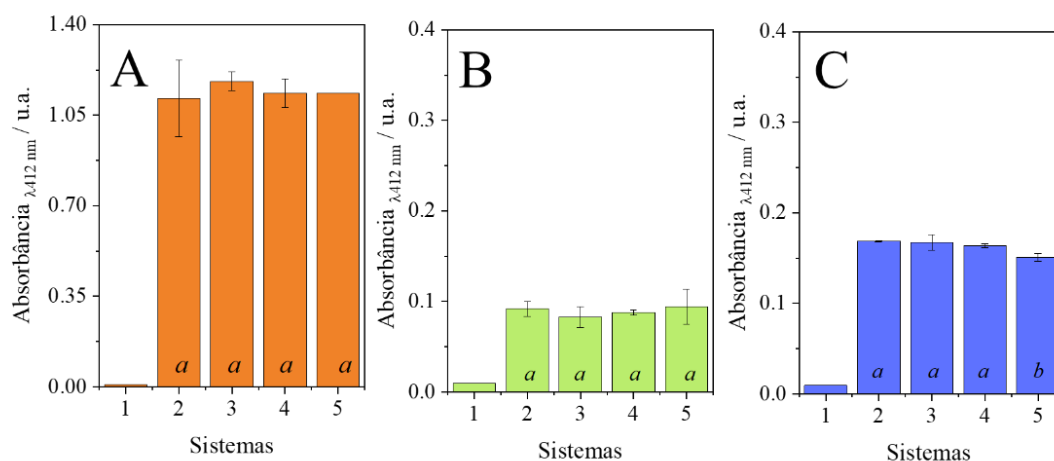


R-SH = AMP, Cis ou urease

Fonte: elaborado pela autora, 2021.

O ensaio de Ellman foi realizado com ácido 3-mercaptopropiônico (AMP) (Figura 21A), cisteína (Cis) (Figura 21B) e urease (Figura 21C) como fontes de grupo tiol (R-SH) na presença e na ausência do MFC. A referência consiste numa solução contendo DTNB + R-SH. Na presença do ligante a adição do DTNB foi realizada após 1 h de incubação entre R-SH e MFC. A quantidade de TNB gerada se correlaciona com o conteúdo reduzido de tiol e pode ser medida espectrofotometricamente. Quanto menos grupo RSH livre, menor o sinal de TNB, indicando que RSH reagiu com MFC.

Figura 21 – Absorbâncias em 412 nm: (A) AMP; (B) Cis e (C) Urease. (1) = DTNB (50 μM); (2) = R-SH (50 μM de AMP ou Cis e 5 μM de urease) + DTNB; (3, 4 e 5) = R-SH + MFC (50 μM , 100 e 200 μM , respectivamente). Condições: tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, 30°C.



Avaliação estatística dos resultados ($n=3$) empregando ANOVA e teste de Tukey a 95% de confiança ($p < 0,05$). Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as condições para o mesmo parâmetro.

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Para os sistemas contendo AMP e Cis não há diferença significativa entre as absorbâncias para as diferentes concentrações de MFC (ANOVA One-Way, $p_{\text{AMP}} = 0,781$ e $p_{\text{Cis}} = 0,477$; $\alpha = 0,05$). Para a urease, há diferença significativa entre o sistema Urease + MFC 200

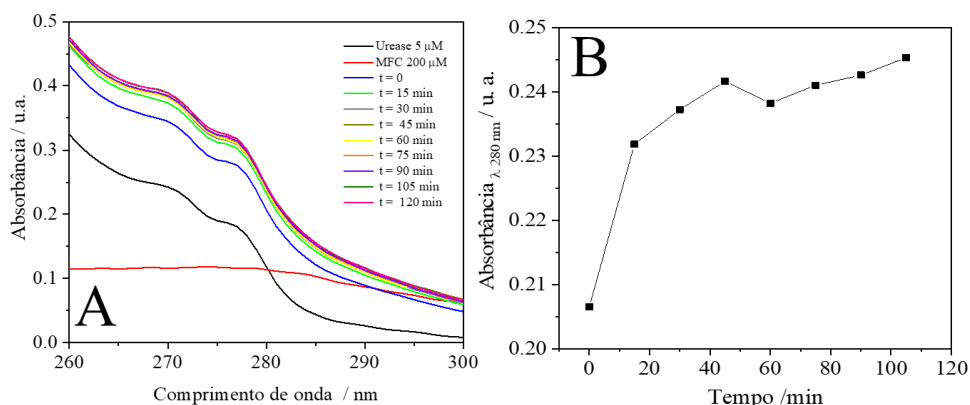
μM e os demais sistemas (ANOVA One-Way, $p = 0,008$; $\alpha = 0,05$). Com isso, pode-se inferir que a não variação da absorbância quando comparada aos sistemas de referência (DTNB + R-SH) indica que os grupos tíóis apresentam a mesma disponibilidade para reagir com DTNB independentemente da concentração de MFC, com exceção para Urease + MFC 200 μM . Este resultado deve estar relacionado à reversibilidade da reação entre o grupo isotiocianato do MFC e os grupos tíóis como apresentado por Nakamura *et al.* (2009) e Kühn *et al.* (2018) ao avaliarem a reação entre Cis34 da BSA com isotiocianato alifático; e cisteína da caseína e isotiocianatos alifáticos e benzilisotiocianatos, respectivamente (JAJA-CHIMEDZA *et al.*, 2018; NAKAMURA *et al.*, 2009).

Nesse contexto, vale destacar o trabalho realizado por Fahey *et al.* (2013), que avaliou a inativação da urease de *H. pylori* por sulforafanos e isotiocianatos (FAHEY *et al.*, 2013). Os autores indicaram inativação da enzima por interação covalente irreversível com grupo tiol da Cis592 da urease, formando os ditiocarbamatos correspondentes, os quais absorvem fortemente entre 250-330 nm.

No presente trabalho realizou-se um estudo cinético por UV até 120 min (Figura 22A-B), para o sistema urease + MFC, e observou-se variação da intensidade de absorbância ($\lambda = 280$ nm), indicando que ocorre reação entre a urease e MCF. Diferente do reportado por Fahey *et al.* (2013), consideramos que devido à presença de outros grupos funcionais de resíduos de aminoácidos presentes na enzima (Lis e Arg) passíveis de reação com isotiocianato e reversibilidade da reação para Cis, não se pode afirmar de forma inequívoca que ocorreu bloqueio do grupo tiol da urease.

Além disso, o comportamento observado nos estudos de Fahey *et al.* (2013) pode estar associado ao excesso de ligante empregado (até 740 μM). A reação de formação de ditiocarbamatos é reversível, mas as tioureias geradas a partir da reação entre isotiocianatos e grupos amina/arginina são estáveis (JAJA-CHIMEDZA *et al.*, 2018). Logo, foram realizados ensaios com a lisina/arginina e o MFC, pois a urease apresenta resíduos de lisina (Lis612) e arginina (Arg609) disponíveis para reações (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2013; CARTER *et al.*, 2009; IKRAM *et al.*, 2013; MAZZEI *et al.*, 2017).

Figura 22 – (A) Avaliação cinética (0-120 min) para urease (5 μ M) + MFC (200 μ M) na região UV. (B) Absorbância em 280 nm (0 - 120 min). Condições: tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4 a 30 °C.



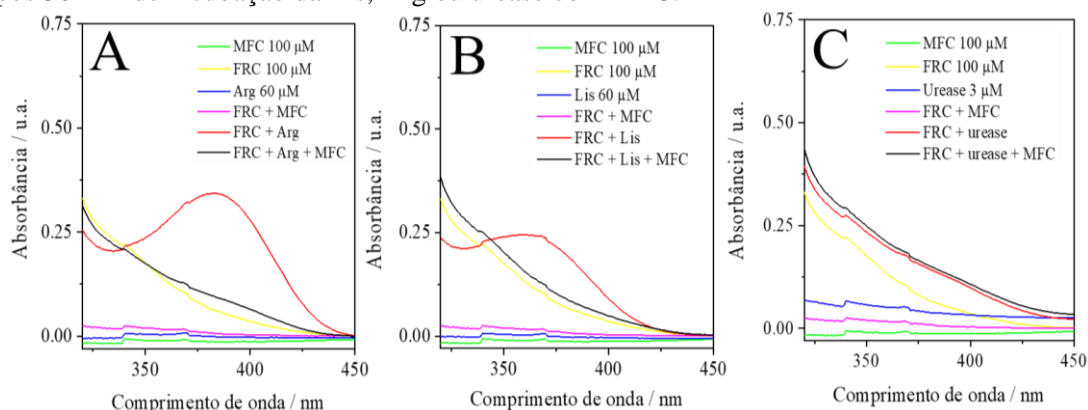
Fonte: elaborado pela autora, 2020.

3.1.4.2 Avaliação da reação com grupos amina/guanidina

Isotiocianatos reagem com aminas formando tioureias (NAKAMURA *et al.*, 2009), a partir da reação entre o par solitário de nitrogênio amínico que ataca o centro de carbono eletrofílico do isotiocianato (WAHID *et al.*, 2020). Assim, para monitorar reações entre grupos amina de aminoácidos modelos e resíduos presentes na urease e o MFC, foi empregada a sonda fluorescamina (FRC) que é utilizada para a determinação de grupos amina/guanidina, devido à formação de um cátion fluorescente, o qual pode ser monitorado por UV-vis com $\lambda_{\text{max}} = 380$ nm e por fluorescência $\lambda_{\text{em}} = 485$ nm (MOHAMMED; BADR EL-DIN; DERAYEA, 2018). Os ensaios foram realizados com lisina e arginina como fontes de grupo amina, além da urease. O monitoramento do perfil espectral na região do UV-vis empregando a fluorescamina foi realizado na ausência e na presença do MFC (Figura 23).

Nas Figuras 23A e B observa-se um comportamento similar das absorbâncias resultantes da reação entre fluorescamina e grupo amina de Arg ou Lis, com $\lambda_{\text{max}} = 380$ nm. A incubação do MFC com Lis e Arg resultou em menor disponibilidade de grupo amina livre para reagir com a sonda, acarretando uma diminuição na absorbância e indicando que o grupo isotiocianato do MFC reage com as aminas estudadas. Para o sistema contendo urease (Figura 23C), observa-se que a enzima possui grupos aminos disponíveis para reagir com a sonda, entretanto com a adição do MFC não foi observado mudança significativa no perfil espectral.

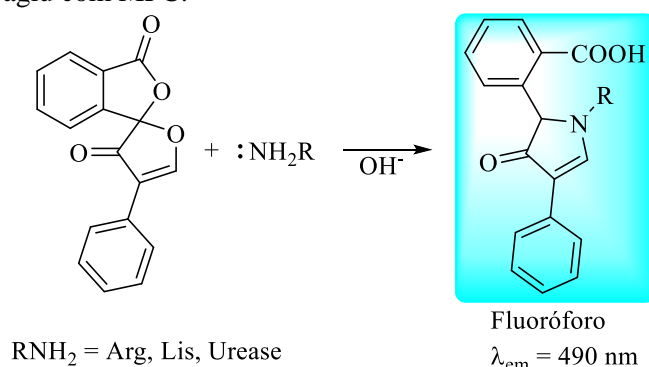
Figura 23 – Espectros de absorção molecular no UV-vis na presença da fluorescamina para os sistemas contendo MFC e fontes de grupo amina (A) Arg (B) Lis e (C) urease. Condições: MFC e FRC a 100 μM ; Lis, Arg a 60 μM ; Urease 3 μM ; tampão fosfato 20 mM; pH 7,4 a 30 $^{\circ}\text{C}$. A sonda foi adicionada após 30 min de incubação da Lis, Arg ou urease com MFC.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

De forma análoga, foram realizados ensaios por fluorescência molecular, para compreender a reação entre o MFC e os grupos amino presentes na urease. Os grupos amino reagem com a fluorescamina formando um fluoróforo (Figura 24), cuja intensidade de fluorescência ($\lambda_{em} = 485 \text{ nm}$) é proporcional à concentração da amina primária livre no sistema. Por fluorescência molecular foi possível monitorar a supressão da fluorescência (Figura 25C) causada pela presença do MFC, o que não foi possível por UV-vis, devido a maior sensibilidade do sistema por fluorescência quando comparado com UV-vis.

Figura 24 - Reação da fluorescamina com grupo amina, formando um produto fluorescente. A quantidade de fluoróforo gerada se correlaciona com a quantidade de grupo amina disponível e pode ser medida espectrofluorimetricamente. Quanto menos grupos RNH_2 livres, menor o sinal do fluoróforo, indicando que RNH_2 reagiu com MFC.

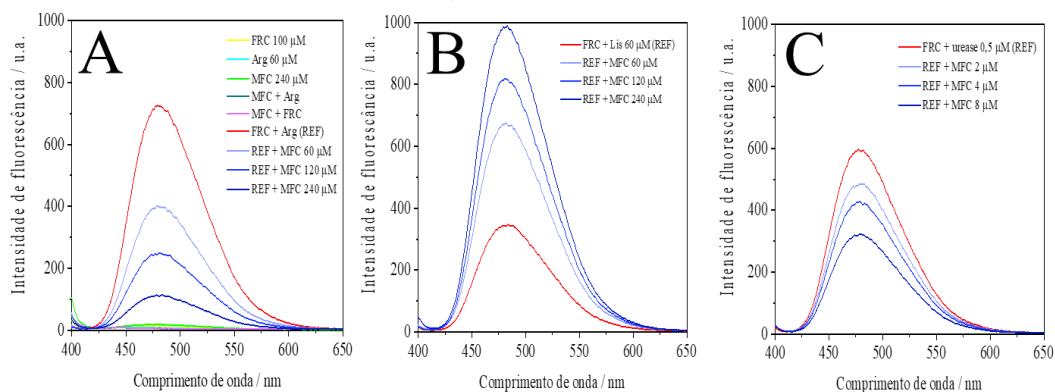


Fonte: elaborado pela autora, 2021.

A sonda não reage com o MFC (Figura 25), entretanto a presença do ligante MFC levou à supressão do sinal da fluorescência em relação ao sistema de referência (urease + FRC ou arginina + FRC, Figura 25A e C), que está relacionada à menor disponibilidade de grupos amino

presentes na urease e na arginina para reagir com a fluorescamina, devido a reação desses grupos com o isotiocianato do MFC.

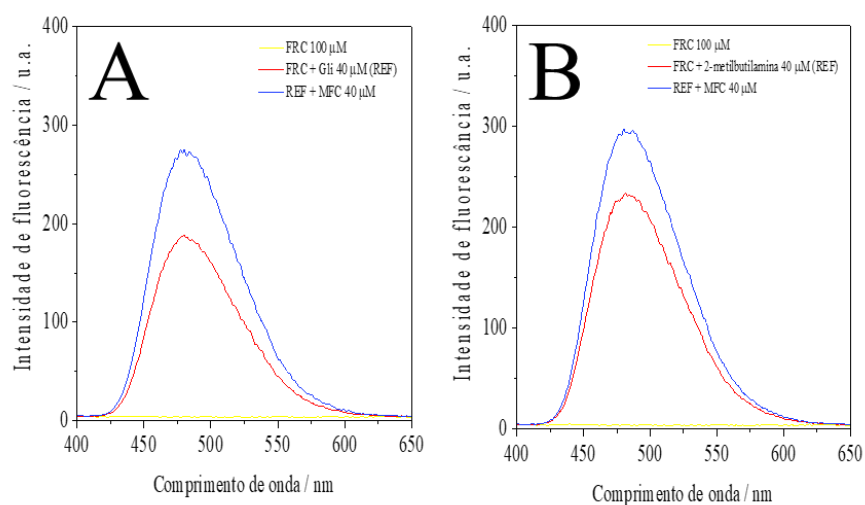
Figura 25 – Fluorescência molecular dos sistemas (A) Arg, (B) Lis e (C) urease na presença da sonda FRC e diferentes concentrações de MFC (60, 120 e 240 μM para Arg e Lis e 2, 4 e 8 μM para urease). Condições: Lis e Arg (60 μM); Sonda (100 μM) em todos os sistemas; tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4 a 30 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 385 \text{ nm}$; *slit* 3 \times 5 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$).



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Para o sistema contendo lisina (Figura 25B), a intensidade de fluorescência aumentou com a concentração de MFC, que pode estar relacionado à formação de um subproduto fluorescente, evidenciando a reatividade do MFC com a lisina. Adicionalmente, a formação desse subproduto também foi observada para outras aminas (glicina, 2-metilbutilamina), MFC e fluorescamina (Figura 26).

Figura 26 – Fluorescência molecular dos sistemas (A) Gli, (B) 2-metilbutilamina na presença da sonda FRC e MFC. Condições: (A), (B) e MFC (40 μM); FRC (100 μM) em todos os sistemas; tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4 a 30 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 385 \text{ nm}$; *slit* 3 \times 5 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$).



Fonte: elaborado pela autora, 2020

As possíveis estruturas dos artefatos não foram investigadas, mas continua evidenciando a reatividade do grupo isotiocianato presente no MFC e grupos amina. Por fim, a reatividade dos aminoácidos, Cis, Lis e Arg com MFC avaliados por UV-vis e fluorescência molecular também foi investigada por espectrometria de massas a fim de obter uma proposta estrutural dos produtos majoritariamente formados e responsáveis por alterações na atividade da urease.

3.1.4.1 Avaliação dos produtos majoritários das reações de Cis, Lis e Arg com MFC por Espectrometria de Massas (MS)

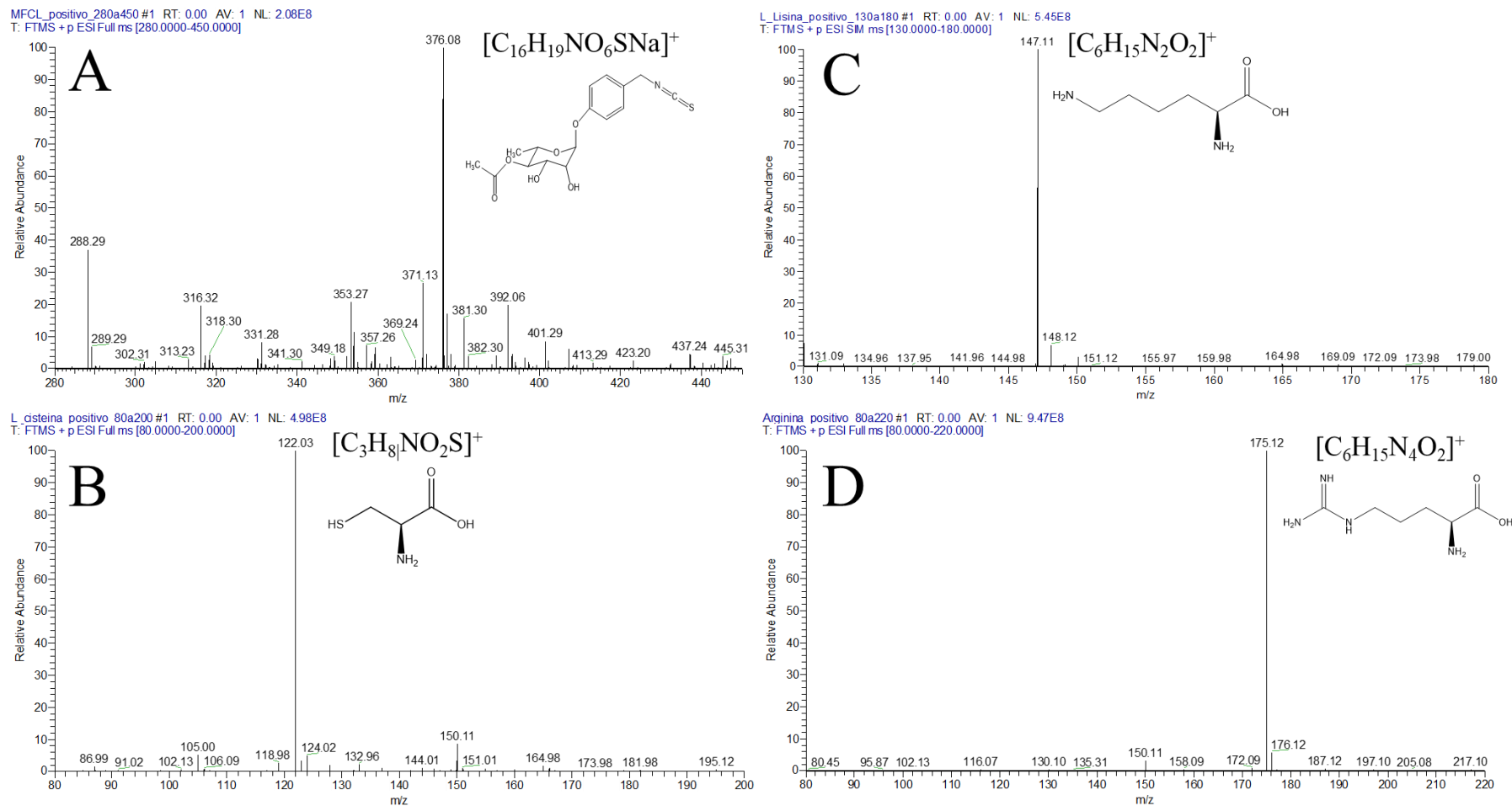
Foram obtidos espectros do MFC e dos aminoácidos livres (Figura 27 A-D) por ESI(+)-MS, sendo o MFC identificado como aduto de sódio $[M+23]^+$ e para os sistemas MFC:Cis, MFC:Lis e MFC:Arg na proporção (1:1) por ESI(-)-MS (Figura 28 A-C). Os íons moleculares esperados foram fragmentados para confirmação dos produtos (Figura 28 D-F). A partir dos dados obtidos nos espectros de massas, a Tabela 4 foi construída para sumarizar os resultados

Tabela 4 – Dados obtidos por ESI-MS para as reações entre os aminoácidos Cis, Lis e Arg com MFC.

Sistema	Fórmula molecular	Ionização	Íon molecular	m/z obtida	Erro (ppm)
MFC	$C_{16}H_{19}NO_6S$	ESI(+)	$[C_{16}H_{19}NO_6SNa]^+$	376,01	0,10
Cis	$C_3H_7NO_2S$	ESI(+)	$[C_3H_8NO_2S]^+$	122,03	0,69
Lis	$C_6H_{14}N_2O_2$	ESI(+)	$[C_6H_{15}N_2O_2]^+$	147,11	-0,50
Arg	$C_6H_{14}N_4O_2$	ESI(+)	$[C_6H_{15}N_4O_2]^+$	175,12	-0,12
MFC:Cis	$C_{19}H_{26}N_2O_8S_2$	ESI(-)	$[C_{19}H_{25}N_2O_8S_2]^-$	473,11	3,00
MFC:Lis	$C_{22}H_{33}N_3O_8S$	ESI(-)	$[C_{22}H_{32}N_3O_8S]^-$	498,19	3,80
MFC:Arg	$C_{22}H_{33}N_5O_8S$	ESI(-)	$[C_{22}H_{32}N_5O_8S]^-$	526,20	1,80

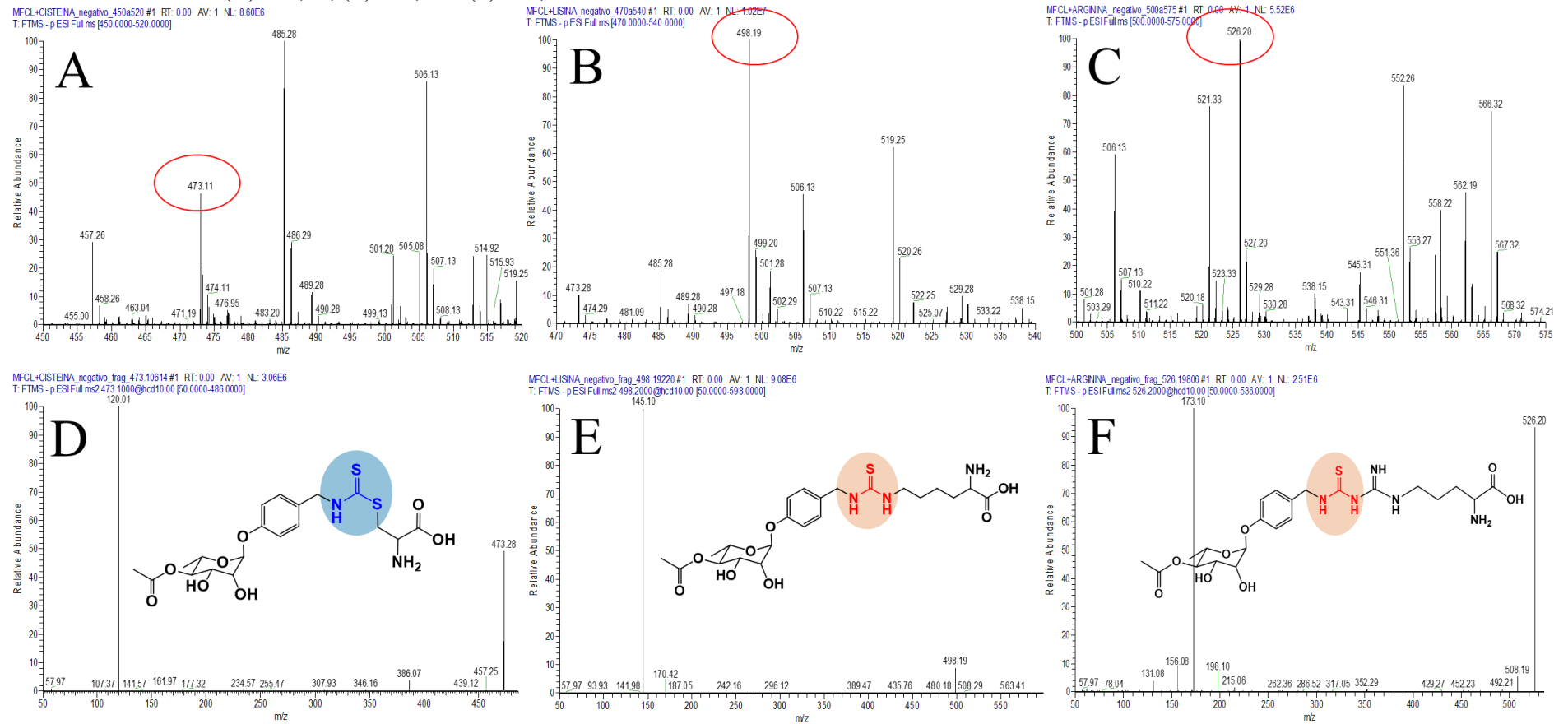
Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Figura 27 – Espectros de massas para (A) MFC livre – aduto de sódio, e dos aminoácidos livres (B) cisteína, (C) lisina e (D) arginina.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

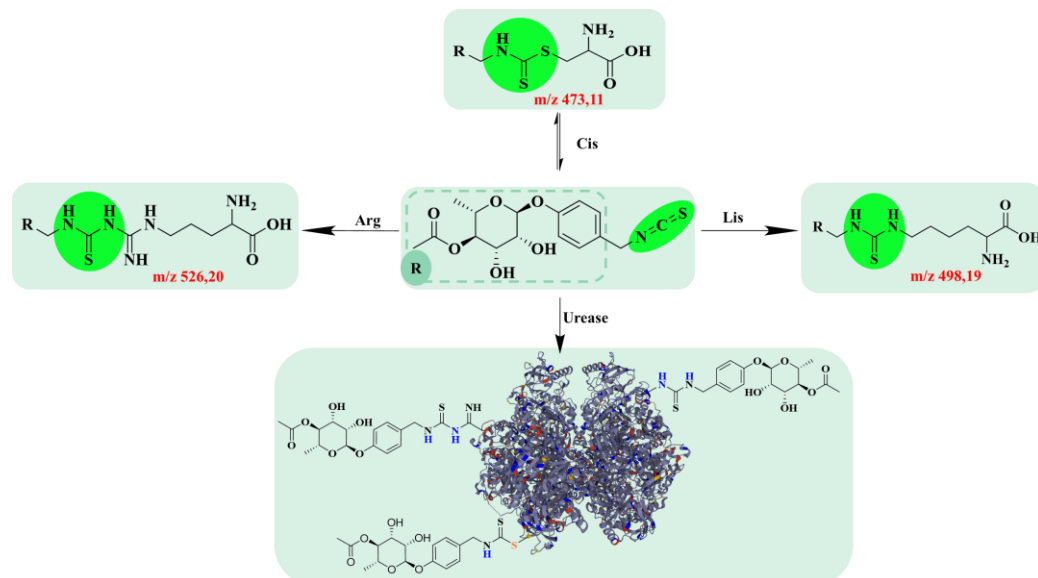
Figura 28 – Espectros de massas obtidos por ESI(-)-MS para os sistemas (A) MFC:Cis, (B) MFC:Lis e (C) MFC:Arg na proporção (1:1), e fragmentação dos íons moleculares m/z (D) 473,11; (E) 498,19 e (F) 526,20.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

As razões m/z dos íons moleculares majoritários obtidos para os sistemas dos aminoácidos com MFC correspondem aos respectivos ditiocarbamato e tioureias, os quais foram fragmentados (Figura 28D-F), reforçando a formação dos produtos esperados (tioureias e ditiocarbamatos) quando o MFC interage com a urease (Figura 29). Tioureias e seus derivados são considerados bons inibidores clássicos de urease (WAHID *et al.*, 2020; BRAGA *et al.*, 2019; ARAUJO *et al.*, 2015) e, assim, a formação de um aduto contendo tioureia contribui para a inibição da enzima.

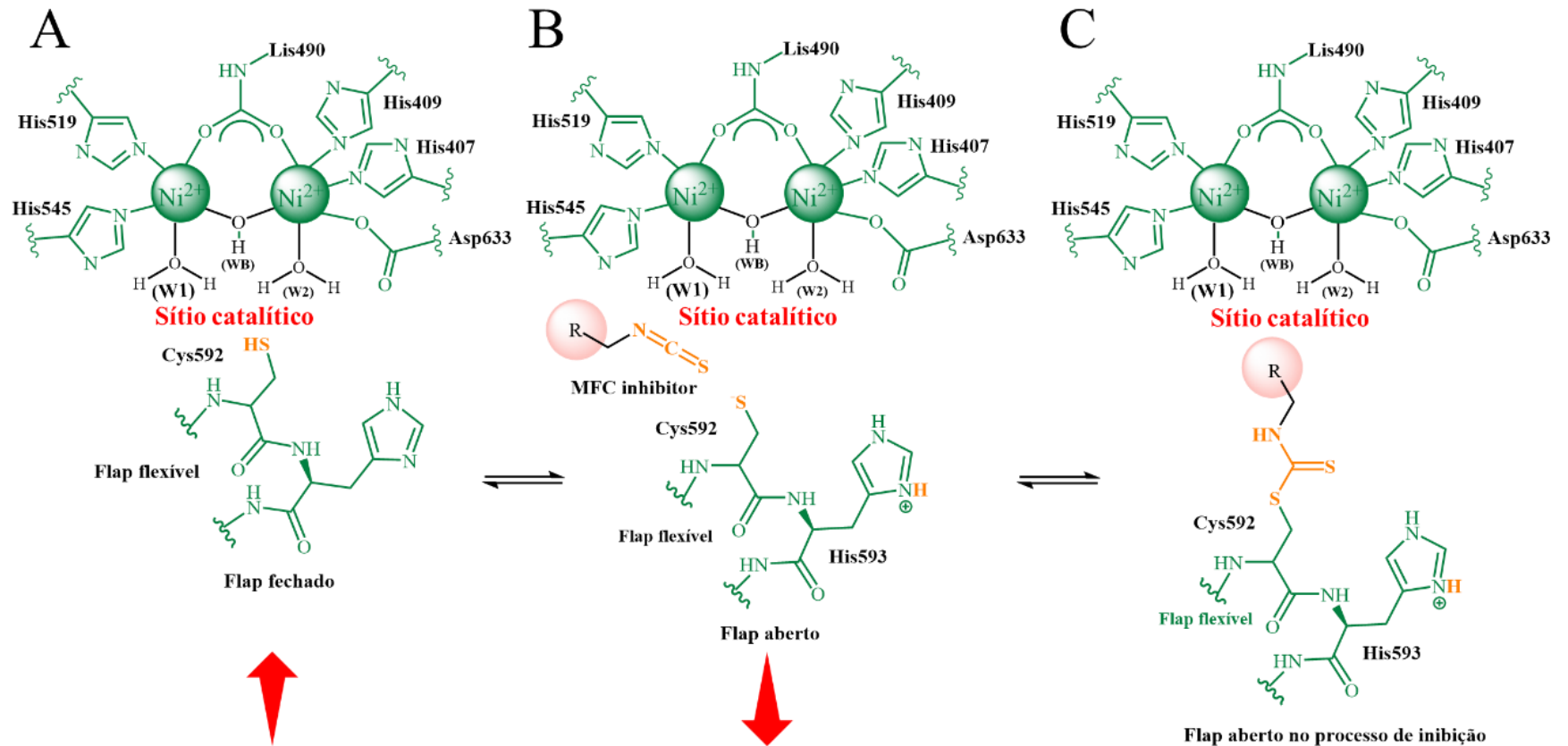
Figura 29 – Adutos formados pela reação entre o grupo isotiocianato do MFC + tiol, amina/guanidina dos resíduos de Cis, Lis e Arg, formando ditiocarbamato e tioureias, respectivamente; e representação genérica dos adutos na estrutura da urease.



Legenda: Estrutura polimérica em cinza; resíduos em amarelo = Cis; em vermelho = Arg; em azul = Lis
Fonte: elaborado pela autora, 2020.

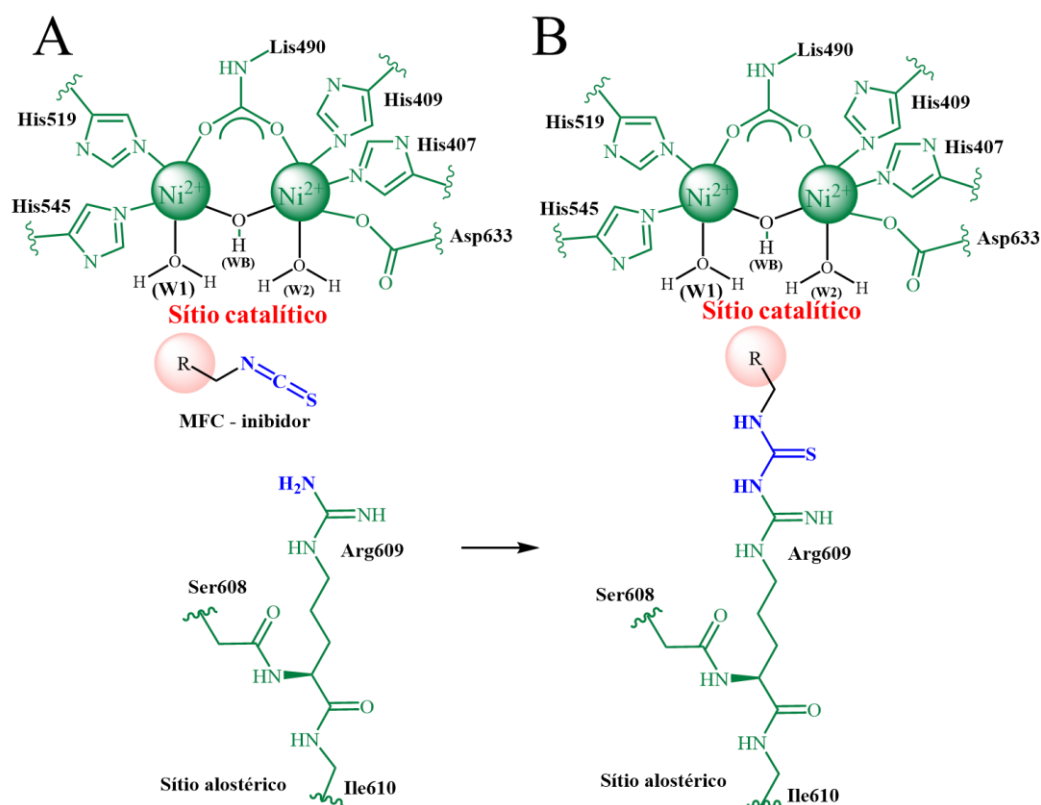
Nesse sentido, foi apresentada uma proposta de mecanismo para a inibição da urease pelo MFC envolvendo um resíduo modelo de Cis, Arg e Lis. O resíduo Cis592 em Jack bean urease é importante para o *flap* móvel do sítio ativo e para a catálise da ureia através de um processo aberto-fechado-aberto (LU *et al.*, 2021; DÍAZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2016). A reação do MFC com o grupo tiol de Cis592 (Fig. 30A-C) restringe a mobilidade do *flap*, resultando em uma diminuição da atividade enzimática.

Figura 30 - Esquema do mecanismo químico proposto para inibição da urease pelo MFC. A) A urease livre com flap fechado e sítio catalítico livre para hidrólise da ureia; B) presença do MFC na região do flap aberto para inicialização da reação; C) Formação do aduto ditiocarbamato entre MFC e Cys592 reduzindo a mobilidade do flap e bloqueando o sítio ativo.



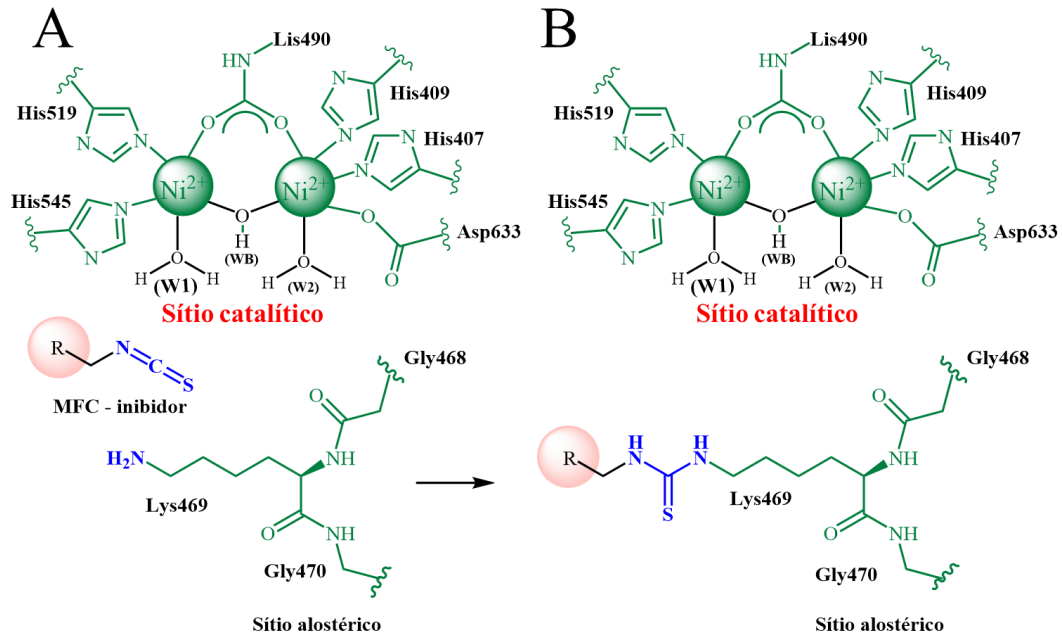
Os resíduos de arginina são importantes para a atividade da urease, tais como Arg439 na região do *flap*, que participa da ligação do substrato estabilizando o estado de transição juntamente com Ala440 e Ala636 (LU *et al.*, 2021) e o resíduo Arg609 próximo ao sítio ativo que já foi demonstrado como atuante no processo de interação com outros inibidores de urease (ÖZIL *et al.*, 2021; RAUF *et al.*, 2015). Nesse sentido, foi apresentada uma proposta de mecanismo usando Arg609 como modelo (Figura 31A-B).

Figura 31 - Reação entre MFC e resíduo de Arg609 próximo ao sítio ativo. A) Aproximação do inibidor; B) Formação do aduto tioureia pela reação entre MFC e grupo $-RNH_2$ presente na arginina reduzindo a atividade da urease.



A abundância de resíduos de lisina na Jack bean urease com grupos $-RNH_2$ passíveis de modificação, uma foi apresentada uma proposta de mecanismo entre MFC e grupo amino de lisina usando Lis469 como modelo (Figura 32A-B).

Figura 32 - Proposta de mecanismo para inibição da urease pelo MFC com resíduo de lisina no sítio alostérico. A) Aproximação do ligante no sítio alostérico; B) Formação do aduto tioureia pela reação entre o MFC e o grupo $-RNH_2$ presente em Lis469 e reduzindo a atividade da urease.



Assim, o mecanismo de inibição da urease pelo MFC está associado ao processo de interação proteína-ligante (não covalente), e formação de adutos entre MFC + grupos tiol (reversível) ou amina/guanidina (estável) disponíveis na urease. Após elucidado o mecanismo de ação do MFC frente Jack bean urease, seguiu-se com avaliação desse inibidor frente a ureases de solos, visando o potencial de aplicação biotecnológica em fertilizantes de eficiência aumentada.

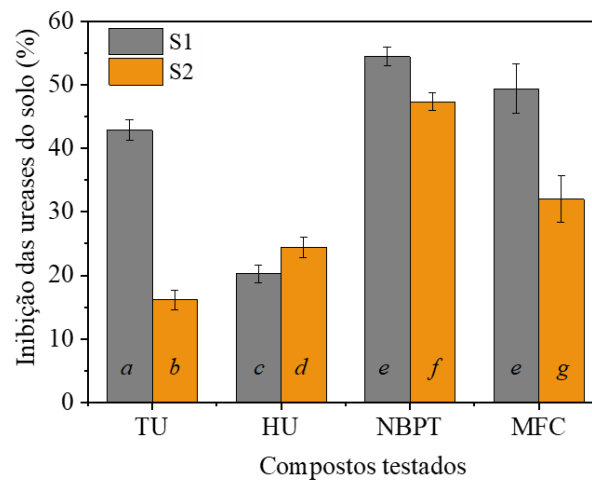
3.1.5 Inibição das ureases presentes no solo

No solo, inibidores de urease retardam a hidrólise do fertilizante ureia até que esta possa ser incorporada nessa matriz através da água da chuva ou irrigação, minimizando as perdas de nitrogênio por volatilização e, conseqüentemente, aumenta a eficiência desse fertilizante. Assim, visando avaliar o potencial do MFC para incorporação na ureia e aplicação no solo, foram realizados ensaios de inibição das ureases de dois solos em comparação com inibidores clássicos (TU, HU e NBPT). Os solos S1 e S2 apresentam atividade da urease igual a $7,19 \pm 0,25$ e $8,23 \pm 0,18 \mu\text{mol N-NH}_4 \text{g}^{-1}$ de solo, respectivamente. A atividade da urease foi afetada pela presença dos inibidores clássicos e do MFC (Figura 33) e a porcentagem de inibição foi calculada pela equação (4) adaptada de Oliveira e Santos, 2020.

$$\text{Inibição (\%)} = \left[1 - \frac{A_i - A_0}{A_u - A_0} \right] \times 100 \quad \text{equação (4)}$$

onde A é a absorbância da atividade da urease, sendo i na presença do inibidor, 0 do controle e u na ausência do inibidor

Figura 33 - Inibição de ureases no solo na presença de inibidores clássicos e do MFC. Condições: 4 g de solo incubado com ureia (200 μ L de 80 mM ureia) em tampão acetato de sódio, pH 5,5, na presença ou ausência de 0,5 mM de inibidor: Tiourea (TU), hidroxitiourea (HU), (NBPT) e MFC.



Avaliação estatística dos resultados ($n = 3$) usando ANOVA e teste de Tukey a 95% de confiança ($p < 0,05$). Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as condições avaliada para o mesmo parâmetro.

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Os resultados diferem estatisticamente ($ps_1 = 4,29 \times 10^{-7}$, $ps_2 = 8,96 \times 10^{-7}$, $\alpha = 0,05$), logo, o MFC foi mais eficiente do que TU e HU para S1 e S2. Comparando os ensaios *in vitro* e de solo, observa-se que nos ensaios *in vitro*, baseados em IC_{50} , o NBPT foi muito mais eficiente (quatro mil vezes maior) que o MFC, a tiourea foi 16 vezes mais eficiente e a hidroxitiourea foi seis vezes mais eficiente. No entanto, ao avaliar os quatro inibidores citados nas mesmas condições (0,5 mM), o MFC apresentou melhor eficiência que TU e HU para os solos S1 e S2. Já comparando MFC e NBPT no solo S1 ($49,4 \pm 3,8$ e $54,4 \pm 1,5$ %, respectivamente), esses inibidores mostram eficiência comparável com base no teste de *Tukey*.

Resultados similares foram descritos por Brito *et al.* 2015 e Araujo *et al.* 2015 para outros inibidores de urease, em que compostos pouco ativos *in vitro* apresentam bons resultados no solo e vice-versa, o que é justificado pela complexidade da matriz solo comparada ao ensaio *in vitro*, e que a variedade de microrganismos que pode afetar a eficiência dos inibidores. Ou seja, se for feito

um comparativo do comportamento de um mesmo inibidor em diferentes solos, por exemplo, MFC, NBPT e TU, nota-se que eles apresentaram maior inibição para o solo S1 do que para o solo S2, indicando que as características físico-químicas de cada solo podem influenciar a eficiência do inibidor em campo. Outros estudos em campo para NBPT destacaram que a eficiência é reduzida para solos tropicais e solos mais úmidos e mais ácidos (CASSIM *et al.*, 2021; CANTARELLA *et al.*, 2018; ENGEL *et al.*, 2015)

Por fim, de forma complementar, pode-se destacar os estudos termogravimétricos do MFC e derivados (WATERMAN *et al.*, 2014) e de degradação de benzilisotiocianatos em diferentes solos (arenosos e argilosos) bem como em diferentes horizontes (A e B) (POULSEN *et al.*, 2008), que indicaram estabilidade desses compostos e, conseqüentemente, o potencial de aplicação biotecnológico.

3.1.6. Conclusões

Neste trabalho foi investigada a possível aplicação de um isotiocianato derivado de *Moringa oleifera* como inibidor de urease. O MFC foi classificado como inibidor misto a partir dos estudos enzimáticos com $IC_{50} = 487 \mu M$. O mecanismo de inibição da urease pelo MFC foi proposto baseado em estudos biofísicos de interação e ensaios seletivos empregando absorção molecular no UV-vis, fluorescência molecular e ESI-MS. Os resultados indicam que além da interação não covalente ocorrem reações entre os grupos tiol e amino/guanidina presentes nos resíduos cisteína, lisina e arginina. Por fim, o MFC foi empregado frente as ureases de dois solos, apresentando inibição equiparada ao NBPT e, conseqüentemente, considerado um derivado natural promissor para aplicações biotecnológicas. Assim, estudos futuros envolvendo fertilizantes de eficiência aumentada são importantes para aplicação a nível industrial, seja produzindo um extrato concentrado para diluições adequadas para aplicação na agricultura ou utilização do MFC sólido para revestimento mecânico dos grânulos de ureia.

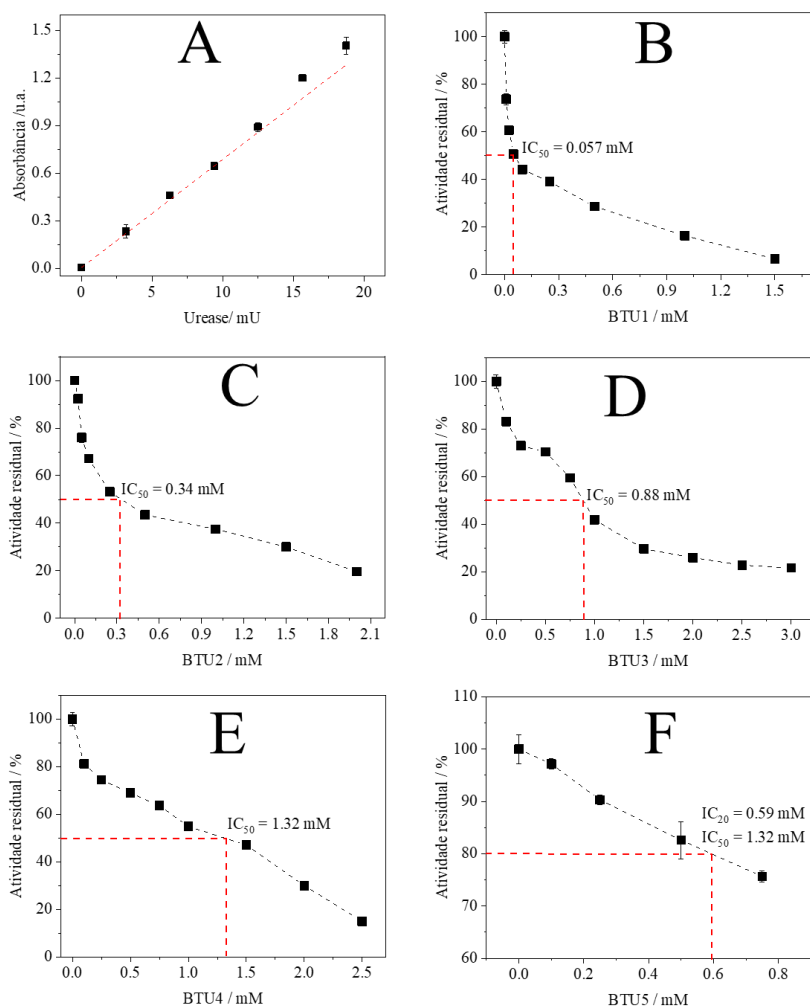
3.2 ESTUDOS DE INTERAÇÃO UREASE-BTUs

3.2.1 Ensaio de *screening*

3.2.1.1 Determinação dos parâmetros IC_{50} e K_b para todas as benzoiltioureias

As **BTUs** avaliadas diferem entre si quanto ao grupo R ligado ao nitrogênio da extremidade da tioamida. Assim, para a realização dos diferentes estudos de interação e atividade antiureolítica no solo, foi selecionada apenas a **BTU** mais ativa, com base no IC_{50} e na constante de ligação (K_b). A atividade inibitória das **BTUs** frente a Jack bean urease (*Canavalia ensiformis*) foi avaliada considerando o valor de IC_{50} calculado a partir da intersecção das retas entre os eixos da atividade residual em função da concentração do inibidor (Figura 34).

Figura 34 – Determinação do IC_{50} empregando Jack bean urease (A) e as **BTUs** (B-F). Condições: ureia 8 mM; urease 12 mU, tampão fosfato de sódio 20 mM contendo EtOH 10% (v/v), pH 7,4 a 30 °C. O valor de IC_{50} para **BTU5** obtido por extrapolação (Gráfico F)



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Os parâmetros de ligação (K_{sv} , K_b e n), foram obtidos a partir dos ajustes lineares das equações (2) e (3) apresentadas para trabalho do MFC, empregando os resultados da titulação espectrofluorimétrica da urease com concentrações crescentes de cada BTU. Os resultados estão sumarizados na Tabela 5.

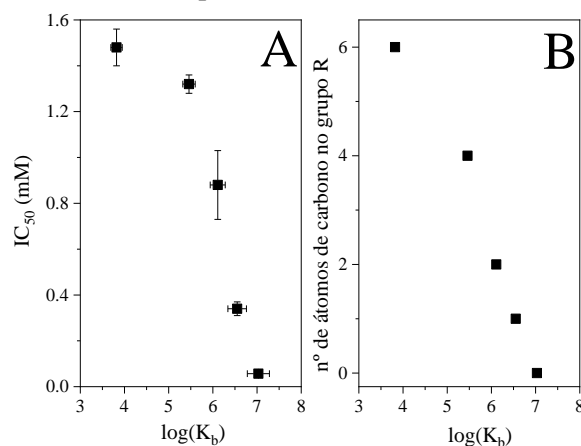
Tabela 5 – Parâmetros de ligação obtidos para a interação da urease com diferentes **BTU**. Condições: Urease (1 μ M); **BTU** (0 - 80 μ M); tampão fosfato de sódio 20 mM contendo EtOH 10% (v/v), pH 7,4 a 30 °C. λ_{ex} = 280 nm, slit 5×10 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$).

BTU	K_{sv} (10^3 L mol⁻¹)	r	K_b (10^5 L mol⁻¹)	n	r	IC₅₀ (mM)
1	28,3 ± 3,6	0,976	107 ± 2	1,64	0,999	0,057 ± 0,001
2	5,94 ± 0,68	0,975	35,5 ± 3,4	1,58	0,996	0,34 ± 0,03
3	3,72 ± 0,37	0,979	12,8 ± 1,7	1,65	0,999	0,88 ± 0,15
4	1,94 ± 0,12	0,992	2,91 ± 0,06	1,53	0,982	1,32 ± 0,04
5	9,30 ± 2,6	0,901	0,067 ± 0,002	0,94	0,921	1,48 ± 0,11

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

A supressão da fluorescência foi mais pronunciada para **BTU1** ($R = H$), refletida no maior valor de K_{sv} . A partir dos valores de K_b , observa-se que a magnitude da interação seguiu a ordem **BTU1** > **BTU2** > **BTU3** > **BTU4** > **BTU5**. Portanto, a interação entre **BTU1** e urease é mais forte, enquanto **BTU5** interage mais fracamente, corroborando para uma maior inibição da atividade da urease e menor IC₅₀. Assim, foi observado uma relação direta entre K_b e IC₅₀ (Figura 35A), bem como K_b e o grupo R (número de carbonos) das BTU (Figura 35B).

Figura 35 – Relação entre $\log K_b$ e (A) IC₅₀ e (B) número de carbono no grupo R. Condições: tampão fosfato de sódio 20 mM contendo EtOH 10% (v/v), pH 7,4 ± 0,1 a 30 °C.



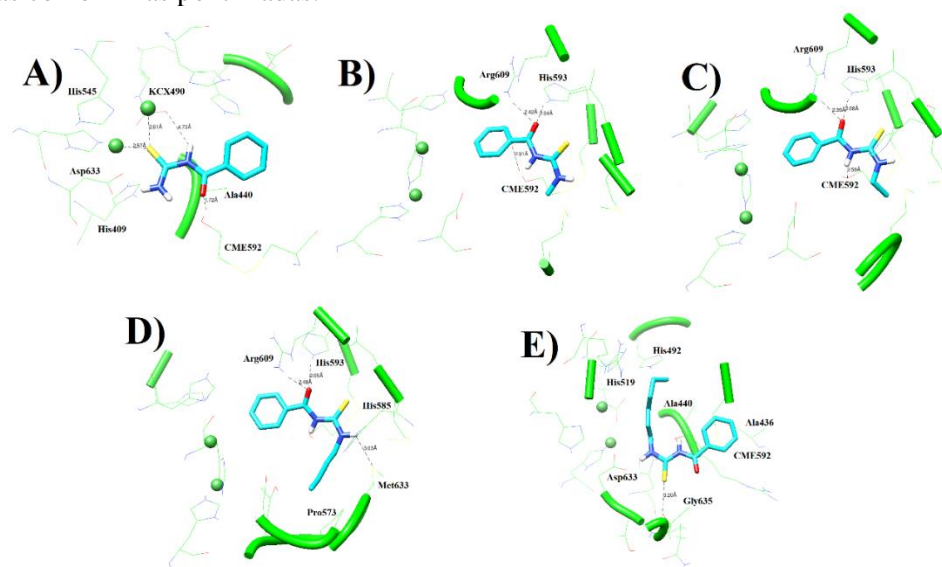
Fonte: elaborado pela autora, 2020.

O aumento do IC_{50} está diretamente relacionado à diminuição de K_b . Analogamente, o aumento do número de carbonos no grupo R leva à redução dos valores de K_b , indicando que a interação urease-BTU é desfavorecida à medida em que se aumenta o número de carbonos na cadeia *N*-alquílica. Uma possível justificativa para esse comportamento é que o aumento da cadeia linear dificulta a interação no sítio ativo, devido à menor polaridade. Nesse sentido, pode-se inferir que **BTU1** foi o derivado mais ativo e, portanto, os demais ensaios de interação e a atividade antiureolítica no solo foram realizados apenas com este composto.

3.2.1.2 Docking Molecular

Os estudos teóricos realizados com as benzoiltioureas (**BTU1-5**) revelaram que a orientação desses compostos no sítio ativo da Jack bean urease é um fator crítico para a inibição (Figura 36A-E). A conformação de ligação prevista do derivado mais ativo **BTU1** mostrou uma coordenação de tiocarbonil com o centro de bi-níquel da enzima, e maior estabilidade devido à formação de interações por ligação de hidrogênio entre grupos carbonil e -NH com resíduos *CME592* e *KCX490*, respectivamente. Foram observadas interações π -alquílicas adicionais entre o anel aromático e *Ala440*, bem como interações enxofre- π entre o grupo tioureia e os resíduos *Asp633*, *His545* e *His409* (Figura 36).

Figura 36 - Interações de **BTU1** (A), **BTU2** (B), **BTU3** (C), **BTU4** (D) e **BTU5** (E) com íons Ni de resíduos de Jack bean urease. A conformação de ligação dos ligantes é mostrada na representação em bastão e os dois íons Ni são representados por esferas verdes. A coordenação com Ni e as ligações de hidrogênio são mostradas como linhas pontilhadas.



Fonte: elaborado pelo grupo de pesquisa do Prof. Thiago Aquino (IQB/UFAL), 2021.

A análise paralela dos compostos menos ativos **BTU2-5** revelou que o grupo metil (**BTU2**) ou cadeias *N*-alquílica (**BTU3-5**) estão em uma “bolsa” hidrofóbica formada pelos resíduos Gly550, Pro573 e Leu589, promovendo uma reorientação destes derivados no sítio ativo, ausência de coordenação com os metais Ni e, conseqüentemente, impedindo a formação de um complexo ligante-enzima estável (Figura 36B-E). Finalmente, a ligação de hidrogênio entre o grupo carbonila com os resíduos Arg609 e His593, ou ligação de hidrogênio não-convencional entre o átomo de enxofre e o resíduo Gly635 para **BTU2-4** e **BTU5**, respectivamente, parece ser fundamental para a atividade inibitória.

3.2.1.3 Simulações de Dinâmica Molecular (MD)

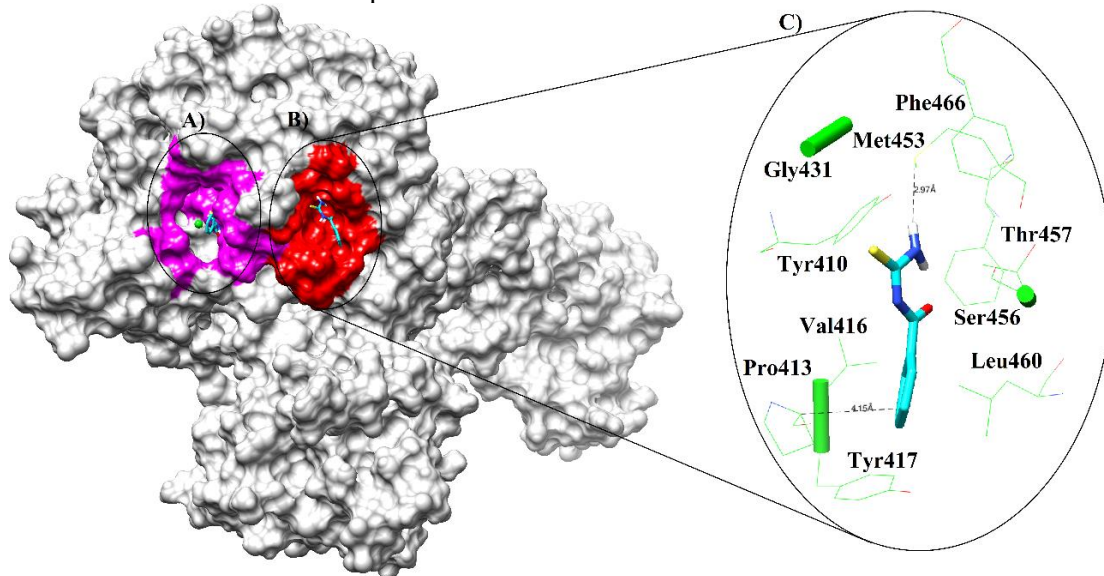
As simulações MD foram realizadas inicialmente para avaliar a estabilidade enzima-ligante no sítio catalítico de Jack bean urease e sua relação com a atividade biológica de todas as benzoiltioureas estudadas. Para os derivados **BTU2-5**, os gráficos RMSD para os átomos de Ca da cadeia principal da urease na presença dos ligantes mostraram flutuações significativas (entre 0,1-0,5 nm). Após 15 ns, os sistemas adquirem estabilidade e permanecem até o final das simulações. Estes resultados indicaram alta afinidade de ligação e estabilidade dos complexos (Figura A1A) (KUMAR *et al.*, 2018; IDRIS *et al.*, 2020) Além disso, suas posições de encaixe mostraram desvios mínimos durante as simulações de MD, indicando que os resultados de *docking* molecular são confiáveis (BHARADWAJ *et al.*, 2020).

Para os derivados, os gráficos RMSD (Figura A1B) demonstraram baixas flutuações nos resíduos no sítio ativo (His519, His545, His492, His409, His407, KCX⁴⁹⁰), indicando que a presença dos ligantes não causa mudanças significativas na estrutura da Jack bean urease (GORHAM *et al.*, 2014). Adicionalmente, os gráficos R_g (Figura A1C) mostraram variações de aproximadamente 3,15 nm, indicando rigidez e compactação da enzima (IDRIS *et al.*, 2020). Analisando os gráficos de SASA dos ligantes, pode-se observar baixos valores para **BTU1** (3-4 nm) e altos valores para **BTU5** (5-6 nm) (Figura A1D). O gráfico de SASA para a proteína mostra resultados similares, indicando que os gráficos SASA para a proteína mostraram resultados semelhantes (Figura A1E), indicando que tanto a proteína quanto o ligante no complexo **BTU1**-proteína apresentaram menor exposição ao solvente. Todos esses resultados corroboraram com o maior potencial do **BTU1** para formar três a quatro ligações de hidrogênio ao final da simulação, o que indica uma acomodação mais excelente do ligante, e melhor estabilização do complexo

formado (Figura A1F), bem como estão de acordo com ensaios de IC_{50} e constantes de ligação (K_b) calculadas experimentalmente (ZHANG *et al.*, 2017; BHOWMIK *et al.*, 2020).

Métodos baseados em simulações de MD são amplamente utilizados para prever sítios alostéricos em interações proteína-ligante (FEHER *et al.*, 2014; LU *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2021). Além disso, o método MM-PBSA calcula a energia livre de Gibbs ($\Delta G_{\text{binding}}$) com base em van der Waals e interações eletrostáticas (não ligadas) entre o ligante e seu alvo durante as simulações de MD (SARMA & MATTAPARTHI, 2019). Para os derivados **BTU2-5**, as simulações de MD demonstraram que esses derivados permaneceram estáveis no sítio ativo durante o tempo de simulação. Por outro lado, para o derivado mais ativo **BTU1**, a análise visual das simulações de MD revelou que este composto interage inicialmente com o sítio ativo, conforme demonstrado nas simulações de *docking*, mas após 50 ns, liga-se a um sítio alostérico e permanece até o final da simulação. A posição mais representativa de **BTU1** no sítio alostérico revelou ligação de hidrogênio entre -NH e o resíduo Met453, interação π -alquílica envolvendo o anel aromático e o resíduo Pro413, bem como interações de van der Waals envolvendo os resíduos de Gly431, Tyr410, Thr457, Leu460, Val416, Tyr417, Phe466, Ser456 e Thr457 (Figura 37).

Figura 37 - Complexos de **BTU1** nos sítios ativos (A) e alostérico (B) da Jack bean urease previstos por simulações de MD. (C) A conformação de ligação e interações mais representativas de **BTU1** no sítio alostérico. O ligante é mostrado na representação em bastão. As ligações de hidrogênio e a interação π -alquílica são mostradas como linhas pontilhadas.



Fonte: elaborado pelo grupo de pesquisa do Prof. Thiago Aquino (IQB/UFAL), 2021.

3.2.1.4 Cálculos de MM-PBSA

Para validar os resultados das simulações de MD, foram realizados cálculos de MM-PBSA durante a interação do derivado **BTU1** nos sítios ativo e alostérico. A Tabela 10 apresenta que o valor da energia de ligação para o sítio alostérico ($-45,116 \text{ kJ mol}^{-1}$) foi quase duas vezes maior que no sítio ativo ($-27,973 \text{ kJ mol}^{-1}$). Além disso, o alto valor de Energia de Solvatação Polar ($69,335 \text{ kJ mol}^{-1}$) e os menores valores de energia SASA no sítio alostérico ($-10,393 \text{ kJ mol}^{-1}$) indicam uma melhor afinidade e mais excelente permanência do ligante nessa região quando comparado com o sítio ativo. Esses resultados foram suportados pelos menores valores de energia eletrostática ($-15,895 \text{ kJ mol}^{-1}$) e van der Waals ($-88,163 \text{ kJ mol}^{-1}$) no sítio alostérico e estão de acordo com os resultados de fluorescência sincronizada.

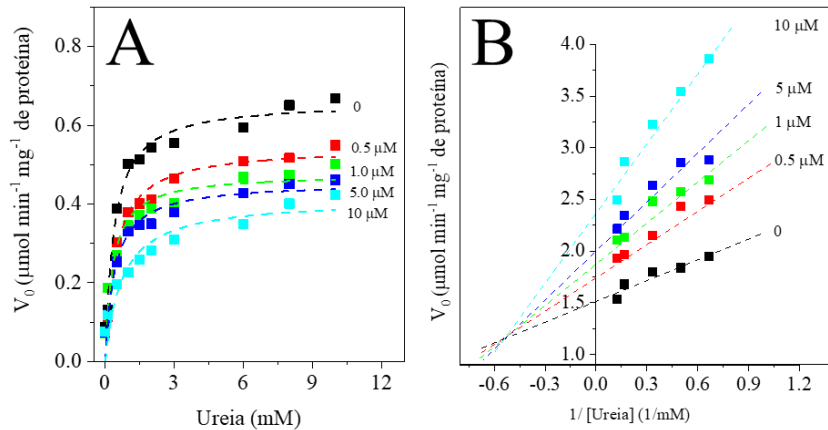
A ação do **BTU1** como inibidor misto foi similar a outros derivados de benzoiltiourea já descritos (BRITO *et al.*, 2015). Assim, uma possível justificativa para esse comportamento é que o aumento da cadeia linear dificulta a interação no sítio ativo ou alostérico devido à menor polaridade. Nesse sentido, pode-se inferir que o **BTU1** foi o derivado mais ativo e, portanto, os demais ensaios de interação e a atividade antiureolítica no solo foram realizados apenas com este composto.

3.2.2 Estudo de interação entre urease e BTU1

3.2.2.1 Cinética Clássica

O comportamento hiperbólico típico do gráfico da velocidade inicial *vs* concentração da ureia indica que urease é uma enzima Michaeliana (Figura 38A). A constante de Michaelis-Menten, K_m e a velocidade máxima, V_{max} , na ausência do inibidor são, respectivamente, $0,34 \pm 0,07 \text{ mM}$ e $0,65 \pm 0,02 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

Figura 38 - (A) Hipérbole de Michaelis-Menten e (B) linearização de Lineweaver-Burk para Jack bean urease em diferentes concentrações de ureia e **BTU1**. Condições: urease 12 mU, tampão fosfato 20 mM, pH 7,4.



Fonte: elaborado pela autora, 2021.

Conforme mostrado na Figura 38B, os ajustes lineares se cruzaram em um ponto no segundo quadrante, onde o valor de K_m muda e V_{max} diminui gradualmente com o aumento da concentração de **BTU1** (Tabela 6), indicando que **BTU1** é um inibidor misto para Jack bean urease (YAN-QING & HONG-MEI, 2012). Além disso, a razão V_{max}/K_m foi explorada com ênfase na inibição enzimática (Tabela 6) (WANI *et al.*, 2017), ou seja, quando a razão V_{max}/K_m diminui, indica que ocorre inibição mista. Esses resultados concordam com os estudos teóricos apresentados anteriormente.

Tabela 6 – Parâmetros de cinética clássica para o ensaio **BUT1**-urease (12 mU mL⁻¹), ureia (0,1 – 10 mM), tampão fosfato de sódio, pH 7,4 ± 0,1.

BTU1 (μM)	V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína)	K_m (mM)	V_{max} / K_m
0	0,659 ± 0,024	0,336 ± 0,077	1,93
0,5	0,529 ± 0,021	0,393 ± 0,090	1,35
1,0	0,488 ± 0,026	0,418 ± 0,103	1,17
5,0	0,451 ± 0,021	0,399 ± 0,101	1,12
10	0,380 ± 0,033	0,528 ± 0,026	0,71

Fonte: elaborado pela autora, 2022.

3.2.2.2 Parâmetros de ligação e termodinâmicos

Para avaliar o processo de interação entre a urease e a **BTU1**, realizou-se uma titulação espectrofluorimétrica para monitoramento da fluorescência intrínseca da urease, proveniente dos quatro resíduos de Trp e dos 19 resíduos de Tir (YAN-QING; HONG-MEI, 2012). Para isso, a

intensidade de fluorescência da urease livre (2 μM) foi monitorada em 344 nm (emissão) após excitação em 280 nm, na ausência e na presença de diferentes concentrações de **BTU1** (0 - 120 μM). O aumento da concentração de **BTU1** levou ao processo de *quenching* (Figura 39). Ou seja, a presença do *quencher* (ligante) leva à supressão do sinal de fluorescência e, conseqüentemente, pode-se inferir que a urease interage com **BTU1** formando um complexo supramolecular não fluorescente (urease-**BTU1**) (LYRA *et al.*, 2020).

O monitoramento da fluorescência intrínseca foi realizado em diferentes temperaturas (22, 30 e 38 °C) para determinação dos parâmetros de ligação e termodinâmicos. Os parâmetros relacionados ao processo de *quenching* foram obtidos a partir da equação de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} [Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad \text{equação (5)}$$

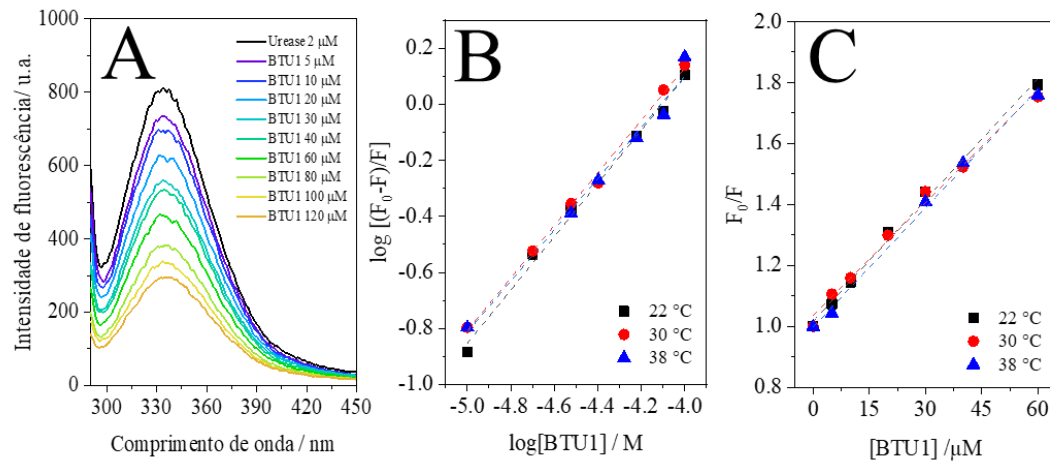
F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença de **BTU1**, respectivamente; K_{sv} é a constante de Stern-Volmer; $[Q]$ é a concentração de **BTU1**; k_q é a constante de velocidade de *quenching* bimolecular e τ_0 é o tempo de vida médio (10^{-8} s) (WANI *et al.*, 2017). Os valores de K_{sv} e k_q para as três temperaturas foram determinados de forma análoga, com base na regressão do gráfico de F_0/F vs **[BTU1]** (Figura 39), os quais estão apresentados na Tabela 7.

A variação nos valores de K_{sv} em função da temperatura é um dos critérios usados para inferir sobre o mecanismo de *quenching* preferencial envolvido na interação urease-**BTU1**. De modo geral, o mecanismo de *quenching* é classificado como estático e dinâmico. Para o *quenching* dinâmico, o aumento da temperatura resulta em uma maior difusão das moléculas, mais colisões efetivas e, conseqüentemente, ocorre um aumento do K_{sv} . Por outro lado, o *quenching* estático é caracterizado pela formação de um complexo supramolecular no estado fundamental, o qual é desfavorecido pelo aumento da temperatura, resultando em menores valores de K_{sv} com aumento da temperatura (LYRA *et al.*, 2020). Nesse sentido, com base nos valores apresentados na Tabela 7, observa-se uma diminuição do K_{sv} com o aumento da temperatura, como indicativo que a interação entre urease e **BTU1** se dá preferencial por *quenching* estático.

A constante de velocidade de *quenching* bimolecular (k_q) reflete a eficiência de acessibilidade do fluoróforo (urease) para o *quencher* (**BTU1**). Quando k_q é menor do que $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, indica que o *quenching* é resultado de colisão dinâmica entre as espécies, enquanto valores superiores, indicam a formação de um complexo estático (LAKOWICZ, 2006; DANTAS *et al.*,

2017). Para este trabalho, observa-se na Tabela 7 que os valores de k_q são entre $1,18$ e $1,26 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), corroborando com a inferência de que ocorre *quenching* estático entre urease e **BTU1**.

Figura 39 – (A) Perfil espectral da titulação espectrofluorimétrica da urease ($2 \mu\text{M}$) com **BTU1** (B) Linearização da equação de Stern-Volmer; (C) Linearização para o cálculo de K_b e número de sítios de ligação (n). Condições: tampão fosfato de sódio 20 mM pH $7,4$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$.



Fonte: elaborado pela autora, 2021.

Os parâmetros de ligação e termodinâmicos estão sumarizados na Tabela 7, em que a regressão linear de um gráfico de $\log[(F_0 - F) / F]$ vs. $\log[\text{BTU1}]$ permitiu a obtenção de K_b e n , a partir da equação (3) descrita para o trabalho do MFC. A constante de ligação (K_b) é usada como parâmetro que expressa a força de interação macromolécula-ligante. No caso da **BTU1**, os valores foram na ordem de 10^3 , e esses diminuem com o aumento da temperatura, confirmando a ocorrência do *quenching* estático e, portanto, pode-se inferir que temperaturas elevadas afetam a estabilidade do complexo **BTU1**-urease (WANI *et al.*, 2017). Os valores obtidos para n são próximos à unidade, como indicativo de que a estequiometria do complexo entre urease e **BTU1** é 1:1 e, portanto, há um sítio preferencial de interação.

Os valores de K_b em diferentes temperaturas foram utilizados para calcular os parâmetros termodinâmicos e relacionado com as principais forças intermoleculares envolvidas e espontaneidade da interação urease-**BTU1**. Os parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS , ΔG) foram obtidos com base na Equação de Van't Hoff (equação 6):

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{R} \left[\frac{1}{T} \right] + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{equação (6)}$$

onde R é a constante universal dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) e T é a temperatura em Kelvin (K) (WANI *et al.*, 2017). ΔH e ΔS foram obtidos a partir da regressão linear do gráfico de $\ln K_b$ vs $1/T$. O valor de energia livre de Gibbs foi calculado a partir da equação (7):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{equação (7)}$$

Onde ΔH e ΔS são os valores de entalpia e entropia obtidos a partir da equação (4) e T é a temperatura em Kelvin. Esses parâmetros estão sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7 – Parâmetros de ligação e termodinâmicos para a interação entre urease e **BTU1** em diferentes temperaturas. Condições: urease ($2 \mu\text{M}$), **BTU1** ($0 - 120 \mu\text{M}$), tampão fosfato de sódio 20 mM pH $7,4$.

Parâmetros de ligação						
T (°C)	K_{sv} (10^3 M^{-1})	r	k_q ($10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	K_b (10^3 M^{-1})	n	r
22	$12,60 \pm 0,97$	0,997	1,26	$7,95 \pm 0,11$	$0,95 \pm 0,10$	0,997
30	$12,31 \pm 0,50$	0,996	1,23	$6,31 \pm 0,11$	$0,94 \pm 0,03$	0,998
38	$11,88 \pm 1,73$	0,996	1,18	$5,71 \pm 0,23$	$0,92 \pm 0,05$	0,993
Parâmetros termodinâmicos						
T (°C)	ΔH (kJ mol^{-1})	ΔS ($\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)		ΔG (kJ mol^{-1})		
22				-5,04		
30	-15,84	-36,61		-4,75		
38				-4,45		

Fonte: elaborado pela autora, 2021.

Os valores negativos de ΔG indicam que o processo de interação é espontâneo (CHAVES *et al.*, 2015). Além disso, ΔH foi negativo e ΔS negativo, indicando um processo exotérmico e diminuição da entropia, respectivamente. Uma vez que $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$, pode-se inferir que as interações por ligações de hidrogênio e forças de van der Waals são, preferencialmente, as responsáveis por estabilizar o complexo urease-**BTU1**. Um valor negativo de ΔS indica a formação do complexo com elevada organização no microambiente, possivelmente devido à contribuição das ligações de hidrogênio. Adicionalmente, o aumento da temperatura leva ao aumento da energia cinética das moléculas e desordem do sistema, diminuindo as interações por ligações de hidrogênio e implicando em menor K_b em maiores temperaturas (MONDAL *et al.*, 2021).

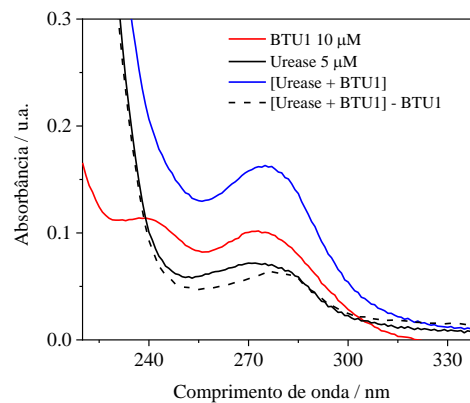
Esses resultados podem ser extrapolados para as demais **BTUs**, justificando a diminuição do K_b com o aumento da cadeia *N*-alquílica (diminuição da polaridade) e, conseqüentemente, menor estabilização do complexo urease-**BTU5** em comparação com **BTU1**, por exemplo. Os resultados até aqui apresentados corroboram com aqueles obtidos pelos estudos teóricos e por fluorescência sincronizada.

3.2.2.3 Estudos por espectroscopia de absorção molecular no UV

Os ensaios por absorção molecular no UV-vis foram empregados para confirmar o mecanismo de *quenching* obtidos por UV-vis, uma vez que esta técnica permite obter informações do complexo urease-**BTU1** no estado fundamental e explorar mudanças estruturais na enzima (HE *et al.*, 2014). Os espectros de absorção molecular da urease, da **BTU1** e do complexo **BTU1**-urease (Figura 40), em que se observa uma banda de absorção máxima em 280 nm para a urease, característico das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ dos resíduos de aminoácidos aromáticos presentes na enzima. Para **BTU1**, a banda em 240 nm corresponde às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ do grupo aromático, enquanto a banda em 275 nm pode ser atribuída às transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ do par de elétrons no oxigênio e no enxofre de C=O e C=S (MAFY *et al.*, 2015).

O espectro de absorção do complexo **BTU1**-urease apresentou deslocamento para o vermelho em relação à urease livre, indicando mudanças conformacionais na enzima pela presença do ligante (GUAN *et al.*, 2014). O espectro de absorção resultante da subtração [(urease-**BTU1**) - **BTU1**] não é sobreponível ao espectro da urease livre devido ao processo de interação (SAEIDIFAR *et al.*, 2015).

Figura 40 – Espectros de absorção molecular no UV para os sistemas: urease (5 μ M), **BTU1** (10 μ M), e urease + **BTU1** (1:1). Condições: tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 e 30°C.

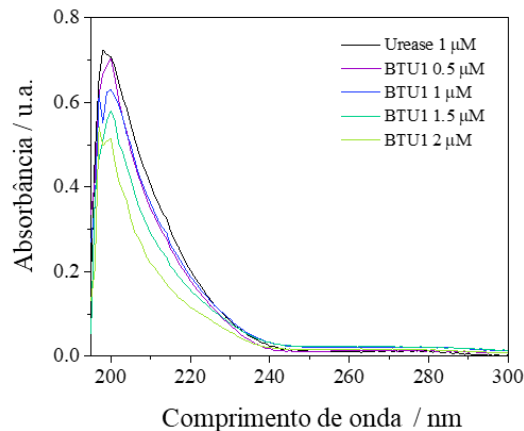


Fonte: elaborado pela autora, 2021.

De acordo com o perfil espectral é possível inferir que o mecanismo de *quenching* é estático, pois como o complexo supramolecular é formado no estado fundamental, ocorrem alterações conformacionais na macromolécula indicadas pelo espectro de absorção por UV-vis. Para mecanismo de *quenching* dinâmico, o espectro de absorção da proteína não é influenciado pela presença do ligante, pois a formação do complexo supramolecular é decorrente das colisões entre

quencher e fluoróforo no estado excitado (LYRA *et al.*, 2020; TIAN *et al.*, 2010). Adicionalmente, foi realizado ensaio no UV da urease na ausência e na presença concentrações de **BTU1** para avaliar a região próxima a 200 nm. Os espectros (Figura 41) apresentam o pico próximo a 200 nm devido à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ da estrutura do esqueleto polipeptídico C=O.

Figura 41 - Espectros de absorção de UV de urease (1 μM) na presença de BTU 1 (0,5 – 2 μM). O espectro do complexo foi obtido subtraindo: [espectro complexo - espectro BTU1]. Condições: tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4 a 30°C.



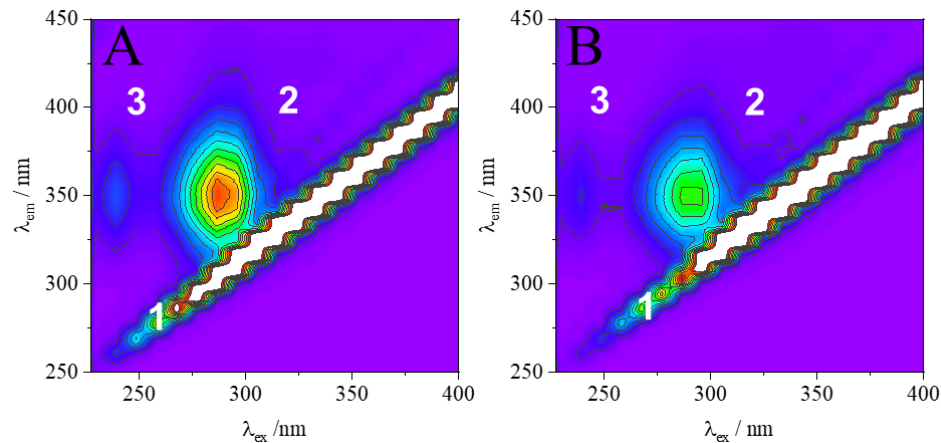
Fonte: elaborado pela autora, 2021.

A diminuição da absorbância nessa região após a adição gradual de **BTU1** de 0 a 2 μM junto com um leve desvio para o vermelho (1 nm) foi observada, indicando que a interação de ligação de **BTU1** com urease leva a um afrouxamento e desdobramento da cadeia polipeptídica da enzima (WANG *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2020).

3.2.2.4 Fluorescência tridimensional (3D)

Fluorescência 3D permite avaliar mudanças conformacionais na urease e no microambiente dos resíduos de Tir e Trp (MA *et al.*, 2016). Os espectros de fluorescência 3D na ausência (Figura 42A) e na presença de uma concentração fixa da **BTU1** (Figura 42B), destacam três bandas relacionadas: (1) ao espalhamento da radiação (*scattering Rayleigh*), sempre em $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$; (2) à fluorescência intrínseca dos resíduos dos aminoácidos Trp e Tir e (3) à fluorescência de estados eletrônicos mais excitados dos resíduos aromáticos presentes na estrutura proteica (BORTOLOTTI *et al.*, 2016).

Figura 42 – Espectros de fluorescência tridimensional (3D) para (A) urease livre (2 μ M) e (B) urease + **BTU1** (50 μ M). Condições: tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4 \pm 0,1 a 30 $^{\circ}$ C.



Fonte: elaborado pela autora, 2021.

Há uma diminuição na intensidade de fluorescência dos picos 2 e 3 ao comparar os gráficos da urease livre e urease-**BTU1**. Os parâmetros obtidos a partir dos espectros de fluorescência 3D são: a posição e a intensidade dos picos de máxima emissão de fluorescência, além do deslocamento de Stokes, os quais estão sumarizados na Tabela 8.

Tabela 8 – Parâmetros de fluorescência tridimensional para urease livre e na presença de **BTU1**. Condições: Urease 2 μ M; **BTU1** 50 μ M, tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 a 30 $^{\circ}$ C. Pico 1: espalhamento *Rayleigh*; pico 2: emissão dos resíduos Trp e Tir e pico 3: aminoácidos aromáticos.

Pico	Urease			Urease + BTU1		
	Posição ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$)	Stokes ¹ $\Delta\lambda$ (nm)	IF (a. u.)	Posição ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$)	Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	IF (a. u.)
1	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	> 1000	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	> 1000
2	286 / 349	63	726 (100%) ²	296 / 345	49	478 (66%)
3	238 / 349	111	191 (100%)	239 / 350	111	141 (74%)

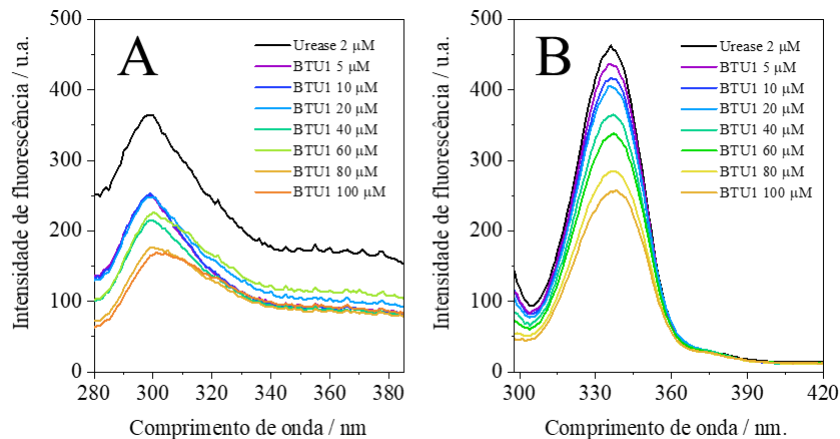
¹Deslocamento Stokes ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$). ²Números entre parênteses representam a porcentagem relativa do sinal de fluorescência. Valores menores indicam maior variação em relação ao controle (urease livre); IF = intensidade de fluorescência.

A partir dos dados da Tabela 8, pode-se inferir que a presença de **BTU1** levou à diminuição de 34% do pico 2 e 26% do pico 3, indicando alterações conformacionais na urease, principalmente nas regiões dos resíduos de Tir e Trp. A redução da emissão do pico 3 pode estar associada ao fato de que as mudanças conformacionais levam a menor exposição dos resíduos de aminoácidos aromáticos, dificultando a recepção de energia e, conseqüentemente, diminuindo as transições eletrônicas para estados mais excitados que resultariam em maior emissão de fluorescência, como no sistema da enzima livre.

3.2.2.5 Fluorescência sincronizada

Os estudos de fluorescência sincronizada foram empregados para monitorar os resíduos de tirosina presentes na urease, e verificar se ocorrem alterações no microambiente destes aminoácidos na presença de diferentes concentrações da **BTU1** (Figura 43A e B). Assim, manteve-se constante o intervalo de comprimento de onda entre os monocromadores de excitação e emissão ($\Delta\lambda$), em que $\Delta\lambda = 15$ e 60 nm correspondem ao monitoramento seletivo dos resíduos de Tir e Trp, respectivamente (BOBONE, VAN DE WEERT, STELL, 2014).

Figura 43 – Titulação empregando fluorescência sincronizada para os resíduos de (A) Tir e (B) Trp com adição de **BTU1** (0 - 100 μM). Condições: urease (2 μM), tampão fosfato 20 mM pH 7,4 a 30°C.



Fonte: elaborado pela autora, 2021

O desvio no máximo comprimento de onda de emissão da urease para os dois resíduos indicam mudanças de polaridade no microambiente. Para variações positivas no λ_{max} , pode-se inferir um aumento na polaridade do microambiente desses resíduos devido a maior exposição à água, resultante da mudança conformacional da enzima na presença do ligante. Os parâmetros obtidos estão sumarizados na Tabela 9.

Tabela 9 – Parâmetros de Stern-Volmer e deslocamento no comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência sincronizada para urease na presença de **BTU1**.

$\Delta\lambda$ / nm	Parâmetros biofísicos (Stern-Volmer)		$\Delta\lambda_{\text{max}}$ (nm)
	K_{sv} (10^3 M^{-1})	r	
15	$9,07 \pm 0,33$	0,9629	+2
60	$7,86 \pm 0,46$	0,9900	+2

Fonte: elaborado pela autora, 2021.

Variações positivas no λ_{max} foram observados por Braga *et al*, 2019 e Lage *et al*, 2018, no que se refere ao maior valor de K_{sv} para Tir em estudos de interação envolvendo urease. A partir dos

valores de K_{sv} pode-se inferir que a supressão de fluorescência é maior para os resíduos de Tir, indicando que esse microambiente é mais afetado pela presença do ligante. Uma vez que os resíduos Tir410 e Tir417 estão no sítio alostérico predito por simulações de modelagem molecular e os resíduos Trp495 e Trp648 estão distantes do sítio catalítico, pode-se inferir que **BTU1** atua como um inibidor misto e, neste ensaio, demonstrou maior afinidade pelo sítio alostérico. Esses resultados estão de acordo com os cálculos de MM-PBSA, que indicaram maiores energias de interação para o sítio alostérico em comparação ao sítio ativo (Tabela 10).

Tabela 10 – Cálculos de MM-PBSA para o complexo urease-BTU1 no sítio ativo e sítio alostérico.

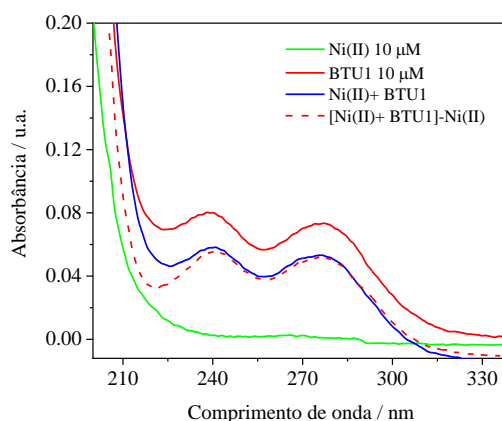
BTU1	Sítio ativo (kJ mol ⁻¹)	Sítio alostérico (kJ mol ⁻¹)
Energia de ligação	- 27,97 ± 15,07	- 45,12 ± 10,78
Energia SASA	- 6,52 ± 0,85	- 10,39 ± 1,00
Energia de solvatação polar	25,66 ± 17,23	69,34 ± 17,06
Energia eletrostática	2,60 ± 11,03	- 15,89 ± 11,55
Energia de van der Waals	- 49,72 ± 9,46	- 88,16 ± 11,64

Fonte: elaborado pelo grupo de pesquisa do Professor Thiago Aquino (UFAL), 2021.

3.2.2.6 Avaliação do sítio ativo

A possibilidade de interação de **BTU1** no sítio ativo foi avaliada com base no ensaio de níquel por UV, e por fluorescência molecular na presença de inibidores competitivos clássicos. A capacidade da **BTU1** em coordenar íons Ni(II) em solução foi realizado considerando a espécies livres e na proporção 1:1 (Figura 44). A solução de Ni(II) não apresentou absorvância considerável na região espectral avaliada (210 - 280 nm).

Figura 44 – Espectros de absorvância molecular para os sistemas: Ni(II) (10 μM); **BTU1** (10 μM) e Ni(II):**BTU1** (1:1). Condições: tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 a 38 °C.



Fonte: elaborado pela autora, 2021.

O sistema Ni(II) + **BTU1** (1:1) apresentou menor absorvância do que **BTU1** livre e a subtração [**BTU1** + Ni(II) - Ni(II)] não levou à sobreposição do espectro da **BTU1** livre, indicando que o perfil obtido não era relativo ao efeito aditivo da lei de Beer. Esses resultados podem ser extrapolados à enzima e corroboram com outros estudos, em que doadores de elétrons como O e S podem interagir com íons níquel presentes no sítio ativo da urease, contribuindo para o processo de inibição (SELVAKUMARAN *et al.*, 2013).

No ensaio de competição por fluorescência molecular foi avaliada a influência do substrato (ureia) e de alguns inibidores clássicos competitivos (TU, HU e NBPT) na interação da urease-**BTU1**. Este ensaio consiste em titulações espectrofluorimétricas independentes entre **BTU1** com urease, na ausência e na presença do substrato ou dos inibidores competitivos. Assim, para cada sistema foi calculada a constante de ligação e empregado como critério de avaliação a razão das constantes de ligação (K_b'/K_b), em que K_b' e K_b são, respectivamente, a constante de ligação na presença e na ausência do competidor. A formação de complexo urease-**BTU1** é favorecida quando $K_b'/K_b > 1$, enquanto $K_b'/K_b < 1$ indica que a formação do complexo **BTU1**-urease é desfavorecida na presença do competidor (Tabela 11).

Tabela 11 – Relação das constantes de ligação da urease na ausência (K_b) e na presença (K_b') de substrato ou dos inibidores competitivos (HU, TU, NBPT). Condições: urease 2,0 μM , 50 μM de substrato ou inibidor, **BTU1** (1,0 - 120 μM).

Critério	Substrato	Inibidores competitivos		
	Ureia	NBPT	HU	TU
K_b'/K_b	0,0378 \pm 0,0003	0,0244 \pm 0,0002	0,4564 \pm 0,0001	6,02 \pm 0,51

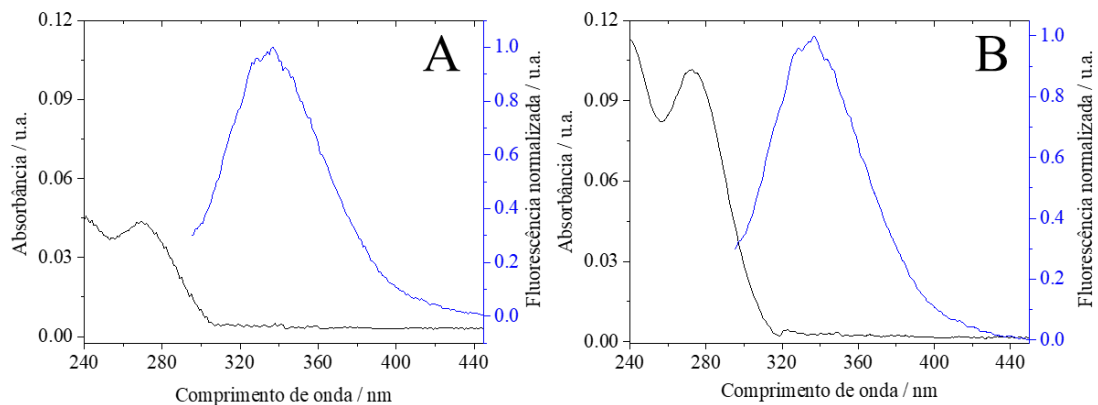
Fonte: elaborado pela autora, 2021.

A constante de ligação diminui na presença de ureia e dos inibidores HU e NBPT ($K_b'/K_b < 1$), indicando que **BTU1** interage no sítio ativo da urease. Para TU a constante de ligação aumentou ($K_b'/K_b > 1$), indicando que a TU bloqueou o acesso ao sítio ativo e **BTU1** interagiu mais fortemente no sítio alostérico. Mondal *et al.* 2021 obtiveram K_b entre 2,24 e $6,50 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1}$ para o complexo urease-TU em diferentes temperaturas. Esse resultado pode indicar que o inibidor competitivo TU é mais facilmente acomodado no sítio ativo do que **BTU1** devido à diferença de tamanho e similaridade com o substrato. Esses resultados são concordantes com a cinética clássica de inibidor misto apresentada para **BTUs** similares (BRITO *et al.*, 2015). Os resultados de fluorescência 3D e fluorescência sincronizadas corroboram com os resultados de competição e com a premissa de que **BTU1** deve atuar como inibidor misto de urease.

3.2.2.7 Ensaio de transferência de energia por ressonância de Förster (FRET)

A distância entre o doador (fluoróforos da urease) e o receptor de energia (**BTUI**) foi avaliada por FRET, cuja eficiência depende: (i) sobreposição entre o espectro de emissão de fluorescência da urease (doador) e o espectro de absorção da **BTUI** (receptor) (Figura 45A e B); (ii) orientação relativa dos dipolos do doador e receptor; (iii) distância (r_0) entre a urease e a molécula receptora de energia (1-8 nm) (LAKOWICZ, 2006).

Figura 45 – Sobreposição espectral da emissão de fluorescência da urease e absorção da **BTUI** em (A) 5 μM e (B) 10 μM . Condições: urease (5 μM), tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 e 30°C.



Fonte: elaborado pela autora, 2021.

O valor da energia transferida (E) envolvida no processo de interação da urease com **BTUI** foi calculada a partir da equação 8, de acordo com a teoria de transferência de energia de Förster (LAKOWICZ, 2006):

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_0^6} \quad \text{equação (8)}$$

F e F_0 são as intensidades de fluorescência da urease na presença e na ausência da **BTUI**, respectivamente, e R_0 é a distância crítica quando a eficiência de transferência de energia equivale a 50%, sendo calculada a partir da seguinte equação (LAKOWICZ, 2006):

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi J \quad \text{equação (9)}$$

Sendo K^2 o fator de orientação espacial que descreve a geometria dos dipolos do doador e receptor de energia ($K^2 = 2/3$ para alinhamento aleatório), N é o índice de refração do meio ($N = 1,36$), Φ é o rendimento quântico da urease livre ($\Phi = 0,15$) e J é a integral de sobreposição do espectro de

emissão de fluorescência da urease e espectro de absorção do ligante dado por (WANG *et al.*, 2011):

$$J = \frac{\int_0^{\infty} F(\lambda)\varepsilon(\lambda)\lambda^4 d\lambda}{\int_0^{\infty} F(\lambda)dy} \quad \text{equação (10)}$$

Em que $F(\lambda)$ é a intensidade de fluorescência normalizada da urease enquanto $\varepsilon(\lambda)$ é o coeficiente de absorção molar da **BTU1** no comprimento de onda λ . Através das equações (8-10) foi possível obter os parâmetros do estudo de FRET (J , R_0 , E e r_0) apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Parâmetros de FRET da interação urease-**BTU1**.

Ligante	Concentração (μM)	Urease (μM)	J ($10^{-16} \text{ cm}^3 \text{ M}^{-1}$)	R_0 (nm)	E	r_0 (nm)
BTU1	5	5	1,23	1,21	0,02	2,32
	10	5	6,82	1,61	0,24	1,95

PCP = pentaclorofenol; BA5-S e BA7-S = Adutos de Biginelli com função tioureia diferindo no substituinte do precursor: *p*-nitrobenzaldeído e *m*-metoxibenzaldeído.

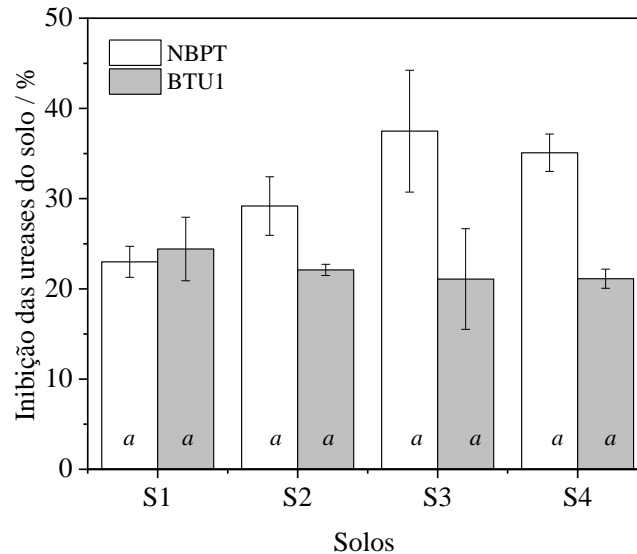
Fonte: elaborado pela autora, 2021.

A distância crítica de Förster (R_0), a distância entre os resíduos de Trp da urease e as diferentes concentrações **BTU1** (r_0) estão entre 1 e 3 nm, indicando que ocorre transferência de energia entre as espécies com alta probabilidade (valores entre 1-8 nm) (LAKOWICZ, 2006). Além disso, foi observado que a transferência de energia, E , foi inferior a 0,5 (50%) e, portanto, $R_0 < r_0$, concordando com os resultados obtidos. Com os dados apresentados na Tabela 12, fica evidente que a transferência de energia não radioativa depende da concentração da enzima e do ligante e, mais efetivamente, da concentração do ligante, como observado para **BTU1** em 5 e 10 μM .

3.2.2.8 Atividade antiureolítica no solo

Avaliar a inibição na microbiota do solo é de suma importância para inferir sobre potencial de aplicação biotecnológica em fertilizantes de eficiência aumentada. Assim, visando avaliar o potencial da **BTU1** para aplicação no solo, foram realizados ensaios com quatro solos em comparação com o NBPT. Os solos S1, S2, S3 e S4 apresentam texturas e teores de matéria orgânica distintos, e as características físico-químicas estão apresentadas na Tabela A1 (Anexo I). A atividade das ureases foi afetada pela presença dos inibidores (Figura 46).

Figura 46 – Inibição de ureases no solo por 0,5 mM de **BTU1** e NBPT. Condições: 4 g de solo incubado com ureia (200 μ L de 80 mM ureia) em tampão acetato de sódio, pH 5,5.



Avaliação estatística dos resultados ($n = 3$) foi realizada usando ANOVA *two-Way* e teste de Tukey a 95% de confiança ($p < 0,05$). Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as condições avaliada para o mesmo parâmetro.

Fonte: elaborado pela autora, 2021.

A partir dos resultados apresentados na Figura 46, observa-se que a eficiência do inibidor **BTU1** e NBPT é a mesma em qualquer um dos solos e que os valores de inibição de **BTU1** não diferem estatisticamente dos obtidos para o NBPT (ANOVA *two-Way*, $p = 0,11$ para os inibidores e $p = 0,77$ para os solos; $\alpha = 0,05$).

Resultados similares quanto à porcentagem de inibição em latossolos vermelhos foram apresentados por Brito *et al.*, 2015, sendo aproximadamente 22% para **BTU1** e **BTU2** e 40% para **BTU3**, que são as mesmas moléculas apresentadas neste trabalho. Assim, **BTU1** apresenta-se como um inibidor alternativo e com potencial de inibição equivalente ao NBPT para diferentes solos. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar outros parâmetros e outros solos e assim apresentar uma maior correlação entre os características físico-químicas de solos, eficiência de inibidor e crescimento de plantas.

3.2.3 Conclusões

Neste trabalho, foi avaliado o potencial de inibição da urease por cinco **BTUs**, sendo **BTU1** mais ativo e, portanto, o mecanismo de inibição foi explorado. A formação do complexo supramolecular, urease-BTU1, ocorreu com alta afinidade, estabilizada por ligações de hidrogênio

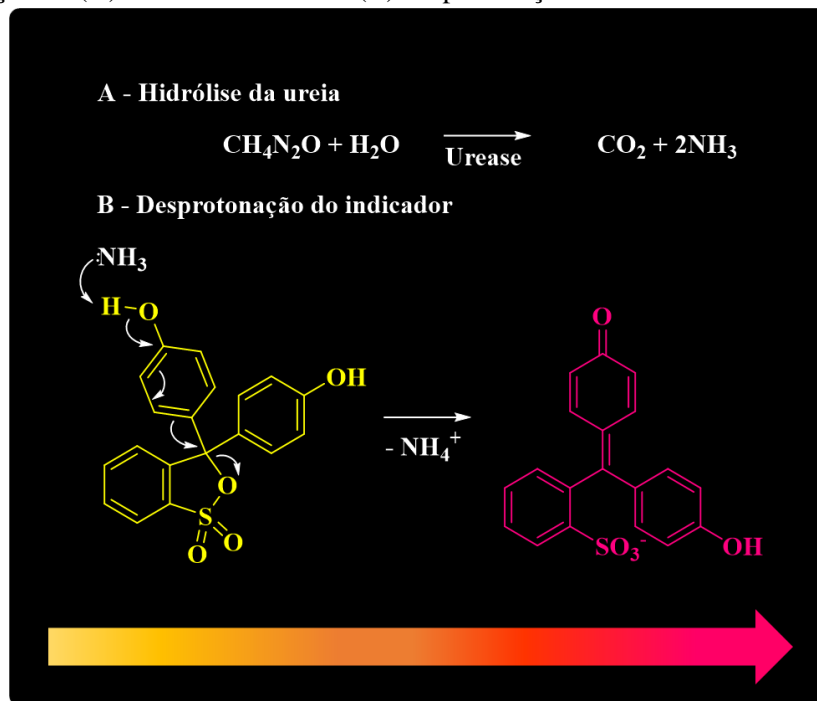
e forças de van der Waals. Alterações conformacionais na estrutura da enzima foram indicadas por UV, fluorescência sincronizada e fluorescência 3D. Estudos de competição indicaram que **BTU1** interage como inibidor misto que age preferencialmente no sítio alostérico. Simulações teóricas previram a formação de complexos urease-**BTU1-5**, onde **BTU1** também foi o composto mais ativo. A energia de ligação calculada mostrou boa concordância com as medidas experimentais, o que indica maior acomodação do ligante e melhor estabilização do complexo formado, corroborando com a premissa que **BTU1** é um inibidor misto. O aumento da cadeia N-alquílica não é uma boa alternativa na elaboração de benzoiltioureas como inibidores de urease. Finalmente, estudos em diferentes solos mostraram que o **BTU1** possui um potencial de inibição equivalente ao NBPT, e esses estudos podem ser úteis para a projeção de moléculas mais potentes para a inibição de ureases para aplicações biotecnológicas em solos.

3.3. DESENVOLVIMENTO DO UrePAD

3.3.1 Otimização dos parâmetros para determinação da urease no UrePAD

A ureia é hidrolisada em NH_3 e CO_2 (Figura 47A), resultando no aumento do pH do sistema e na mudança de cor do indicador vermelho de fenol, que vai do amarelo ao magenta devido a desprotonação (Figura 47) (MCINTOSH *et al.*, 2010).

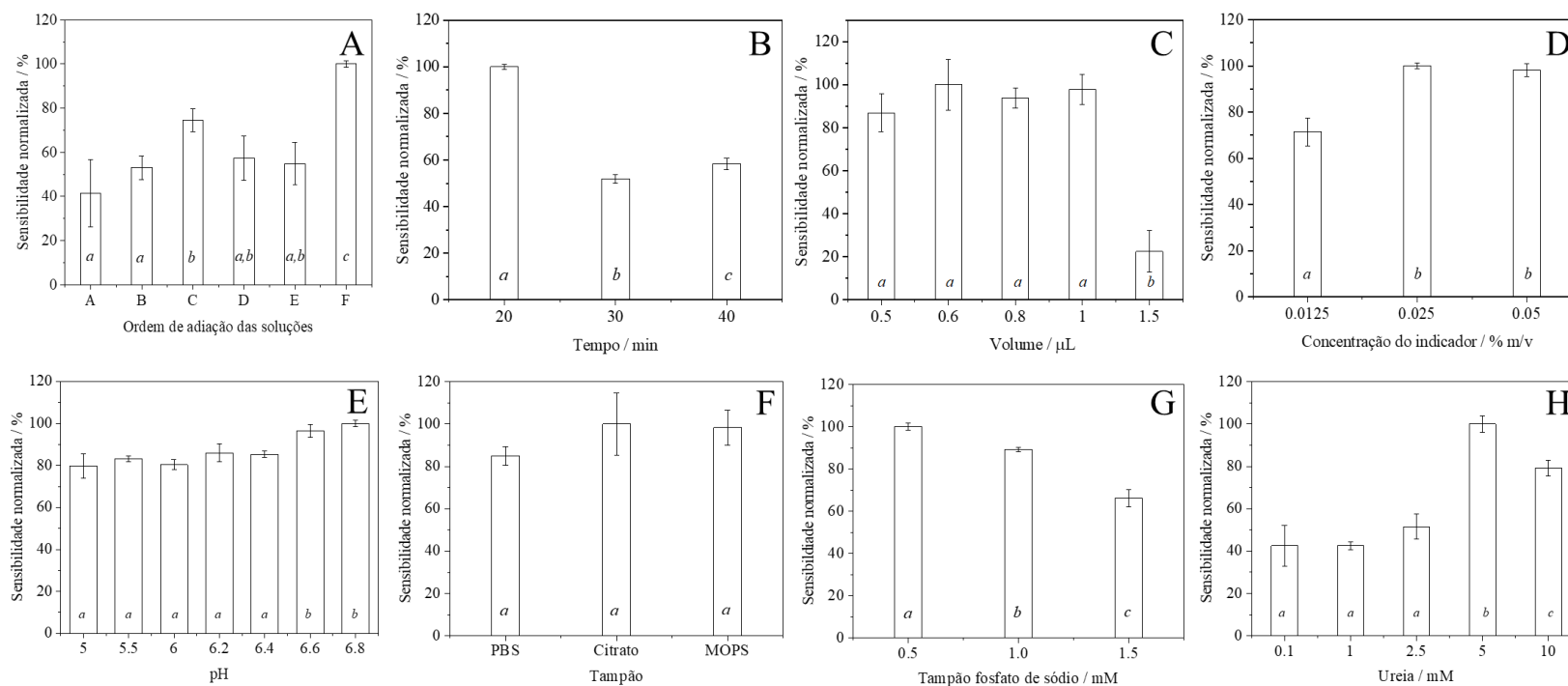
Figura 47 – Reação de (A) hidrólise da ureia e (B) desprotonação do indicador vermelho de fenol.



Fonte: elaborado pela autora, 2021.

A partir do gradiente de coloração observado pode-se construir curvas analíticas variando-se a concentração da urease. Assim, as figuras de mérito foram otimizadas com base na sensibilidade analítica e em alguns casos o branco analítico também foi considerado (Figura 48).

Figura 48 – Relação entre a sensibilidade analítica e (A) ordem de adição das soluções; (B) volume da solução; (C) tempo de análise; (D) concentração de vermelho de fenol; (E) concentração hidrogeniônica inicial; (F) tipo de tampão; (G) concentração de tampão de fosfato de sódio e (H) concentração de ureia.



O desvio padrão para as médias dos experimentos foi calculado em $n = 6$. A avaliação estatística dos resultados foi realizada por ANOVA e teste de Tukey com 95% de confiança ($p < 0,05$). Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as condições para o mesmo parâmetro.

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

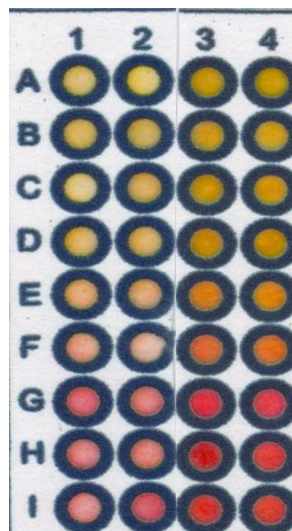
3.3.1.1 Ordem de adição das soluções na zona de detecção

A ordem de adição de solução tem como objetivo obter a melhor homogeneidade de cor na zona de detecção e foi avaliada para seis ordens (A – F) no UrePAD, correspondendo às permutações simples para $n = 3$ (total de soluções). A ordem de adição F (ureia, urease e indicador) foi selecionada porque revelou maior sensibilidade analítica (Figura 48A).

A ordem de adição é importante tanto para a maior homogeneidade da cor na microzona, como para a sensibilidade. Figueredo *et al.* (2016) demonstraram que a homogeneidade na zona de detecção resulta em melhor sinal analítico e, conseqüentemente, permite atingir sensibilidades maiores. Como observado na Figura 48A, para as ordens C e F, a sensibilidade foi maior, uma vez que o indicador foi adicionado por último e garantiu uma maior homogeneidade e gradiente de cor mais acentuado.

Ao se adicionar primeiro o reagente colorimétrico na superfície do papel e a enzima por último, a geração da cor não ocorre de forma homogênea (Figura 49), e isso se deve ao transporte dos reagentes precursores para a geração de cor em direção às bordas da zona, pois não estão bem fixados no papel (FREITAS *et al.*, 2018), além da lixiviação dos cromóforos (como indicadores de pH) (MORBIOLI *et al.*, 2017), obtendo-se resultados melhores quando a enzima é imobilizada na superfície do papel antes da adição do reagente colorimétrico (EVANS *et al.*, 2014).

Figura 49 – Efeito da ordem de adição dos reagentes, em que a ordem A: indicador → urease → ureia é observada nas colunas 1 e 2, enquanto a ordem F: ureia → urease → indicador é observada nas colunas 3 e 4. Nas linhas do dispositivo (A – I) há um aumento da concentração da urease.



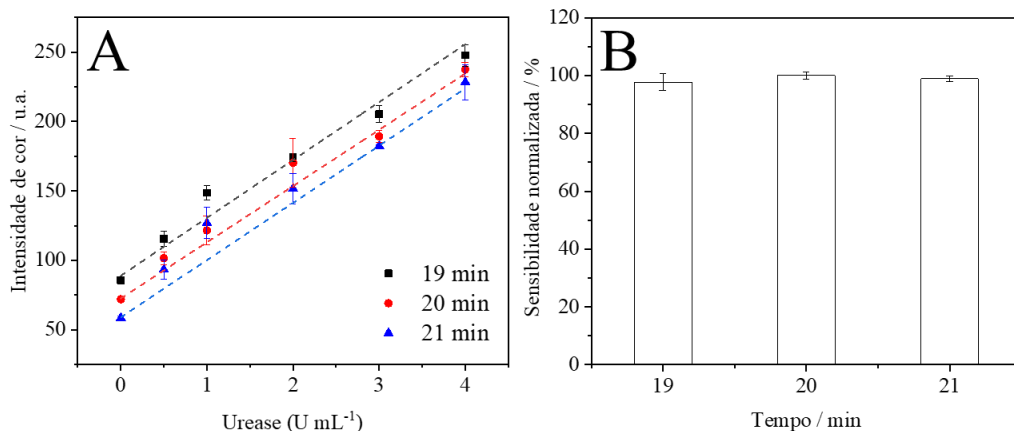
Fonte: elaborado pela autora, 2021.

Assim, neste trabalho, observa-se que a maior homogeneidade e sensibilidade obtidos na ordem selecionada (Figura 49), provavelmente, tenha ocorrido porque ureia e urease foram adicionadas primeiro, levando a uma maior fixação dessas espécies em toda a microzona e, por consequência, quando o indicador é adicionado o fenômeno de migração da enzima e do substrato já foi minimizado, bem como lixiviação do agente cromóforo.

3.3.1.2 Tempo de análise

O desenvolvimento da coloração no UrePAD está associado ao processo enzimático, que requer um tempo mínimo para ocorrer e promover mudança de cor. A intensidade da cor neste sistema tende a aumentar ou diminuir com o tempo, sendo necessário delimitar o momento para obter a melhor imagem. A sensibilidade analítica diminuiu (Figura 48B) com o aumento do tempo total para análise, sendo o tempo de 20 min o que apresentou intensidade máxima do sinal, em relação aos tempos 30 e 40 min. Tempos muito menores do que 20 min não foram avaliados, pois esse tempo garantiu menor umidade possível e maior homogeneidade na zona de detecção no UrePAD para a obtenção das imagens do *scanner*. Adicionalmente, foi realizado um ensaio de robustez, em que a sensibilidade foi calculada para os tempos 19, 20 e 21 min (Figura 50), demonstrando uma boa robustez, visto que o erro relativo é menor do que 5%.

Figura 50 – (A) Ensaio de robustez para 20 ± 1 min; (B) Sensibilidade normalizada para 20 ± 1 min.



Fonte: elaborado pela autora, 2021.

Por outro lado, maiores tempo de análise levam à descoloração da zona de detecção devido à possibilidade de reação do $\text{CO}_2(\text{g})$ com água residual, formando ácido carbônico e consequentemente, influencia na cor do indicador (redução do pH e descoloração). Nesse sentido,

o sistema tamponado foi avaliado para garantir um pH inicial e para minimizar o efeito do CO₂, o que garantiu um RSD $\leq 1,91$ % para o branco analítico e, conseqüentemente, influência mínima do CO₂ para o tempo de 20 min e para a condição tamponada.

3.3.1.3 Volume de solução adicionado na zona de detecção

As zonas de detecção do UrePAD tinham 7 mm de diâmetro; assim, o volume de cada solução adicionada influenciou o tempo de secagem entre uma solução e outra e o tempo total de análise, homogeneidade, sensibilidade analítica e o valor do branco analítico. Nesse sentido, todos os volumes das soluções foram avaliados simultaneamente em experimentos independentes em cinco níveis diferentes (Figura 48C). A sensibilidade analítica não apresentou diferença significativa de 0,5 a 1,0 μ L (ANOVA, 95% de confiança), exceto para o volume de 1,5 μ L, pois para o tempo selecionado, a adição de grandes volumes de cada solução afeta a secagem máxima associada à homogeneidade do sistema. Portanto, o volume de 1,0 μ L foi selecionado para cada solução por permitir sensibilidade analítica satisfatória e baixo erro instrumental.

3.3.1.4 Concentração do indicador vermelho de fenol

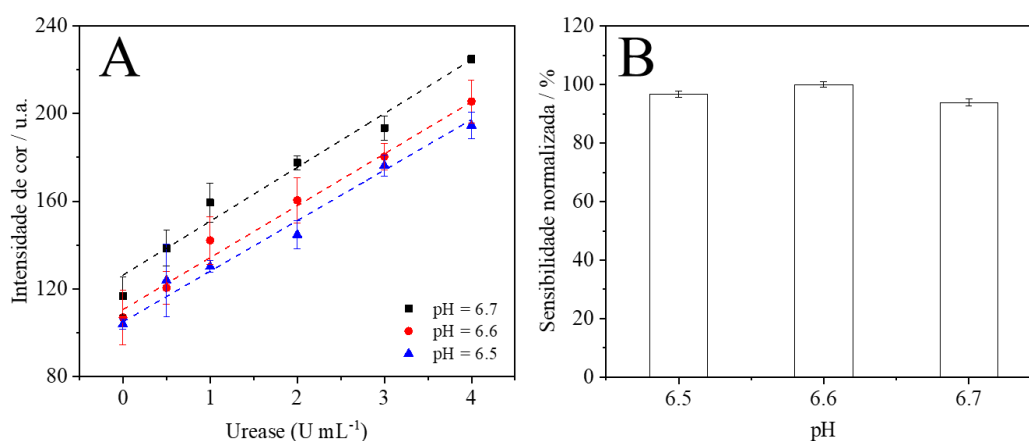
A concentração da solução do indicador foi avaliada, pois a intensidade da cor na zona de detecção depende deste parâmetro e, conseqüentemente, a sensibilidade. As concentrações 0,025 e 0,050% (m/v) mostraram sensibilidades semelhantes; entretanto, 0,025 % (m/v) revelou um menor desvio padrão e, portanto, esse valor foi selecionado (Figura 48D). Em outros sistemas envolvendo PADs, concentrações semelhantes de vermelho de fenol foram usadas determinar nitrito em saliva humana e detecção de ureia em leite adulterado (MORBIOLI *et al.*, 2017; LUTHER *et al.*, 2017). A concentração de 0,013% (m/v) levou a uma redução na variação da intensidade da cor, interferindo na resolução do sistema (gradiente de cor) e, assim, a sensibilidade analítica diminuiu (MCINTOSH *et al.*, 2010; SONI *et al.*, 2018; XIE *et al.*, 2018).

3.3.1.5 Efeito da concentração hidrogeniônica inicial (pH)

O sistema colorimétrico explorado neste trabalho é dependente do pH, e requer um controle de pH inicial rigoroso das soluções de vermelho de fenol e urease. O pH inicial do sistema foi avaliado de 5,0 a 6,8 (Figura 48E), uma vez que a transição de cor do indicador ácido-base ocorre entre pH 6,6 a 8,0. A sensibilidade analítica do método foi estatisticamente semelhante de pH 5,0

a 6,4 (ANOVA, One-Way, 95% de confiança), mas aumentou para pH 6,6 e 6,8. Assim, o pH 6,6 foi selecionado uma vez que a transição da cor do indicador (de amarelo para magenta) começa nessa condição de pH; além disso, a intensidade da variação da cor foi comparável a pH 6,8. O valor de pH selecionado está no intervalo de pH em que a atividade da urease é maximizada (pH 6,0 a 8,0) (SONI *et al.*, 2018; HOWELL, 1934; YANG *et al.*, 2015). Adicionalmente, foi feito um ensaio de robustez para pH 6,5, 6,6 e 6,7 (Figura 51), obtendo-se erro relativo menor que 5%.

Figura 51 – (A) Ensaio de robustez para pH = 6,5, 6,6 e 6,7; (B) Sensibilidade normalizada para os valores de pH avaliados.



Fonte: elaborado pela autora, 2021.

3.3.1.6 Tipo e concentração da solução tampão

A sensibilidade analítica foi avaliada usando tampão fosfato de sódio ($pK_{a2} = 7,2$), MOPS ($pK_a = 7,2$) e citrato ($pK_{a3} = 6,4$) (Figura 48F), que apresentam capacidade tamponante no intervalo de pH de atividade máxima da urease e próximo ao pH inicial selecionado (FERREIRA *et al.*, 2015; DAWSON *et al.*, 2020). O tampão fosfato de sódio foi selecionado devido a maior sensibilidade em relação a outros sistemas, menor erro e branco analítico com menor valor, corroborando com o meio reacional de outros estudos envolvendo a inibição da urease ou determinação da atividade enzimática (JANNAH & KIM, 2019; MCINTOSH *et al.*, 2010; NOIPHUNG *et al.*, 2018; SONI *et al.*, 2018).

Depois de estabelecer o sistema tampão, a influência da concentração na resposta analítica foi investigada (Figura 48G). Uma vez que a coloração na zona de detecção é dependente do pH, o sistema tampão tem como objetivo principal garantir que o pH inicial do sistema seja mantido. O aumento da concentração do tampão levou a uma diminuição da sensibilidade analítica. Esse

perfil foi semelhante ao descrito por Dindar *et al.* (2011) no desenvolvimento de um novo biossensor de ureia baseado na enzima urease obtida de *H. pylori* usada para determinar a ureia do soro humana. O resultado obtido está relacionado ao princípio do método, em que maiores concentrações do tampão impedem a alteração do pH e, conseqüentemente, o desenvolvimento do gradiente de cor. Assim, a concentração de 0,5 mM foi selecionada. Além disso, para as condições avaliadas (0,5, 1,0 e 1,5 mM), foi calculada a capacidade tamponante (β) de acordo com Urbansky & Schock (2000), obtendo-se 25,53, 36,22 e $44,43 \times 10^{-6}$ M, respectivamente. Assim, a menor capacidade tamponante para o sistema 0,5 mM diminui a influência do CO₂, mantém o pH inicial controlado e não interfere na transição de cor do pH pelo aumento da concentração de NH₃.

3.3.1.6 Efeito da concentração da ureia

O efeito da concentração de ureia na atividade enzimática foi avaliado (Figura 48H), uma vez que a reação usada depende da concentração do substrato. Em geral, a sensibilidade aumentou proporcionalmente à concentração de ureia (exceto a 10 mM). Este fator indica que a atividade da urease aumentou gradualmente até atingir a atividade máxima (EL-HEFNAWY *et al.*, 2014). Assim, a concentração de ureia selecionada foi 5 mM com base na maior sensibilidade.

O processo de otimização garantiu homogeneidade na zona de detecção e gradiente de cor, bem como maior intervalo de transição de pH do indicador e reprodutibilidade. As condições otimizadas estão resumidas na Tabela 13, enquanto na Tabela A2 (Anexo I) estão os dados dos parâmetros que foram otimizados.

Tabela 13 – Parâmetros otimizados para o UrePAD com detecção colorimétrica e determinação da urease usando o indicador vermelho de fenol.

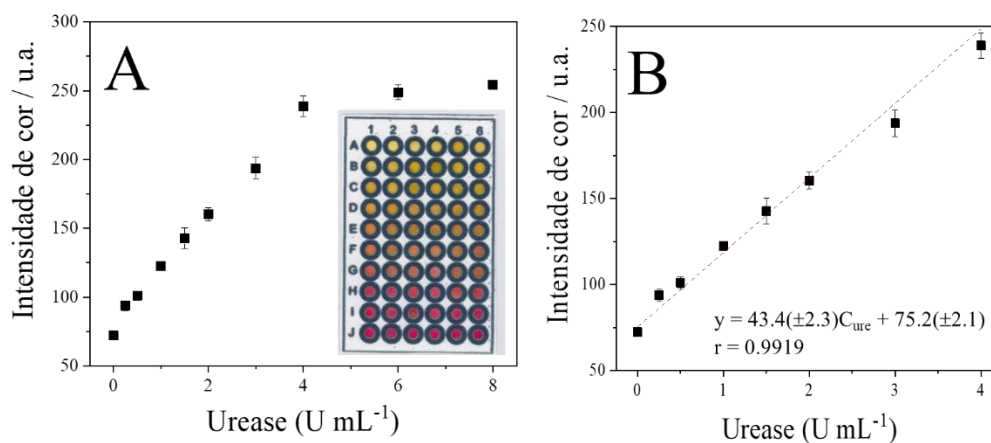
Parâmetros	Condição otimizada
Ordem de adição da solução	Ureia, urease, indicador
Volume de solução (μ L)	1,0
Tempo (min)	20
Concentração do indicador (% m/v)	0,025
pH inicial	6,6
Tipo de tampão	Fosfato de sódio
Fosfato de sódio (mM)	0,50
Concentração da ureia (mM)	5,0

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

3.3.2. Desempenho analítico do método proposto

As imagens do UrePAD foram capturadas ao final de cada ensaio em *scanner* de bancada (Figura 52A), convertidas para CMYK no *software* Corel Photo-Paint e a média aritmética da intensidade da cor foi obtida dentro de cada zona. O aumento da concentração de urease implica que mais ureia é hidrolisada, produzindo mais NH_3 , mudança no pH e, conseqüentemente, uma variação na cor do sistema (de amarelo para magenta). Com base nesse raciocínio, a curva de intensidade de cor é função da concentração de urease (Figura 52B) e permitiu a obtenção dos parâmetros analíticos do método.

Figura 52 – (A) UrePAD com alterações cromáticas correspondentes à variação da concentração de urease até a saturação; (B) Intervalo linear de resposta de intensidade de cor (CI) em função da concentração de urease (C_{ure}) ($n = 6$).



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

O ajuste linear entre intensidade de cor (CI, u.a.) vs concentração de urease (C_{ure} , U mL⁻¹) foi obtido no intervalo de concentração de 0,25 a 4,0 U mL⁻¹ com $r = 0,9919$. O limite de detecção (LOD) calculado foi de 0,10 U mL⁻¹, e o RSD $\leq 1,38\%$ para repetibilidade de 4,0 U mL⁻¹ de urease ($n = 10$), indicando a boa precisão do método.

O método proposto apresenta um limite de detecção e intervalo linear comparável a outros métodos, destacando a similaridade com o trabalho de Malekghasemi *et al.* (2016) para a determinação de urease usando uma plataforma analítica de papel e vermelho de fenol como indicador (LOD = 0,50 U mL⁻¹). A comparação do desempenho analítico do UrePAD com outros métodos para a detecção de urease está resumida na Tabela 14

Tabela 14 – Comparação do desempenho analítico dos diferentes sistemas para determinação da urease.

Método	LOD (U mL ⁻¹)	Intervalo linear (U mL ⁻¹)	RSD (%)	Plataforma analítica	Volume (μL) ^(a)	Tempo (min) ^(b)	Aplicação	Ref.
Espectrofotométrico / Colorimétrico	7×10 ⁻¹¹	2×10 ⁻¹¹ – 2×10 ⁻⁴	(n.i.)	Solução – vesículas de polidiacetileno	> 100	15	Inibidor	JANNAH & KIM, 2019
Radiométrico	(n.i.)	0,8 – 16	(n.i.)	Solução - [¹⁴ C]ureia	> 1000 ^(c)	60 – 180	Inibidor	HARRIS <i>et al.</i> 1997
Endoscópico	(n.i.)	0,33 – 33	(n.i.)	Sensor endoscópico	(n.i.)	2	Mucosa gástrica	SATO <i>et al.</i> 1999
Colorimétrico	250	(n.i.)	(n.i.)	Adsorção em fase sólida / mudança de cor	(n.i.)	< 20	Mucosa gástrica	SATO <i>et al.</i> 2000
Voltamétrico	0,009 ^(d)	0,045 – 2,7 ^(e)	< 5	Eletrodo de Hg e nanoeletrodo de Ni	> 10 ^(c)	2	(n.i.)	HUBALEK <i>et al.</i> 2007
Espectrofotométrico / colorimétrico	(n.i.)	10 – 100	(n.i.)	Solução – vermelho de fenol	330	60	Microorganismos	OKYAY <i>et al.</i> 2013
Epectrofotométrico	0,01	0,03 – 0,15	(n.i.)	Solução - AgNPs	2000		Bactéria	MICHAEL <i>et al.</i> 2015
Epectrofotométrico	0,00055	0,0022 – 0,055	3,2	Solução – pH-sensitive Au-nanocluster	(n.i.)	43	Mucosa gástrica e inibidores	DENG <i>et al.</i> 2015
Espectrofotométrico	0,0018	0,0018 – 0,09	3,2	Solução - AuNP	1000	40	Inibidor	DENG <i>et al.</i> 2016
Colorimétrico	0,5	1 – 20	(n.i.)	Papel de filtro qualitativo modificado	> 5	10	(n.i.)	MALEKGHASEMI <i>et al.</i> 2016
Potenciométrico	(n.i.)	1 – 50	(n.i.)	Solução – sensor potenciométrico pH/RuO ₂	300	(n.i.)	Cultura de <i>H. pylori</i>	LONDDALE <i>et al.</i> 2017
Fotoeletrônico	0,75	1,3 – 3,3	3,89	Solução – Análise em fluxo	> 10	10	Feijão, lentilha, ervilha	BZURA <i>et al.</i> 2019
Fotoeletrônico	0,02	0,02 – 5,3	1,94	Solução – Análise em fluxo	> 10	5	Feijão, lentilha, ervilha	BZURA <i>et al.</i> 2019
Espectrofotométrico	0,1 ^(f)	0,1 – 15 ^(g)	2,71	Solução – inositol hexafosfato estabilizado por AgNPs	10	> 30	Saliva humana	HU <i>et al.</i> 2019
Colorimétrico	0,10	0,25 – 4	1,38	Papel cromatográfico	3	20	Solos e inibidores	Este trabalho

^(a) Soma dos volumes de ureia, urease, tampão, reagentes colorimétricos e outros agentes adicionados ao sistema antes da medida. ^(b) Não considera tempo de incubação, síntese de nanopartículas, ou seja, apenas o tempo do processamento da reação principal até a medida. ^(c) Não foram informados os volumes de todos os reagentes utilizados, por isso o uso do sinal (>). ^(d) Valor descrito: 200 ng mL⁻¹; ^(e) 1 – 60 μg mL⁻¹; ^(f) 2,35 μg mL⁻¹; ^(g) 2,35 – 37,5 μg mL⁻¹, convertidos em U mL⁻¹ considerando Jack Bean, tipo III; 45 000 U g⁻¹ obtidos na Sigma Aldrich (St. Louis, USA). ^(m) não informados.

Dentre os métodos, o UrePAD apresentou intervalo de detecção relativamente mais ampla do que os métodos *i)* espectrofotométricos/colorimétricos que empregaram solução e vermelho de fenol e *ii)* fotoeletrônico com sistema de análise de fluxo mecanizado. Além disso, LOD menor que o método colorimétrico por adsorção em fase sólida e fotoeletrônico. Outros métodos com melhores LODs e intervalo linear apresentados na Tabela 14 utilizam instrumentação mais complexa, maior volume e outras espécies químicas para melhorar a reação. Além disso, apresentam desvantagens como dependência da síntese de vesículas de polidiacetileno, nanopartículas ou nanoclusters de ouro (com as mesmas características morfológicas), custos mais elevados considerando toda a análise ou uso de espécies tóxicas (como o Hg).

Em relação ao tempo de análise, observa-se que as variações dependem do tipo do papel empregado (com ou sem modificação), sistema de medida (espectrofotométrico, voltamétrico, fotométrico) aliado ao uso de agentes cromogênicos, espécies oxidantes/redutoras importantes para a finalidade pretendida. Assim, UrePAD apresenta-se como uma plataforma alternativa para detecção de urease em solos e avaliação de *screening* de inibidores, com as vantagens de utilizar um menor volume total de reagentes, tempo comparável, fácil operação, não requer superfície de papel modificada e, portanto, possui baixo custo.

3.3.2. Aplicação do UrePAD

3.3.2.1 Determinação da atividade e inibição das ureases do solo

O dispositivo desenvolvido foi aplicado na determinação da atividade de ureases em quatro amostras de solo (Tabela 15) e os resultados foram obtidos a partir de relações matemáticas entre a intensidade de cor da amostra contendo as ureases extraídas do solo em relação à curva analítica e a equação obtida por um ajuste linear. Foi empregada a relação de que 1 U de urease hidrolisa 1 μmol de ureia produzindo 2 μmol de NH_3 por minuto (KARMALI *et al.*, 2004). Os valores foram normalizados pela massa do solo após centrifugação da suspensão. Os resultados foram comparados com a atividade da urease pelo método espectrofotométrico do indofenol (referência) (Tabela 15). A atividade da urease em cada sistema foi calculada de acordo com o ajuste linear da curva com o padrão NH_4Cl .

Tabela 15 – Atividade das ureases do solo usando UrePAD e método espectrofotométrico do indofenol ($n = 4$).

Solo	Atividade das ureases dos solos ($\mu\text{mol N-NH}_4 \text{ g}^{-1}$ de solo)	
	UrePAD	Método do indofenol (referência)
S1	7,35 \pm 1,63	7,19 \pm 0,25
S2	12,25 \pm 0,64	8,23 \pm 0,18
S3	18,35 \pm 4,17	20,90 \pm 0,24
S4	24,63 \pm 3,18	22,86 \pm 0,25

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Os resultados obtidos por ambos os métodos foram comparados aplicando teste-*t* Student pareado, demonstrando que não há diferença estatística para a atividade da urease obtida pelo UrePAD e pelo método do indofenol ao nível de 95% de confiança ($t_{\text{calculado}} = 0,62 < t_{\text{crítico}} = 3,18, p = 0,58 > \alpha = 0,05$). Portanto, UrePAD é efetivo para quantificação da atividade das ureases de solos com menores (S2) ou maiores teores (S1, S3, S4) de matéria orgânica.

Da mesma forma, os ensaios de inibição da atividade da urease no solo foram realizados usando NBPT 1 mM (concentração final no solo) como modelo de inibidor (Tabela 16). Os resultados obtidos pelo UrePAD foram comparados com o método do indofenol. Os valores de inibição foram calculados considerando que o sistema sem inibidor corresponde a 100% (atividade enzimática); assim, o percentual de inibição nas amostras de solo foi estabelecido a partir de relações matemáticas entre as intensidades da cor na ausência e presença do inibidor.

Tabela 16 – Inibição das ureases do solo ($n = 4$) obtidos com UrePAD e pelo método do indofenol para NBPT 1 mM (concentração final no solo).

Solo	Inibição da atividade das ureases do solo (%)	
	UrePAD	Método do indofenol
S1	53,7 \pm 5,4	50,5 \pm 0,6
S2	48,1 \pm 2,6	41,1 \pm 0,4
S3	54,6 \pm 6,9	42,6 \pm 1,0
S4	61,7 \pm 3,0	66,4 \pm 0,5

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Baseado no teste-*t* Student pareado, os resultados de inibição das ureases do solo pelo NBPT (1 mM) obtidos pelo UrePAD não diferem estatisticamente do método do indofenol ao nível de 95% de confiança ($t_{\text{calculado}} = 1,24 < t_{\text{crítico}} = 3,18, p = 0,30 > \alpha = 0,05$), indicando que UrePAD pode ser empregado como uma plataforma analítica para determinação da atividade e inibição das ureases dos solos. Nesse sentido, UrePAD corresponde a uma estratégia portátil e simples comparada ao método do indofenol, considerando que ambos dependem do procedimento de extração das ureases do solo.

Além disso, UrePAD pode ser empregado em laboratórios de análises físico-químicas de solos, os quais podem fornecer uma informação importante (atividade da urease no solo

avaliado) para tomada de decisão em relação à quantidade de fertilizante adicionada em diferentes culturas e aquisição de fertilizante de eficiência aumentada.

3.3.2.1 Determinação do IC_{50} para diferentes inibidores usando UrePAD

Oito inibidores foram avaliados para inibição *in vitro* da urease e o IC_{50} calculado a partir da intersecção dos eixos do gráfico de atividade da urease vs concentração do inibidor. (Figura 53). Os valores foram obtidos considerando 100% de atividade da urease na ausência do inibidor. Portanto, O IC_{50} foi calculado para sistemas com diferentes concentrações do inibidor (Tabela 17).

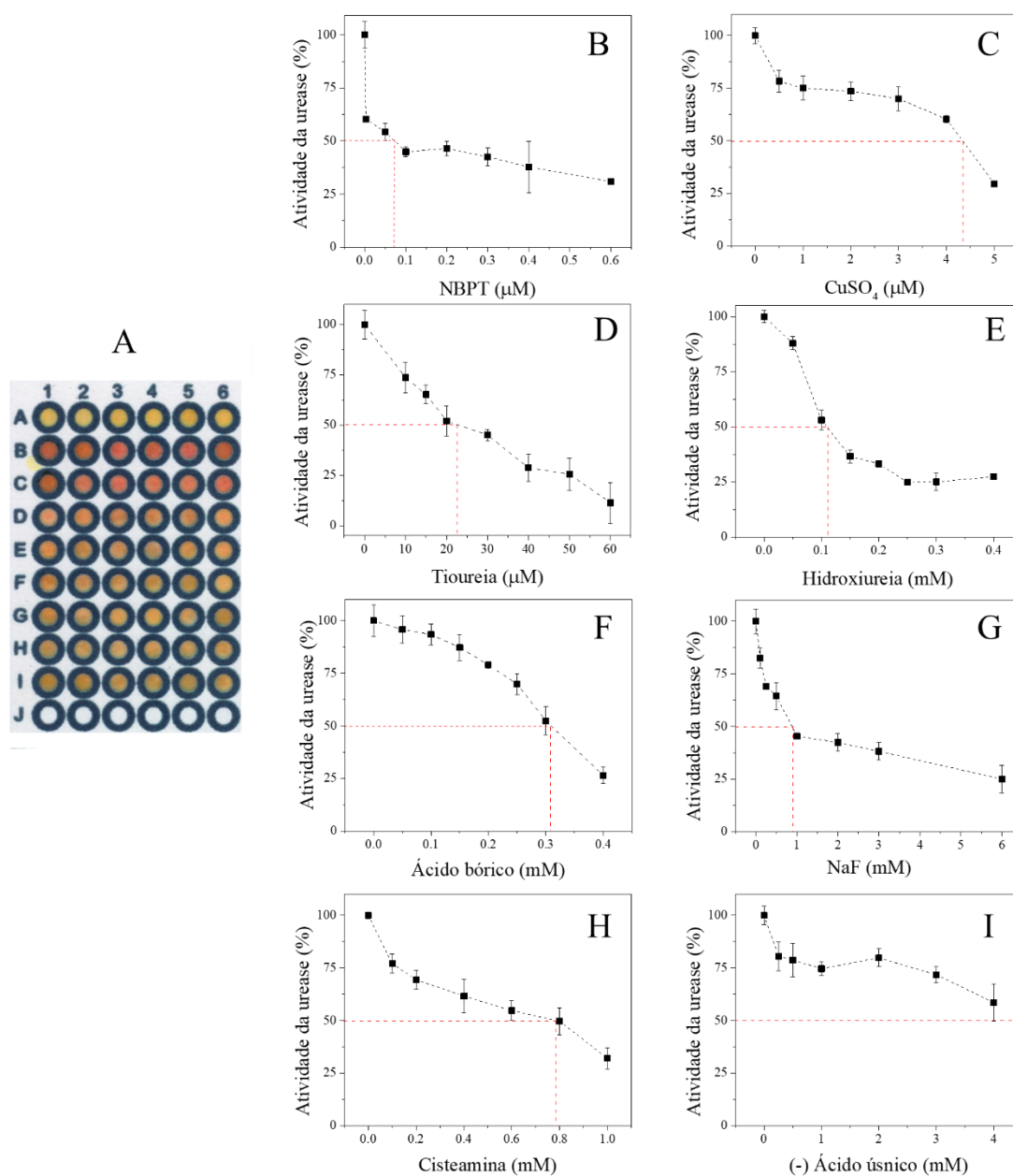
Tabela 17 – Valores de IC_{50} para os diferentes inibidores de urease, obtidos pelo UrePAD e pelo método de referência do indofenol.

Inibidor	Tipo de inibidor	IC_{50} (μ M)		
		UrePAD	Indofenol	Literatura
NBPT	Competitivo	0,073 \pm 0,001	0,108 \pm 0,015	0,10 ^a e 2,60 ^b
CuSO ₄	Não-competitivo	4,32 \pm 0,39	4,32 \pm 0,24	2,30 ^c e 1,99 ^d
Tioureia	Competitivo	22,2 \pm 4,7	29,9 \pm 3,9	22,3 ^e e 21,0 ^f
Hidroxiureia	Competitivo	109 \pm 4	81,1 \pm 1,0	100 ^g
Ácido bórico	Competitivo	308 \pm 4	242 \pm 7	220 ^h
NaF	Competitivo	870 \pm 54	863 \pm 42	600 ⁱ
Cisteamina	Competitivo	784 \pm 46	1170 \pm 45	> 10 ^j
(-) ácido úsnico	Competitivo	> 4000	2620 \pm 41	5800 ^k

^aDOMÍNGUEZ *et al.* 2008; ^bJIANG *et al.* 2016; ^cJUNG *et al.* 1995; ^dCHEN *et al.* 2017; ^eHANIF *et al.* 2012; ^fHAMEED *et al.* 2015; ^gASADI *et al.* 2018; ^hDU *et al.* 2012; ⁱKRAJEWSKA *et al.* 2007; ^jTODD *et al.* 1989; ^kVICENT *et al.* 1979.

Os valores de IC_{50} para os inibidores não diferem estatisticamente quando comparados com os valores obtidos pelo UrePAD e pelo método espectrofotométrico do indofenol (referência) aplicando teste-*t Student* pareado ao nível de 95% de confiança ($t_{\text{calculado}} = 0,72 < t_{\text{crítico}} = 2,44$, $p = 0,49 > \alpha = 0,05$), indicando que UrePAD pode ser usado para *screening* e avaliação de diferentes classes de potenciais inibidores. Por fim, alguns dos valores de IC_{50} reportados diferem dos obtidos pelo UrePAD e do método de referência (Tabela 17) pois isso depende da concentração da enzima, do substrato e das condições reacionais.

Figura 53 – (A) UrePAD usado no ensaio de inibição com HU, onde na linha A está o branco analítico (ausência da urease); na linha B está a referência (sem inibidor = 100% atividade da enzima) e a partir de C até I há aumento na concentração do inibidor. Determinação do IC_{50} por intersecção dos eixos em 50% da atividade enzimática em função da concentração do inibidor: (B) NBPT; (C) $CuSO_4$; (D) Tiourea; (E) Hidroxiureia; (F) Ácido bórico; (G) NaF; (H) Cisteamina; (I) (-) ácido úsnico.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

3.3.3. Conclusões

Foi desenvolvido um dispositivo analítico em papel com detecção colorimétrica de urease, fabricado pela técnica de impressão em cera e com múltiplas zonas de detecção. Na presença de urease, as mudanças na resposta da intensidade da cor foram proporcionais à concentração. O UrePAD pode detectar com sucesso, e satisfatoriamente para as aplicações que se propõe, a quantidade de urease no intervalo de 0,25 - 4 U mL⁻¹, e limite de detecção obtido (0,10 U mL⁻¹). O método colorimétrico UrePAD mostrou-se uma plataforma eficiente e promissora para a obtenção de uma resposta semiquantitativa e qualitativa para determinar a atividade de ureases de solos e estudos *in vitro* na avaliação contra potenciais inibidores. Os resultados foram comparados ao método espectrofotométrico do indofenol (referência), e os valores do dispositivo não diferiram significativamente dos valores de referência. Além disso, pode abrir novas possibilidades e se estender ainda mais a uma variedade de dispositivos de teste no ponto de atendimento, combinando praticidade, portabilidade e baixo custo.

3.4 DESENVOLVIMENTO DO MULTICOLOR PAD

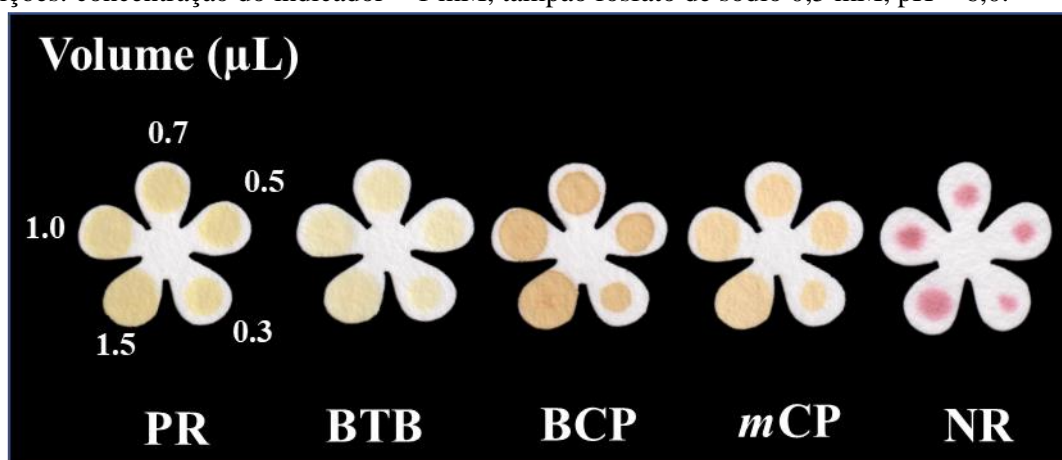
3.4.1 Otimização dos parâmetros para determinação da urease no Multicolor PAD

O dispositivo selecionado no formato de flor com cinco pétalas pode ser utilizado como replicatas de uma única condição ou análise de até quatro níveis de concentração ou de um controle. Para obter um melhor resultado colorimétrico referente à determinação da atividade da urease empregando indicadores ácido-base, faz-se necessária a otimização de parâmetros físico-químicos. A mudança de cor do sistema se dá pela desprotonação do indicador por NH_3 produzido pela hidrólise da ureia catalisada pela urease e, conseqüentemente, aumento do pH, empregando um tempo fixo. Assim, quanto mais intensa a cor (exceto para o vermelho neutro), maior a quantidade de urease presente e sua atividade da urease, permitindo construir curvas analíticas para obtenção das figuras de mérito após seleção dos melhores parâmetros analíticos.

3.4.1.1 Definição da zona de detecção

O presente dispositivo não possui barreiras hidrofóbicas de cera, sendo necessário delimitar a zona de detecção para cada indicador a partir do volume de reagente colorimétrico. A Figura 54 mostra o resultado da otimização de volume para a zona de detecção (pétalas) variando de 0,3 a 1,5 μL , de acordo com o protocolo empregado por Sun & Johnson (2015), e Yu, Deng & Yang (2019) com adaptações. O volume ótimo (quantidade de solução suficiente para preencher a pétala e permitir a medida da intensidade de zona de reação), para os indicadores BTB, PR, BCP e *m*CP foi 1,0 μL , contudo, para o NR foi necessário 1,5 μL .

Figura 54 – Avaliação do volume do indicador para delimitar a zona de detecção do Multicolor PAD. Condições: concentração do indicador = 1 mM, tampão fosfato de sódio 0,5 mM, pH = 6,0.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Uma possível justificativa para esse efeito da maior interação entre a estrutura celulósica e o indicador NR foi racionalizada por Purigton *et al.*, (2019). Os autores ao avaliarem a proporção de corante para unidade de repetição do polímero (F/C) de diferentes moléculas com a celulose, observaram que pigmentos carregados positivamente foram adsorvidos em maior extensão e que a lignina presente nas fibras de celulose (0,3%) pode contribuir para os valores de F/C mais altos devido à alta afinidade de interação com os centros positivos.

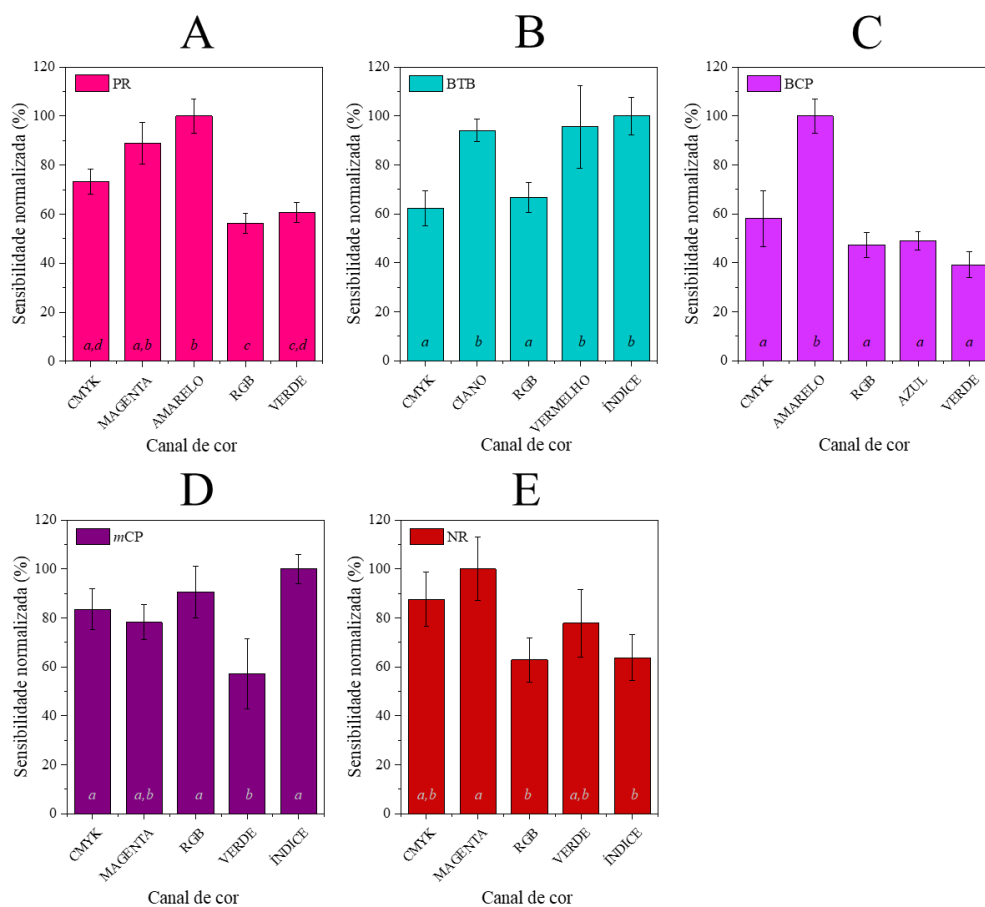
3.4.1.2 Canal de cor

Os modelos de cores comumente usados em Química Analítica para exibir o espectro de cores dos sensores são RGB (vermelho, verde, azul) e CMYK (ciano, magenta, amarelo, preto), sendo o RGB considerado um modelo aditivo, em que a cor é uma combinação entre as três cores primárias de vermelho, verde e azul, enquanto o CMYK é um modelo subtrativo, o que significa que a cor pode ser gerada subtraindo as cores primárias da luz branca (PHUANGSAIJAI, JAKMUNEE & KITTIWACHANA, 2021).

Avaliou-se o canal de cor, pois na detecção colorimétrica se assume que a mudança de intensidade do sistema está relacionada à variação da concentração do analito, a partir das imagens digitais (obtidas por *scanner* de bancada). Foram avaliados 5 canais de cor para o sistema RGB e 5 canais de cor (vermelho, verde, azul e índice – após conversão da imagem para cores da paleta e o conjunto RGB) para o sistema CMYK (ciano, magenta, amarelo, preto e o conjunto CMYK) para obtenção da intensidade média de cor cada zona de detecção (Figura A2) e apenas os 5 canais que apresentaram relação linear com o aumento da concentração da urease foram avaliados quanto à linearidade, sensibilidade e análise estatística (Figura 55). O canal de índice para cada indicador corresponde à converter à imagem para cores da paleta do indicador no sistema RGB padrão e selecionar a cor de índice (183 para PR, 57 para BTB, 113 para BCP, 117 para *m*CP e 144 para NR) para seguir com as medidas em cada zona de detecção.

Para cada indicador os valores de sensibilidade para cada linearização foram normalizados e comparados estatisticamente por ANOVA *one-Way* e teste de *Tukey* ($p_{PR} = 1,98 \times 10^{-5}$; $p_{BTB} = 1,45 \times 10^{-3}$; $p_{BCP} = 7,45 \times 10^{-6}$; $p_{mCP} = 3,42 \times 10^{-3}$; $p_{NR} = 1,11 \times 10^{-2}$; $\alpha = < 0,05$;) (Figura 55A), Considerando a sensibilidade analítica com desvio padrão e a linearidade, os canal de cor selecionado foi: magenta PR, ciano para BTB, amarelo para BCP, CMYK para *m*CP e para NR.

Figura 55 – Sensibilidade analítica normalizada para a avaliação do melhor canal de cor para cada indicador. Condições: Urease 0 – 4 U mL⁻¹, Ureia 20 mM, Indicador = 1 mM, tampão fosfato de sódio 0,5 mM, pH = 6,0.



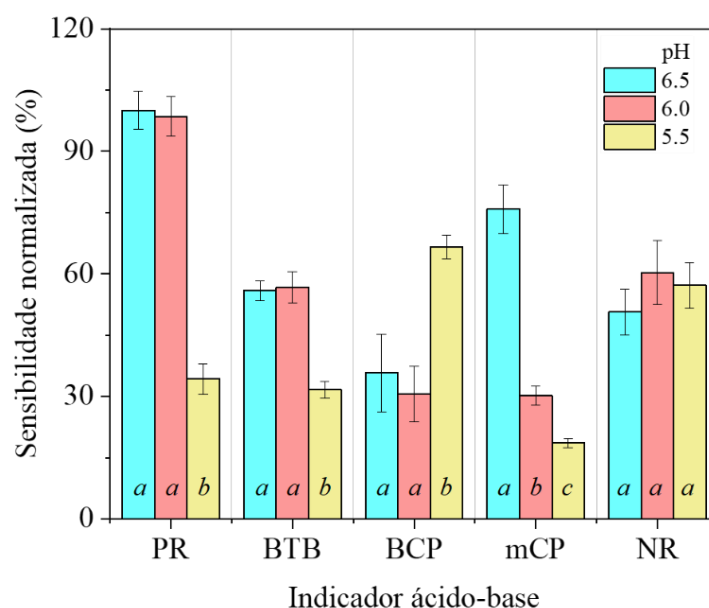
Fonte: elaborado pela autora, 2022.

Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os resultados ao nível de 95% de confiança.

3.4.1.3 pH inicial

Um indicador de pH tem duas formas principais em solução aquosa. De forma genérica: HInd a um pH inferior ao valor de pK_a e Ind⁻ a um pH superior ao valor de pK_a e, portanto, a transferência de um próton causa uma mudança de cor visível na solução em pH específico com uma diferença nas estruturas de ressonância (ITO, 2016). Determinar o pH inicial de cada indicador é um parâmetro importante, pois os indicadores ácido-base utilizados apresentam diferentes intervalos de transição de cor (ERICSON *et al.*, 2021; MEYER *et al.*, 2014; ITO, 2016) A sensibilidade analítica (Figura 56) foi obtida para os valores de pH = 5,5; 6,0 e 6,5, os quais contemplam a transição de cor de todos os indicadores (Figura 57) e o intervalo de atividade máxima da enzima (pH 6,0 – 8,0) (Howell & Sumner, 1934).

Figura 56 – Sensibilidade analítica normalizada para avaliação do pH inicial de cada indicador. Condições: Urease 0 – 4 U mL⁻¹, Ureia 20 mM, Indicador = 1 mM, tampão fosfato de sódio ou acetato de sódio 0,5 mM.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

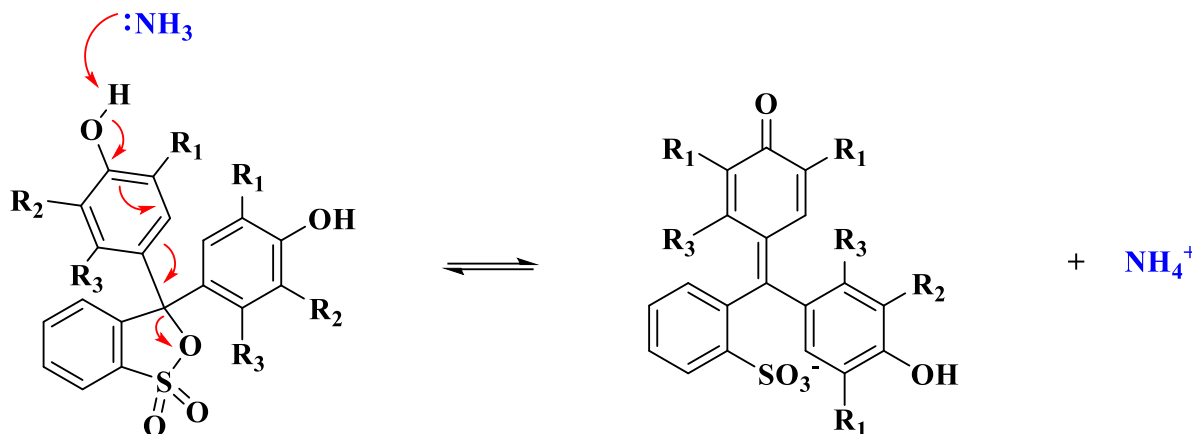
Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os resultados para o mesmo indicador ao nível de 95% de confiança (ANOVA *One-Way* e *Tukey test*).

Para os indicadores BCP e *mCP*, os valores selecionados foram pH 5,5 e 6,5, respectivamente. Esses valores estão diretamente relacionados com o pH inicial da transição de cor do indicador, permitindo um maior gradiente de coloração e, conseqüentemente, maior inclinação da reta no intervalo de 0 a 4,0 U mL⁻¹ de urease. Esses dados corroboram com os trabalhos de Tirapu-Azpiroz *et al.* (2021) e Ito (2016) que utilizaram BCP e indicaram uma região de trabalho em pH entre 5,0 e 7,0 nas condições otimizadas, mas um gradiente bem definido entre pH 5,5 - 8,0. Para o *mCP* a transição de cor é no intervalo de pH 6,0 a 8,0 e o gradiente de cor bem definido no intervalo 6,5 - 9,0 (ZOU *et al.*, 2017).

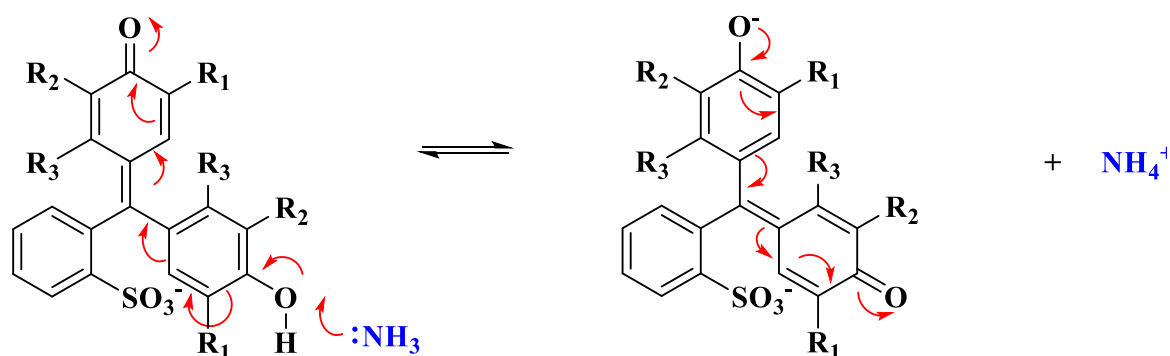
Os indicadores PR, BTB e NR não apresentaram diferença significativa de sensibilidade ao nível de 95% de confiança para os valores de pH 6,0 e 6,5, o que também está relacionado com os valores de pK_a. Esses resultados estão de acordo com os resultados de Tavares *et al.* (2021), para o PR em que ambos os sistemas, o indicador apresentou boa sensibilidade. Para o BTB os resultados corroboram com o trabalho de Shimada & Hasegawa (2017), cujo intervalo de transição de cor foi definido entre pH 6,0 - 8,0. Nos trabalhos de Ericson *et al.* (2021) e Tanner *et al.* (2015), o intervalo de transição com gradiente observado para NR foi nos intervalos pH 5,9 - 8,2 e 6,5 - 9,0, respectivamente. Neste trabalho, o pH inicial igual à 6,5 foi selecionado para PR, BTB *mCP* e NR e pH 5,5 para BCP em virtude do valor de pH inicial da transição do indicador, permite maior sensibilidade associada ao menor valor do branco.

Figura 57 – Desprotonação dos indicadores ácido-base (PR, BTB, BCP, *m*CP, NR) após hidrólise da ureia, resultando em mudança de cor do indicador.

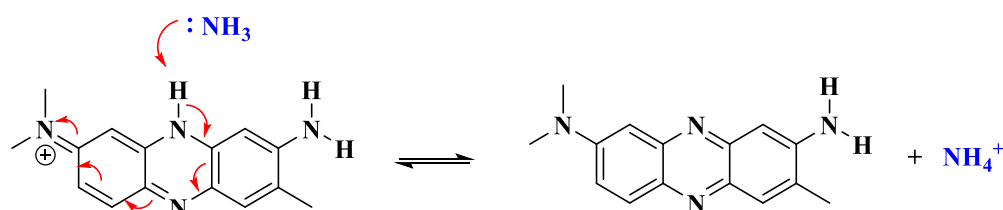
Etapa I



Etapa II



Indicador	R1	R2	R3	pK _a	Intervalo de transição
Vermelho de fenol (PR)	H	H	H	7.5	6.6 – 8.0
Azul de Bromotimol (BTB)	<i>i</i> Pr	Br	CH ₃	7.4	6.5 – 8.5
Roxo de bromocresol (BCP)	Br	CH ₃	H	6.3	5.0 – 7.5
Roxo de <i>m</i> -cresol (<i>m</i> CP)	H	H	CH ₃	8.5	7.0 – 9.5
Vermelho neutro (NR)	-	-	-	6.8	6.5 – 8.0



Fonte: elaborado pela autora, 2022.

3.4.1.4 Seleção do substrato de papel

A disponibilidade comercial de uma variedade de papéis com diferentes características torna necessária a seleção dessa variável para a fabricação de PADs e para o desenvolvimento de metodologias analíticas empregando essa plataforma. Os papéis de filtro e cromatográficos Whatman são amplamente utilizados devido ao seu baixo custo e disponibilidade, além de propriedades físicas (porosidade, espessura e velocidade de absorção) bem caracterizadas, as quais influenciam na taxa de transporte, intensidade de cor, volume da amostra, possibilidade de revestimento e impregnação de reagentes, entre outros (NOVIANA *et al.*, 2020).

Dentre os papéis disponíveis comercialmente empregados em dispositivos colorimétricos e microfluídicos, pode-se destacar: papel de filtro Whatman grade 1, 4 e 6, papel cromatográfico nº 1 e 3MM, P81, membrana de filtro celulósica regenerada (RC60), membrana de filtro Millipore (MCE), Canson, papel de filtro JProLab JP40, papel vegetal, entre outros (TAI, CHOU & FU, 2021; NOVIANA *et al.*, 2020; BUSA *et al.*, 2016). Entretanto, neste trabalho foram avaliados apenas três substratos em papel, considerando que a composição é unicamente celulose para todos, o baixo custo, e a variação na espessura ou na velocidade de fluxo (Tabela 18).

Tabela 18 – Especificações dos substratos de papel filtro qualitativo grade 1, Whatman:cromatográficos N°1 e 3MM.

Substrato de papel	Filtro qualitativo	Cromatográfico	
	Grade 1	N° 1	3MM
Tipo de material	celulose	celulose	celulose
Espessura (μm)	180	180	340
Tamanho de poro	10,5	10,9	19,1
Tamanho das fibras	19 ± 1	15 ± 1	10 ± 3
Velocidade de fluxo	ni*	130 mm (30 min)	130 mm (30 min)

*ni = não informado.

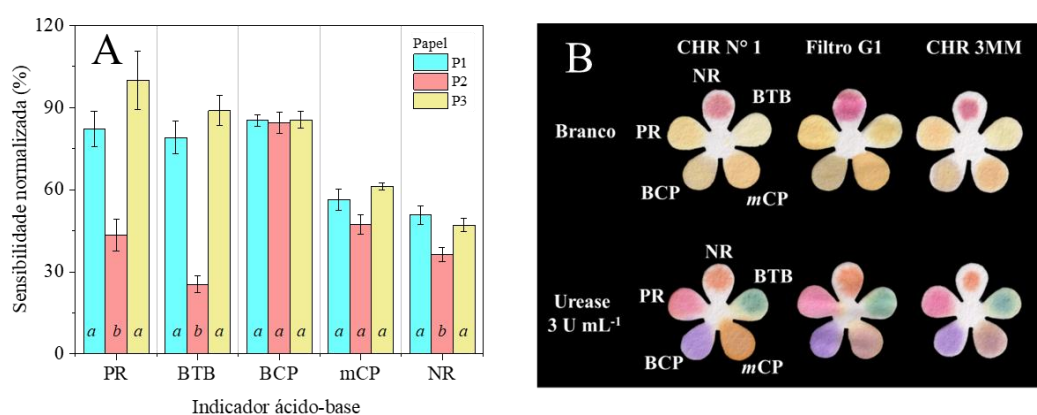
Fonte: Adaptado de Evans *et al.*, 2014, Noviana *et al.*, 2020.

A composição celulósica fornece alta relação superfície-volume, fácil transporte de líquido, capacidade de armazenar componentes químicos em sua forma ativa dentro da rede de fibras do papel, é compatível com biomoléculas (proteínas, enzimas, anticorpos) e com o meio ambiente, pois o descarte causa menor impacto ambiental (BUSA *et al.*, 2016). De modo geral, os papéis de filtro qualitativo grade 1 são mais utilizados devido ao baixo custo, em relação aos demais, fácil modelagem usando técnicas de corte ou impressão simples. O papel Whatman cromatográfico N° 1 tem propriedades físicas semelhantes às do papel de filtro grade 1, mas não contém agentes fortalecedores ou clareadores, o que reduz a possibilidade de interferentes durante a análise, justificando também a sua ampla utilização em dispositivos colorimétricos e

microfluídicos (NOVIANA *et al.*, 2020). O papel Whatman CHR 3MM possui alta qualidade, pureza e consistência e proporciona boa repetibilidade (MAHMUD *et al.*, 2018)

Para avaliar como o tipo de papel influencia na sensibilidade analítica do método, foram feitas curvas analíticas para cada indicador empregando três papéis selecionados (papeis filtro grade 1, Whatman cromatográficos N°1 e 3MM) (Figura 58).

Figura 58 – (A) Sensibilidade normalizada para avaliação do substrato de papel (P1 = filtro qualitativo grade 1, P2 = CHR N° 1, P3 = CHR 3MM). Condições: Urease 0 – 4 U mL⁻¹, Ureia 20 mM, Indicador = 1 mM, tampão fosfato de sódio 0,5 mM, pH = 6,5 ou tampão acetato de sódio 0,5 mM, pH 5,5. (B) Imagens comparativa entre o sistema na ausência (branco) e na presença da urease (3 U mL⁻¹) para os papéis P1, P2 e P3 empregando os indicadores ácido base.



Fonte: elaborado pela autora, 2022.

Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os resultados para o mesmo indicador ao nível de 95% de confiança (ANOVA *One-Way* e *Tukey test*).

Os indicadores BCP e mCP não apresentaram diferenças significativas de sensibilidade em função do papel ao nível de 95% de confiança (ANOVA *One-Way*), enquanto os indicadores PR, BTB e NR apresentaram melhor desempenho para os papéis de filtro (P1) e CHR 3MM (P3), o que pode estar relacionado com a maior intensidade de cor observada para esses indicadores ao utilizar os papéis Filtro grade 1 e CHR 3MM (Figura 58). Esses resultados corroboram com as observações de Evans *et al.* (2014), ao avaliar o tipo de substrato para o volume de 1 µL, onde cada microzona apresentou gradiente de cor equivalente para Filtro grade 1 e CHR 3MM. Além disso, o CHR 3MM apresenta maior velocidade de absorção, enquanto os papéis filtro grade 1 e CHR n°1 favorecem o deslocamento de proteínas/enzimas ligadas à superfície do papel quando a amostra é absorvida, causando distribuição desigual. Assim, para este trabalho o papel 3MM foi selecionado, pois além de apresentar maior pureza, fibras menos espessas (levando a maior velocidade de absorção) (EVANS *et al.*, 2014; MAHMUD *et al.*, 2018), apresentou boa intensidade de cor e maior sensibilidade para um maior conjunto de indicadores.

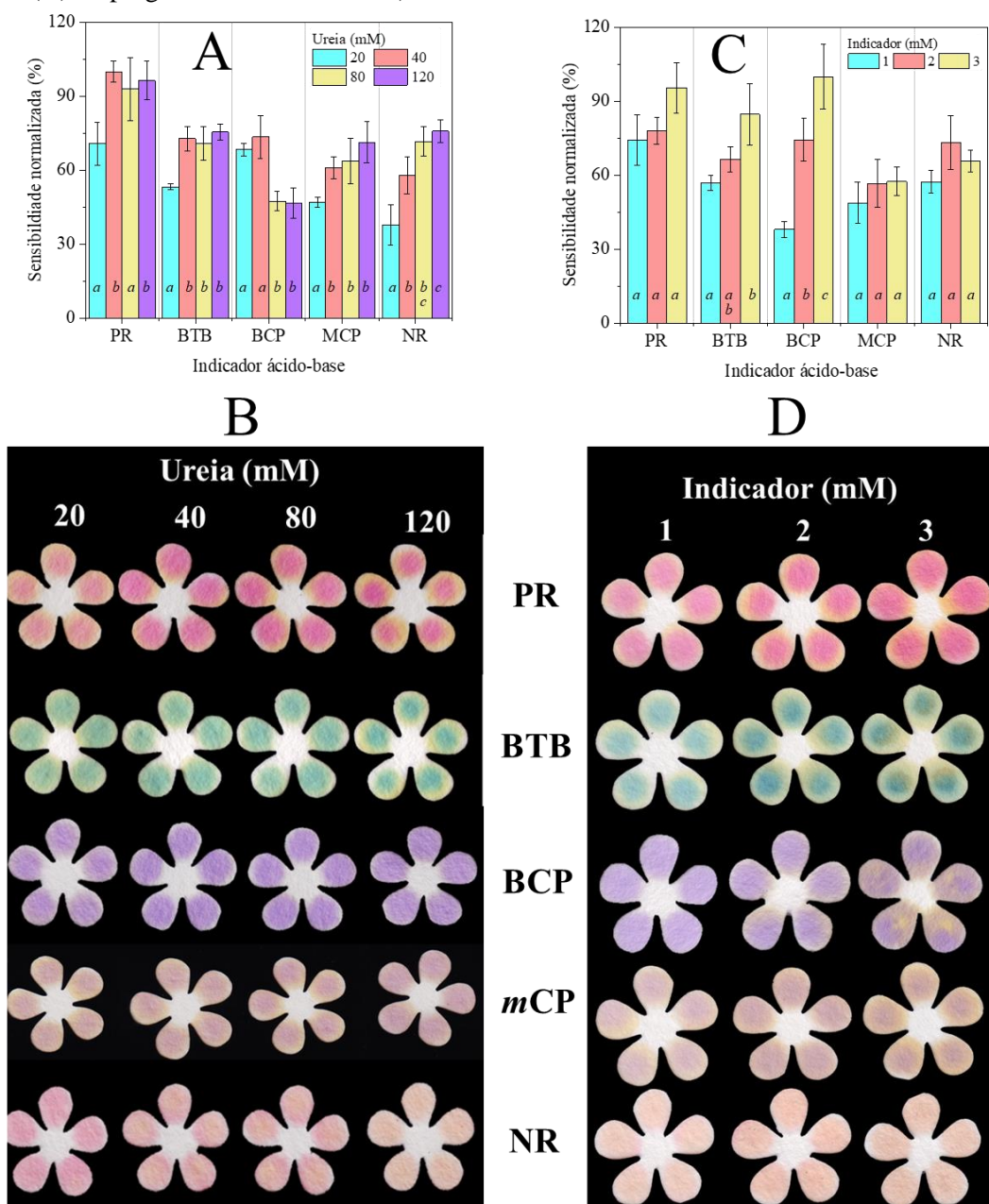
3.4.1.5 Concentração da ureia

Foram avaliados quatro níveis de concentração da ureia (20, 40, 80 e 120 mM) (Figura 59A -B), buscando selecionar a quantidade de substrato que proporcione a maior atividade enzimática no sistema considerado (EL-HEFNAWY *et al.*, 2014). Observa-se que o aumento da concentração da ureia (de 20 para 40 mM) leva ao aumento da sensibilidade para todos os indicadores, enquanto concentrações superiores (80 e 120 mM) não apresentaram diferença significativa em relação ao valor de 40 mM (exceto para BCP), indicando que já ocorreu a saturação do sistema. O comportamento do BCP frente às concentrações 80 e 120 mM possivelmente se dá pela saturação da cor desse indicador devido às maiores quantidades de NH_3 , resultando num menor gradiente de cor, menor inclinação da reta e conseqüentemente, menor sensibilidade. Além dos aspectos quantitativos, vale destacar que o aumento da concentração da ureia resulta em maior intensidade de cor, sendo um parâmetro importante para aplicação do dispositivo para análise qualitativa (sim/não). Nesse sentido, considerando os aspectos quantitativos e qualitativos, foi selecionada a concentração de 80 mM.

3.4.1.6 Concentração do indicador

A concentração da solução de cada indicador foi avaliada, pois trata-se de um parâmetro importante para a intensidade de cor e sensibilidade analítica. Por se tratar de um trabalho envolvendo indicadores ácido-base com diferentes massas molares, optou-se por avaliar a concentração em quantidade de substância (mol L^{-1}) e não do modo habitual relatado em diferentes trabalhos que utilizam concentração percentual (% em m/v). As concentrações 1, 2 e 3 mM foram avaliadas, notando-se um aumento na intensidade de cor e da sensibilidade com o aumento da concentração do indicador (Figura 59C-D). Entretanto, para o BTB foi observado uma retenção no papel para a concentração de 3 mM (Figura 59D) e, portanto, a concentração 2 mM foi selecionada, com base nos resultados obtidos.

Figura 59 – (A) Sensibilidade normalizada para avaliação da concentração do substrato ureia com as respectivas representações de mudança de cor (B) empregando urease 3 U mL⁻¹; (C) sensibilidade normalizada para avaliação da concentração do indicador com as respectivas representações de mudança de cor (D) empregando urease 3 U mL⁻¹).



Fonte: elaborado pela autora, 2022.

O desvio padrão para as médias dos experimentos foi calculado em $n = 5$. A avaliação estatística dos resultados foi realizada por ANOVA *One Way* e teste de Tukey com 95% de confiança. Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as condições para o mesmo indicador.

3.4.1.7 Modificação da superfície do papel

O desenvolvimento de dispositivos envolvendo moléculas biológicas, como enzimas, anticorpos e proteínas, para atendimento no *Point-of-Care* trouxe uma crescente necessidade de formas de melhorar a mobilização e a estabilização em substratos sólidos como o papel (CAO *et al.*, 2017). A estrutura fibrosa e porosa do papel permite que ocorram processos de

funcionalização da superfície com maior facilidade em comparação com outros materiais, alterando propriedades como hidrofobicidade, permeabilidade, reatividade e interação com diferentes moléculas de interesse. Modificadores de superfície, polímeros e sililanos, como quitosana, alginato, PVP, PVA (álcool polivinílico), TEOS, 3-aminopropil trietoxisilano, Poliuretano vêm ganhando destaque nos últimos anos, como fatores importantes para o tratamento da superfície do papel, trazendo propriedades únicas para os dispositivos, aumentando sensibilidade e estabilidade (MOREIRA *et al.* 2019, KUŹMIŃSKA *et al.*, 2020; NG & HASHIMOT, 2021).

Outro ponto a ser considerado para a utilização de modificadores da superfície é que o produto da reação da hidrólise da ureia pela urease é volátil (NH_3), o que constitui um desafio para manutenção da cor do dispositivo por um maior intervalo de tempo, uma vez que perdas de NH_3 podem ocorrer, resultando em alterações na coloração do sistema. Assim, a utilização de polímeros que possam interagir com NH_3 auxiliando na alteração da cor é uma vantagem já descrita na literatura para diferentes aplicações (ALHARTHY & SALEH, 2021; PREETHICHANDRA *et al.*, 2022).

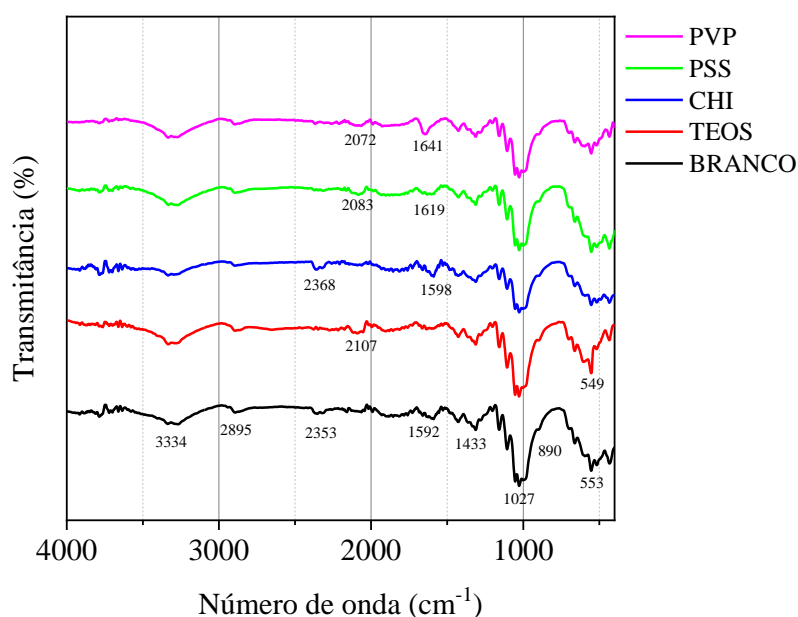
Em sistemas envolvendo urease, ureia e indicadores ácido-base, pode-se destacar a utilização de hexametildisilazano (HDMS), tetraetilortosilicato para modificação de papel de filtro Whatman grade 4 e determinação da urease empregando vermelho de fenol (MALEKGHASEMI *et al.*, 2016); acetato de celulose, roxo de bromocresol e urease para obtenção de um filme para detecção de ureia (ALHARTHI *et al.*, 2022); eletrodo de carbono impresso contendo ureia, urease e quitosana para determinação de Hg(II) (SAENCHOOPA *et al.*, 2021); roxo de bromocresol encapsulado em sílica e polimetacrilato para determinação de NH_3 gasoso (CICHERO & SANTOS 2021); PVA, urease e vermelho de fenol para determinação de ureia em saliva (SONI *et al.*, 2018) entre outros.

Nesse sentido, foi avaliada a influência de quatro modificadores de superfície (PSS, PVP, CHI e TEOS) em diferentes níveis de concentração, no desempenho analítico do método para determinação da urease. Inicialmente, foi feita a modificação e caracterização da superfície do papel CHR 3MM na presença e na ausência dos modificadores (Figura 60).

Caracterização por ATR-FT IR permite inferir sobre a presença de grupos funcionais específicos numa determinada estrutura química. Para o papel na ausência dos modificadores observou-se bandas características da celulose: uma banda em 3334 cm^{-1} correspondente à vibração e estiramento do grupo -OH em polissacarídeos e inclui também vibrações de ligações de hidrogênio inter- e intramoleculares na celulose. A banda em 2895 está associada ao estiramento -CH alifático (THAKUR *et al.*, 2020; HOSPODAROVA *et al.*, 2018). As bandas

em 1433, 1027 e 890 cm^{-1} correspondem às vibrações de estiramento de ligações $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}$, $-\text{OH}$ e $\text{C}-\text{O}$, associadas à quantidade de estrutura cristalina e amorfa da celulose (HOSPODAROVA *et al.*, 2018), sendo a banda em 1027 associada às ligações $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ do anel pirano e a banda em 890 cm^{-1} relatada como $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ β -glicosídicas (KURREY *et al.*, 2020; THAKUR *et al.*, 2020).

Figura 60 – Espectros de ATR- FTIR para o papel CHR 3MM não modificado (branco) e o papel na presença dos modificadores (PVP 10% (m/v), PSS 10% (v/v), CHI 4 mg mL^{-1} , TEOS 80% (v/v)).



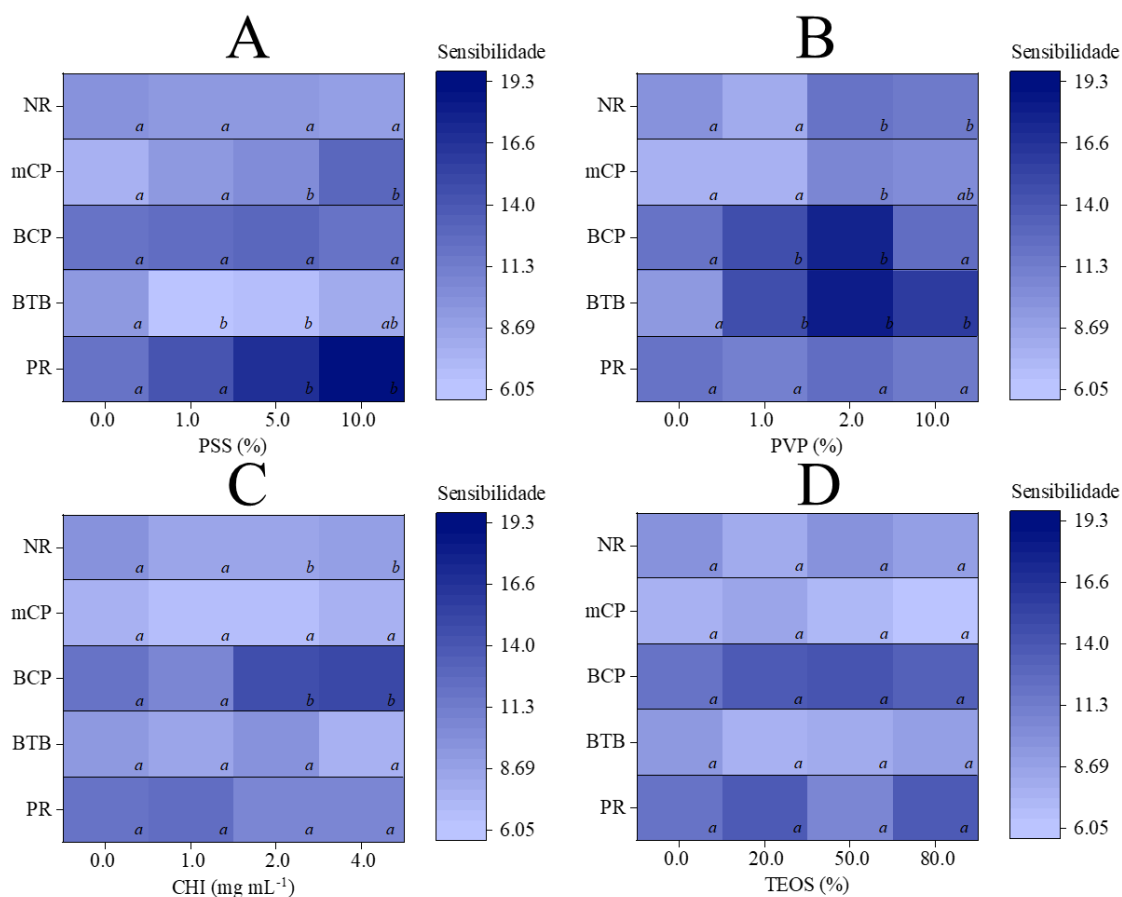
Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Comparando o sistema de referência sem modificação (apenas o papel - branco) com os sistemas na presença dos modificadores, observa-se deslocamento ou desaparecimento de algumas bandas. Por exemplo, a banda em 1592 cm^{-1} pode estar relacionada a vibração de estiramento de $\text{N}-\text{H}$, $\text{C}-\text{N}$, $\text{C}=\text{O}$, e foi deslocada para maiores comprimentos de onda nos sistemas com CHI (1598 cm^{-1}) e PVP (1619 cm^{-1}) e estão mais intensas e definidas, devido à maior abundância desses grupos. Além disso, foi extinta para o sistema com TEOS e bastante reduzida para o PSS (1598 cm^{-1}) (RAHMAN *et al.*, 2019, LIBRETEXTS, 2020; ANANDHA *et al.*, 2022). A banda em 1027 cm^{-1} diminuiu para todos os sistemas com modificadores em comparação com o branco. A banda em 553 cm^{-1} ficou mais bem resolvida para o TEOS e deslocada para 549 cm^{-1} devido à presença de $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ (GUERMAT *et al.*, 2010). Bandas características do PSS são reportadas entre 1003 e 1160 cm^{-1} (SARWAR *et al.*, 2021), entretanto, devido à maior proporção do papel em relação ao PSS, não foi possível diferenciar

essa região. Esses resultados indicam que as pequenas alterações nos espectros são em decorrência da presença desses modificadores na superfície do papel.

Após a modificação da superfície, seguiu-se com a avaliação da sensibilidade e intensidade de cor em função da concentração (Figura 61 A-D). De acordo com os resultados obtidos, foi selecionado o PSS para os indicadores PR e *mCP* na condição de 5% (v/v) e PVP para os demais indicadores na condição de 2% (m/v). Além da sensibilidade analítica, foi considerado a intensidade da cor e a simplicidade do preparo do papel modificado.

Figura 61 – Valores de sensibilidade para os diferentes modificadores (A): PSS 1, 5 e 10 % (v/v); (B): PVP (1, 2 e 10 % (m/v); (C): CHI 1, 2 e 4 mg mL⁻¹; (D): TEOS 20, 50 e 80% (v/v). Condições: urease 0 – 4 U mL⁻¹. ureia 80 mM, indicador = 2 mM.



Fonte: elaborado pela autora, 2022.

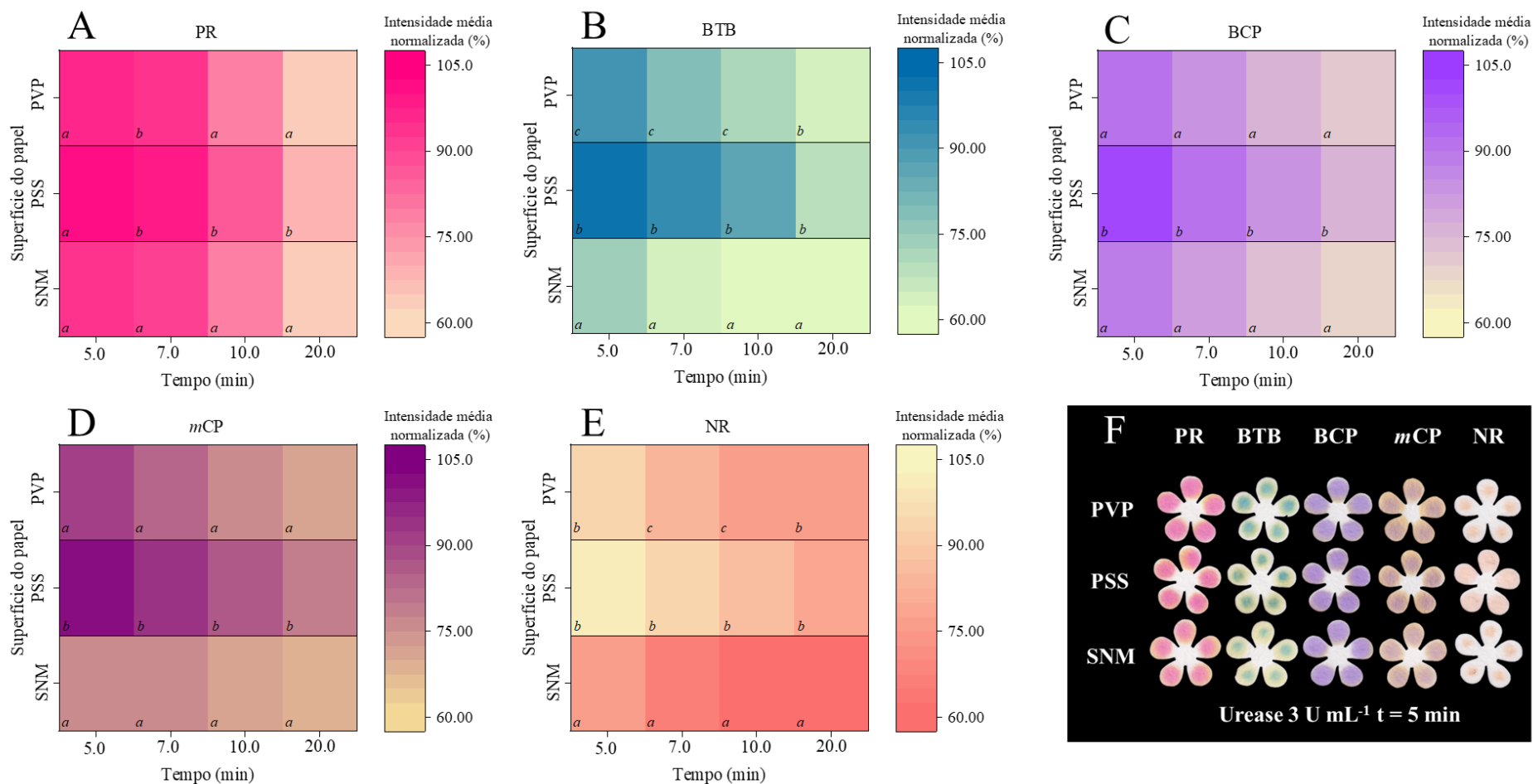
A avaliação estatística dos resultados foi realizada por ANOVA *One Way* e teste de Tukey ao nível de 95% de confiança. Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as condições para o mesmo indicador.

Além de aumento da sensibilidade, vale destacar que a maior intensidade de cor observada ao se utilizar o PSS está possivelmente associada à interação eletrostática entre os íons NH₄⁺ (produto da hidrólise da ureia) e o grupo -SO₃⁻ do PSS, uma vez que polieletrólitos conseguem formar membranas e géis com capacidade de troca e transporte iônico (NICOLAS

et. al., 2021; ZHANG & XU, 2014). Para o PVP, o melhor desempenho pode estar relacionado às interações por ligação de hidrogênio entre NH_4^+ e/ou indicador ácido-base (ZHU *et al.*, 2017; ANANDHA *et al.*, 2022).

Para compreender o comportamento dos melhores modificadores de superfície em relação ao sistema não modificado (SNM), foi feita a análise das imagens em diferentes intervalos de tempo empregando uma concentração fixa da enzima (Figura 62). Ocorreu uma diminuição da intensidade de cor à medida que o tempo aumenta, devido à exposição ao CO_2 e possível perda de NH_3 volátil do sistema (TAVARES *et al.*, 2021; CELIK *et al.*, 2021). Os modificadores PSS e PVP, possibilitaram maior intensidades de cor para os indicadores PR, BTB, BCP e *m*CP do que o sistema na ausência do modificador, corroborando com a premissa de que PSS e PVP interagem com NH_4^+ e/ou grupos funcionais presentes no indicador. Além disso, pode-se observar que para os sistemas contendo PSS e PVP houve uma permanência da cor do sistema por mais tempo, resultando em menor variação de intensidade de cor entre os tempos de 5 e 7 min. Para o indicador NR, quanto menor intensidade de cor maior a concentração da enzima (variação do vermelho para o amarelo). Para a análise do tempo, foi observado que a menor intensidade de cor foi para o sistema com PSS, seguido de PVP.

Figura 62 - Intensidade de cor normalizada em função do tempo para os indicadores (A) PR, (B) BTB, (C) BCP, (D) mCP (E) NR empregando o papel não modificado (SNM), com PSS 5% (v/v) ou PVP 2% (m/v), urease 3 U mL⁻¹, ureia 80 mM, indicador = 2 mM.

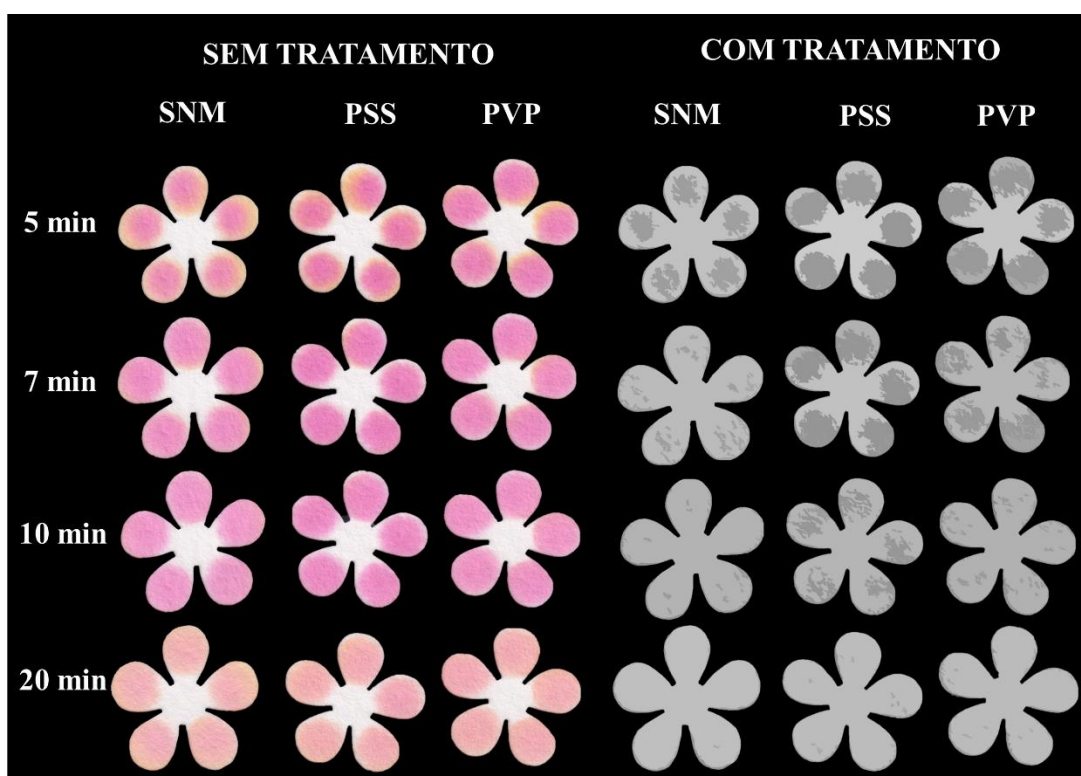


Fonte: elaborado pela autora, 2022.

A avaliação estatística dos resultados apresentados corresponde à comparação entre a superfície do papel na ausência e na presença do modificador e foi realizada por ANOVA One Way e teste de Tukey ao nível de 95% de confiança. Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as condições para o mesmo indicador. Estatística completa está apresentada na Tabela A5 Anexo I.

O efeito do tempo e do modificador de superfície foi observado de forma simultânea e visualmente ao realizar tratamento da imagem em escala de cinza conforme descrito por Woolf *et al.* (2021). Foi utilizado o sistema com o indicador PR para esse tratamento, sendo possível observar que a região com maior intensidade de cinza representa a maior concentração do analito, a qual é mais pronunciada para o sistema contendo PSS e vai diminuindo com o passar do tempo para todos os sistemas até atingirem praticamente a homogeneidade da zona de detecção (Figura 63).

Figura 63- Comparação da intensidade de cor para o sistema urease 3 U mL⁻¹ empregando papel na ausência e na presença do modificador (PSS 5% (v/v) ou PVP 2% (m/v) em diferentes intervalos de tempo, com e sem tratamento da imagem pelo programa Corel Photo-Paint. Condições: indicador PR 2mM, ureia 80 mM, tampão fosfato de sódio 0,5 mM pH = 6,5.



Fonte: elaborado pela autora, 2022.

3.4.2 Desempenho analítico do Multicolor PAD

Após otimização univariada dos parâmetros (Tabela 19) considerados cruciais para o desempenho do Multicolor PAD, foram determinadas as figuras de mérito para cada indicador. Foram feitas curvas com concentrações crescentes da urease, resultando maiores níveis de NH₃ produzida pela hidrólise da ureia e, conseqüentemente, uma variação na cor do indicador. Assim, a curva de intensidade de cor em função da concentração de urease (Figura 64) permitiu a obtenção dos parâmetros analíticos do método (Tabela 20).

Figura 64 – (A) Imagens obtidas para as curvas analíticas empregando o Multicolor PAD; (B e C) Curvas analíticas para os indicadores ácido-base (PR, BTB, BCP, *m*CP e NR); (D – E) Ajuste linear para todos os sistemas. Condições: Urease 0-6 U mL⁻¹; indicadores (2 mM) PR, BTB, *m*CP e NR preparados em tampão fosfato de sódio 0,5 mM pH = 6,5 ou tampão acetato de sódio 0,5 mM pH = 5,5 para BCP; ureia 80 mM.

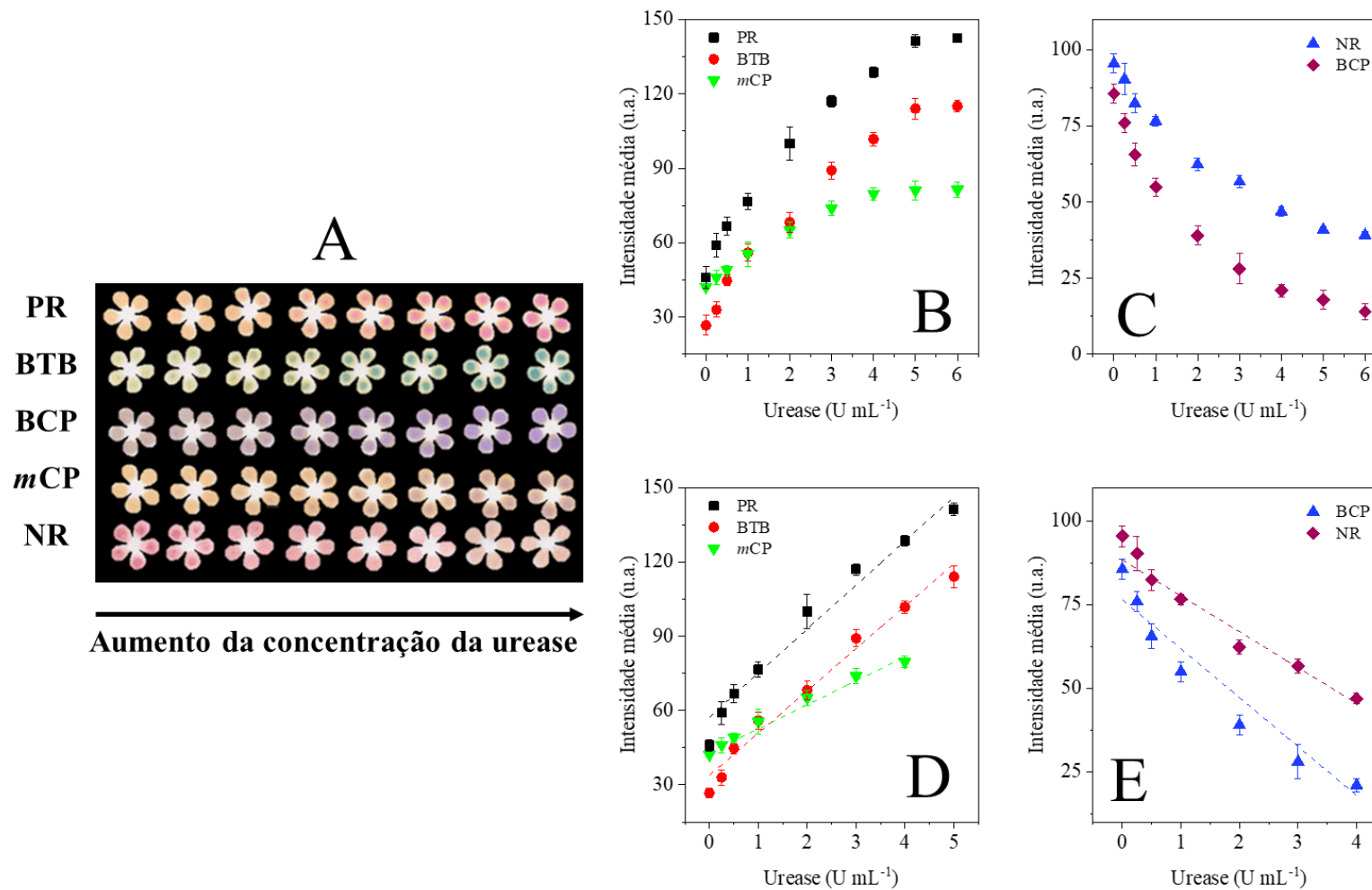


Tabela 19 – Resumo dos parâmetros utilizados para cada indicador no Multicolor PAD.

Parâmetro	Condição selecionada	Indicador ácido-base
Canal de cor	Sistema CMYK*	Todos
Papel	CHR 3 MM	
Volume (uL)	1,0	PR, BTB, BCP, <i>mCP</i>
	1,5	NR
pH inicial	6,5	PR, BTB, <i>mCP</i> , NR
	5,5	BCP
Tampão	Fosfato de sódio 0,5 mM	PR, BTB, <i>mCP</i> , NR
	Acetato de sódio 0,5 mM	BCP
Modificador	PSS (5% m/v)	PR, <i>mCP</i>
	PVP (2% m/v)	BTB, BCP, NR
Ureia (mM)	80	
Concentração do indicador (mM)	2	
Tempo (min)	5	Todos
Ordem de adição dos reagentes	Modificador, ureia, urease, indicador	

*Magenta, Ciano, Amarelo, CMYK, CMYK para PR, BTB, BCP, *mCP* e NR, respectivamente.

Fonte: elaborado pela autora, 2022.

Tabela 20 – Figuras de mérito obtidos para o Multicolor PAD.

Indicador	Ajuste linear	LOD (U mL ⁻¹)	Intervalo linear (U mL ⁻¹)	<i>r</i>	RSD (%)
PR	CI = 17,79 (±1,15)×C _{ure} + 45,85 (±2,36)	0,19	0,25 – 5,0	0,98774	2,01
BTB	CI = 17,08 (±0,94)×C _{ure} + 26,70 (±2,00)	0,20	0,25 – 5,0	0,99094	2,17
BCP	CI = 14,63(±1,60)×C _{ure} + 85,60 (±3,06)	0,19	0,25 – 4,0	0,97136	2,09
<i>mCP</i>	CI = 9,69 (±0,46)×C _{ure} + 42,96 (±0,73)	0,20	0,25 – 4,0	0,99437	2,28
NR	CI = 10,72 (±0,91)×C _{ure} + 88,38 (±2,29)	0,16	0,25 – 4,0	0,98239	1,28

Legenda: CI = intensidade de cor. C_{ure} = Concentração da urease

Fonte: elaborado pela autora, 2022.

O ajuste de regressão linear realizado entre intensidade de cor (CI, u.a.) vs concentração de urease (C_{ure}, U mL⁻¹) foi obtido no intervalo de concentração de 0,25 a 5,0 U mL⁻¹ para os indicadores PR e BTB; 0,25 a 4,0 U mL⁻¹ para BCP, *mCP* e NR. O limite de detecção (LOD) variou de 0,15 a 0,20 U mL⁻¹, e o RSD ≤ 2,28% para repetibilidade de 4,0 U mL⁻¹ de urease (*n* = 10), indicando a boa precisão do método.

Observa-se que as figuras de mérito apresentam a mesma magnitude, mas os indicadores PR, BTB tiveram as melhores sensibilidades. Os melhores valores de LOD e RSD foram para os indicadores PR e NR. Por outro lado, os indicadores PR e BTB apresentaram linearidade até 5 U mL⁻¹. Por fim, para os indicadores que apresentam aumento da intensidade de cor com o aumento da concentração da urease, os menores valores de branco foram na seguinte ordem

$mCP < BTB < PR$. Assim, considerando o conjunto de parâmetros, os indicadores PR, BTB apresentam melhor desempenho analítico para aplicação quantitativa, além da vantagem de melhor resolução de gradiente de cor para aplicações qualitativa.

Dentre os métodos reportados para determinação da atividade da urease, vale destacar o UrePAD, um dispositivo colorimétrico em papel que usa vermelho de fenol, com LOD ($0,10 \text{ U mL}^{-1}$) e intervalo linear comparáveis ao Multicolor PAD ($0,25 - 4 \text{ U mL}^{-1}$), mas tempo total de análise de até 20 min (superior ao Multicolor PAD) aplicado em amostras de solos e avaliação de inibidores enzimáticos *in vitro* (TAVARES *et al.*, 2021). O método desenvolvido por Malejghasemi *et al.* (2016) para determinação da urease empregando papel de filtro modificado com TEOS e indicador vermelho de fenol apresentou LOD de $0,5 \text{ U mL}^{-1}$ e intervalo linear superior ao Multicolor PAD ($1 - 20 \text{ U mL}^{-1}$), entretanto, o procedimento para preparo do papel é demorado e os autores apenas relataram uma possível aplicação para *H. pylori*.

Celik *et al.* (2021) utilizaram um pigmento natural de repolho roxo (*Brassica oleracea*) como um indicador de pH natural na detecção de *H. pylori* utilizando urease como marcador e detecção de 10 CFU mL^{-1} (unidades de formação de colônias, do inglês *colony-forming unit*, CFU) a partir de 15 min. Ferrer *et al.* (2020) apresentaram a detecção da urease usando indicador vermelho de com detecção colorimétrica de 3 mU de urease a partir de 30 min. Urbanowicz *et al.* (2021) modificaram eletrodo (carbono vítreo, ouro ou platina) com PEDOT:PSS e determinaram por potenciometria a atividade da urease no intervalo linear de $5 - 1000 \text{ U L}^{-1}$ em 10 min, entretanto o preparo do eletrodo é oneroso e a aplicação *Point-of-Care* é pouco viável. Ali *et al.* (2019) desenvolveram um DNAzyme colorimétrico com vermelho de fenol para determinação de *H. pylori* empregando urease como marcador e obtiveram LOD na ordem de 10^4 CFU mL^{-1} em amostras de fezes humana. Esse sistema é mais seletivo do que o Multicolor PAD, entretanto possui maior custo associado.

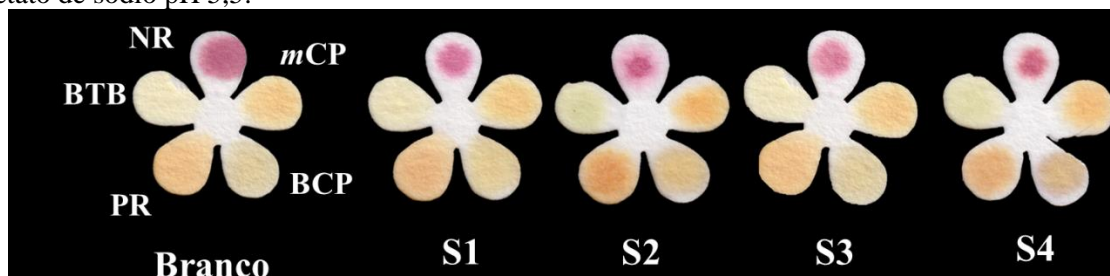
3.4.3 Aplicação do Multicolor PAD

3.4.3.1 Determinação da atividade e inibição das ureases do solo

O dispositivo foi aplicado na determinação da atividade de ureases de quatro amostras de solos (Figura 65) com diferentes características físico-químicas, e as relações matemáticas foram feitas de forma similar ao descrito para o UrePAD. Os resultados apresentados na Tabela 21 foram comparados estatisticamente por ANOVA *One-Way* e não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança ($pS1 = 0,92$; $pS2 = 0,41$; $pS3 = 0,33$; $pS4 = 0,29 >$

$\alpha = 0,05$). Portanto, todos os indicadores empregados no Multicolor PAD podem ser utilizados para a quantificação da atividade das ureases de solos.

Figura 65 – Imagens obtidas para o sistema na ausência de extrato de ureases de solos (branco) e na presença de ureases de solos (S1, S2, S3 e S4). Condições: Ureia 80 mM, indicador 2 mM, tampão acetato de sódio pH 5,5.



Fonte: elaborado pela autora, 2022.

Tabela 21 – Atividade das ureases do solo usando o Multicolor PAD em comparação com o método de referência (indofenol) ($n = 3$).

Solo	Atividade das ureases dos solos ($\mu\text{mol N-NH}_4 \text{ g}^{-1}$ de solo)					Indofenol
	PR	BTB	BCP	mCP	NR	
S1	$5,1 \pm 1,6$	$5,0 \pm 1,9$	$4,6 \pm 0,5$	$5,6 \pm 0,8$	$5,1 \pm 1,3$	$4,7 \pm 0,6$
S2	$7,6 \pm 1,9$	$8,9 \pm 1,5$	$7,1 \pm 0,9$	$8,1 \pm 0,8$	$8,4 \pm 1,2$	$8,9 \pm 0,8$
S3	$4,5 \pm 1,7$	$4,7 \pm 1,0$	$4,0 \pm 1,2$	$4,2 \pm 1,0$	$4,7 \pm 1,5$	$4,7 \pm 0,2$
S4	$6,9 \pm 1,8$	$8,3 \pm 0,3$	$6,7 \pm 1,3$	$7,7 \pm 1,1$	$7,7 \pm 0,9$	$8,6 \pm 0,7$

Fonte: elaborado pela autora, 2022.

Foi feito um ensaio de inibição da atividade das ureases do solo (Tabela 22) empregando NBPT 1 mM (concentração final no extrato de solo), procedido de forma análoga ao apresentado para o UrePAD e comparados com o método de referência.

Tabela 22 – Inibição das ureases do solo obtidos com Multicolor PAD e pelo método do indofenol para NBPT 1 mM (concentração final no solo).

Solo	Inibição da atividade das ureases dos solos (%)					Indofenol
	PR	BTB	BCP	mCP	NR	
S1	$33,5 \pm 4,1$	$31,9 \pm 8,9$	$33,4 \pm 4,3$	$31,0 \pm 7,4$	$31,7 \pm 4,6$	$35,9 \pm 4,8$
S2	$34,9 \pm 6,4$	$37,8 \pm 9,0$	$35,8 \pm 7,5$	$33,8 \pm 7,6$	$39,4 \pm 6,2$	$38,4 \pm 2,5$
S3	$35,1 \pm 7,6$	$31,8 \pm 5,5$	$36,5 \pm 8,4$	$33,2 \pm 8,5$	$36,4 \pm 5,0$	$35,2 \pm 1,3$
S4	$28,9 \pm 5,9$	$29,5 \pm 4,9$	$27,9 \pm 6,7$	$24,1 \pm 6,4$	$25,3 \pm 5,0$	$27,3 \pm 5,0$

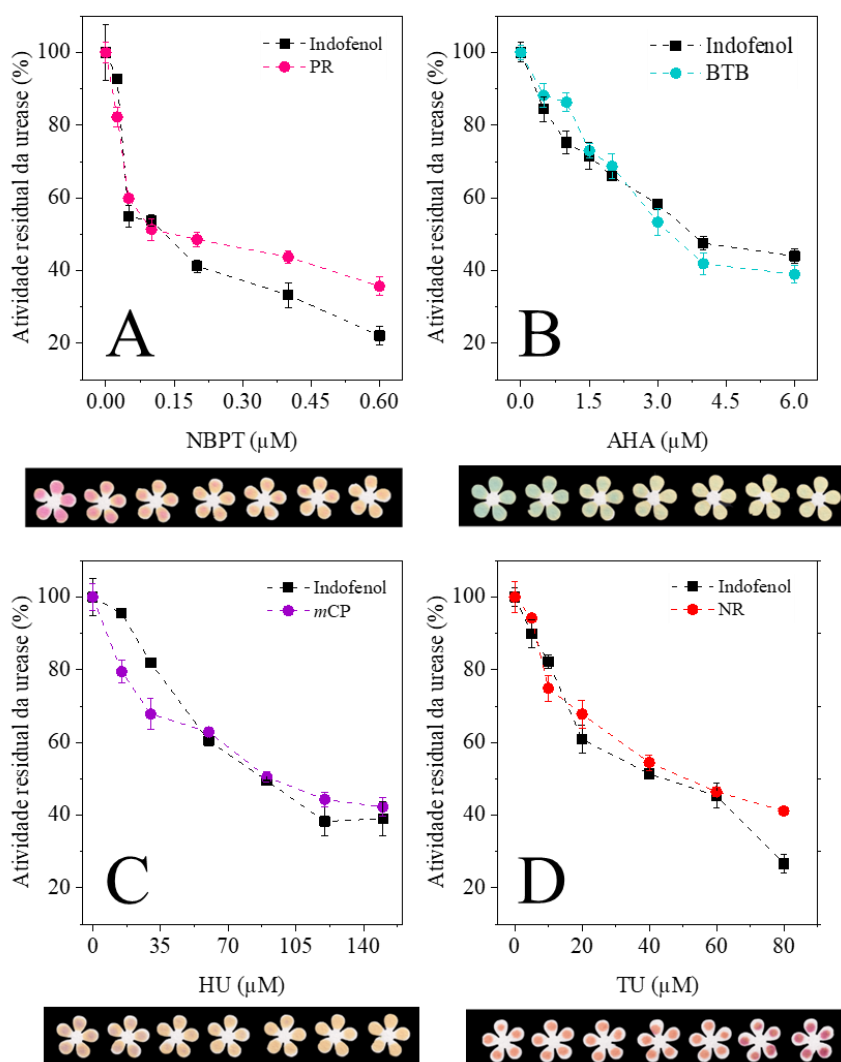
Fonte: elaborado pela autora, 2022.

Com base no teste ANOVA *One-Way*, os resultados apresentados na Tabela 22 não diferem estatisticamente ao nível de 95% de confiança ($pS1 = 0,93$; $pS2 = 0,90$; $pS3 = 0,94$; $pS4 = 0,84 > \alpha = 0,05$), indicando que é possível quantificar a inibição de ureases de solo empregando o Multicolor PAD.

3.4.3.2 Atividade da urease *in vitro* frente inibidores clássicos

Foi avaliada a atividade da Jack bean urease (*Canavalia ensiformis* Tipo III em glicerol 500 - 800 U mL⁻¹) frente a quatro inibidores clássicos e calculado o IC₅₀ (Figura 66) empregando os cinco indicadores ácido base comparando com o método de referência.

Figura 66 - Determinação do IC₅₀ por intersecção dos eixos em 50% da atividade enzimática em função da concentração do inibidor: (A) NBPT; (B) ácido acetohidroxâmico (AHA), (C) hidroxiiureia (HU) e (D) tioureia (TU). A imagem abaixo do gráfico é do multicolor PAD utilizado para o referido inibidor em concentrações crescentes.



Legenda: Os cálculos do IC₅₀ foram feitos utilizando replicatas verdadeiras, considerando uma referência (ausência do inibidor = 100% da atividade da enzima), um controle negativo (ausência da urease) e concentrações crescentes do inibidor (incubado por 15 min com enzima). Condições: ureia 80 mM, urease 4 U mL⁻¹, indicador 2 mM.
Fonte: elaborado pela autora, 2022.

É possível observar nas imagens do multicolor PAD na Figura 66, que o aumento da concentração do inibidor resulta em diminuição da coloração do sistema, devido à menor atividade da urease. Os resultados de IC₅₀ obtidos estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23 – Valores de IC₅₀ obtidos pelo Multicolor PAD para os quatro inibidores clássicos de urease em comparação com o método de referência (indofenol).

Inibidor	IC ₅₀ (µM)					
	PR	BTB	BCP	mCP	NR	Indofenol
NBPT	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01
AHA	3,3 ± 0,2	3,4 ± 0,5	3,5 ± 0,4	3,4 ± 0,4	3,5 ± 0,1	3,6 ± 0,2
HU	92 ± 2	94 ± 3	92 ± 4	92 ± 2	93 ± 1	93 ± 2
TU	42 ± 4	40 ± 5	45 ± 3	43 ± 3	44 ± 3	44 ± 3

Fonte: elaborado pela autora, 2022.

Os valores de IC₅₀ para cada inibidor foram comparados estatisticamente (ANOVA *One-Way*) e não diferem ao nível de 95% de confiança ($p_{NBPT} = 0,87$; $p_{AHA} = 0,89$; $p_{HU} = 0,97$; $p_{TU} = 0,53 > \alpha = 0,05$). Para Jack bean urease (*Canavalia ensiformis*), Dominguez *et al.* (2008) descreveram IC₅₀ de 0,10 µM para o NBPT. Šudomová *et al.* (2019) encontraram 3,9 µM de IC₅₀ para ácido acetohidroxâmico (AHA), enquanto para hidroxiiureia (HU) foram relatados 81,1 e 100 µM por Tavares *et al.* (2021) e Asadi *et al.* (2018), respectivamente. Por fim, os trabalhos de Gour *et al.* (2021); Zulfiqar & Ahmed (2022), obtiveram IC₅₀ tioureia (TU) de 30 e 146 µM, respectivamente. Nesse sentido, pode-se inferir que o multicolor PAD pode ser empregado para a determinação da atividade residual da urease frente a diferentes inibidores, reduzindo a quantidade de reagentes, o tempo e o custo da análise.

3.4.3.3 Ensaio de recuperação empregando saliva sintética e saliva humana

Para avaliar a exatidão do método proposto, foi realizado ensaio de recuperação da urease em amostras de saliva sintética e humana. Inicialmente foi avaliado o efeito de matriz comparando na curva analítica, na ausência e na presença da saliva sintética (Tabela A6 – Anexo I), obtendo-se sensibilidades com variações menores do que 20%. Assim, seguiu-se com os experimentos empregando tampão fosfato para as diluições e as relações matemáticas foram feitas com base no ajuste de regressão linear para cada curva analítica correspondente ao dia de trabalho e ao indicador utilizado.

O ensaio de recuperação consistiu na adição de uma quantidade conhecida de urease (entre 1 - 8 U mL⁻¹), seguida de diluições, e aplicando uma alíquota no Multicolor PAD conforme as otimizações descritas. O indicador BCP não foi utilizado para essa aplicação, pois o pH inicial otimizado é 5,5, enquanto o pH médio da saliva é 6,75 e, portanto, apenas os indicadores PR, BTB, mCP e NR foram empregados, pois o pH inicial 6,5 é próximo ao da saliva. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 24. Os cálculos das recuperações analíticas foram feitos com base em MARCELLETTI *et al.* (2015).

A determinação das unidades de urease presentes na amostra de saliva humana foram realizadas por análise simultânea do branco (saliva sem adição de ureia) em comparação com o sistema contendo ureia e relação com o ajuste linear da curva correspondente. Para os ensaios de recuperação tanto em saliva sintética quanto em saliva humana, foi aplicado o critério de aceitação como recuperações entre 80 - 120% (MARCELLETTI *et al.*, 2015). Assim, com base nos valores apresentados nas Tabelas 24 e 25, pode-se inferir que as recuperações foram quantitativas (variação de 85 – 103%) e não houve efeito de matriz, sendo então, possível aplicar o dispositivo para determinar urease em saliva humana.

Os valores de unidades de urease obtidos para a amostra de saliva humana foram comparados estatisticamente (ANOVA *One-Way*) ao nível de 95% de confiança e não apresentaram diferença significativa ($p = 0,07 > \alpha = 0,05$). Os valores obtidos ($0,5 \text{ U mL}^{-1}$) estão dentro do intervalo relatado (entre 0 e $3,03 \text{ U}$ da enzima) por Bermudez *et al.* (2011), que realizaram estudos envolvendo atividade da urease na saliva de crianças, concluindo que urease de saliva pode ser considerada um indicativo de infecção bacteriana. Além disso, Shu *et al.* (2007) que apresentaram valores de unidades de urease entre $0,03 - 2,75 \text{ U}$ para indivíduos com cárie ativa e entre $0,05 - 1,13 \text{ U}$ para indivíduos livre de cáries.

Tabela 24 – Recuperações para determinação da urease empregando Multicolor PAD em amostra de saliva sintética diluída duas vezes para os valores 1 e 2 U mL⁻¹ e quatro vezes para 4, 6 e 8 U mL⁻¹. Condições: ureia 80 mM, indicador 2 mM, tampão fosfato de sódio 0,5 mM pH = 6,5.

Saliva sintética								
	PR		BTB		mCP		NR	
Adicionada (U mL ⁻¹)	Encontrada (U mL ⁻¹)	Recuperação (%)	Encontrada (U mL ⁻¹)	Recuperação (%)	Encontrada (U mL ⁻¹)	Recuperação (%)	Encontrada (U mL ⁻¹)	Recuperação (%)
1	0,88 ± 0,06	88,0 ± 6,5	0,89 ± 0,04	88,8 ± 3,6	0,91 ± 0,12	91,3 ± 12,3	0,94 ± 0,14	93,9 ± 14,4
2	1,95 ± 0,29	97,7 ± 14,7	1,87 ± 0,11	93,7 ± 5,4	1,96 ± 0,2	98,0 ± 9,8	1,97 ± 0,13	98,6 ± 6,2
4	3,98 ± 0,32	99,6 ± 8,1	3,81 ± 0,23	95,2 ± 5,8	3,6 ± 0,33	90,1 ± 8,2	4,02 ± 0,21	101 ± 5
6	5,70 ± 0,65	95,0 ± 10,9	5,47 ± 0,10	91,2 ± 1,7	5,14 ± 0,17	85,6 ± 2,9	6,28 ± 0,26	104 ± 4
8	8,24 ± 0,39	103 ± 5	7,06 ± 0,36	88,2 ± 4,6	6,93 ± 0,25	86,6 ± 3,1	7,82 ± 0,34	97,7 ± 4,3

Fonte: elaborado pela autora, 2022.

Tabela 25 – Recuperações para determinação da urease empregando Multicolor PAD em amostra de saliva humana diluída duas vezes. Condições: ureia 80 mM, indicador 2 mM, tampão fosfato de sódio 0,5 mM pH = 6,5. Os valores obtidos para as adições 1 e 4 U mL⁻¹ correspondem aos valores após subtração do sistema sem adição de urease.

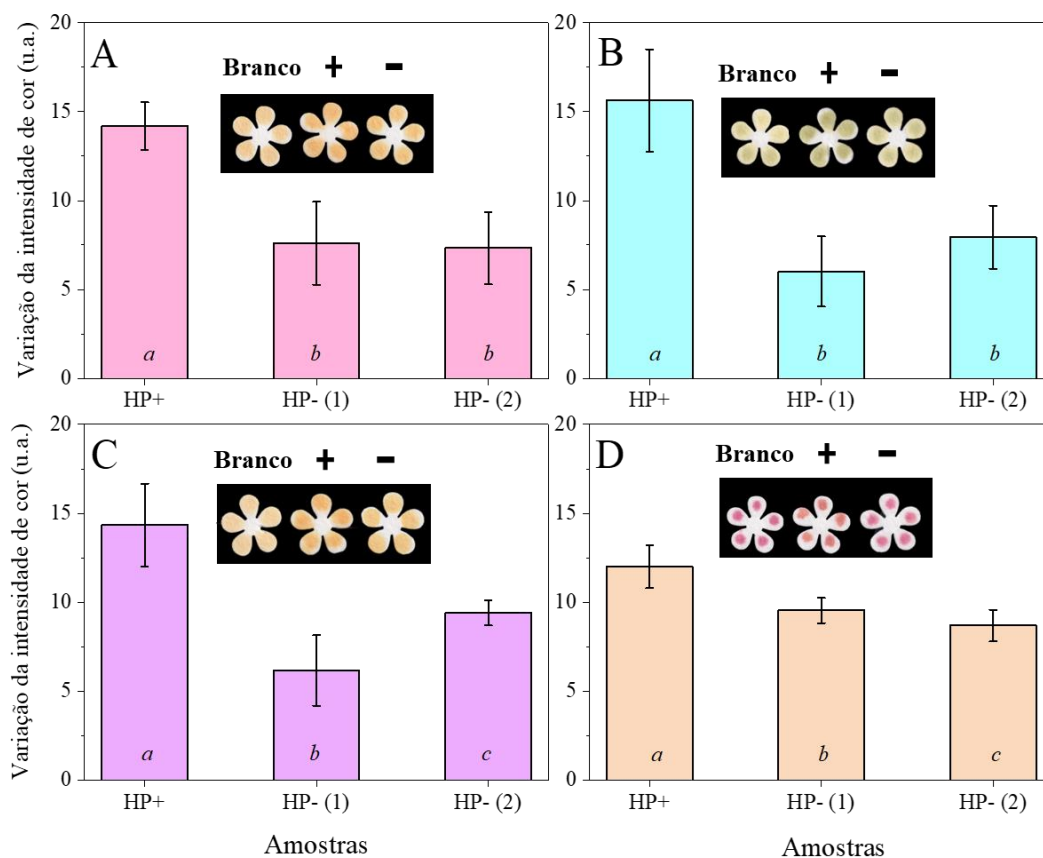
Saliva humana								
	PR		BTB		mCP		NR	
Adicionada (U mL ⁻¹)	Encontrada (U mL ⁻¹)	Recuperação (%)	Encontrada (U mL ⁻¹)	Recuperação (%)	Encontrada (U mL ⁻¹)	Recuperação (%)	Encontrada (U mL ⁻¹)	Recuperação (%)
0	0,58 ± 0,20	-	0,51 ± 0,16	-	0,57 ± 0,11	-	0,54 ± 0,21	-
1	1,07 ± 0,10	107 ± 10	1,10 ± 0,10	100 ± 8	1,01 ± 0,17	101 ± 17	1,03 ± 0,11	103 ± 11
4	4,14 ± 0,21	104 ± 5	4,24 ± 0,45	106 ± 11	3,91 ± 0,42	97 ± 10	4,09 ± 0,29	102 ± 7

Fonte: elaborado pela autora, 2022.

3.4.3.4 Urease de bactérias ureolíticas presentes na saliva

Teste rápido de urease pode ser utilizado para auxiliar no diagnóstico por infecção por *H. pylori*, empregando fragmento de estômago humano obtido a partir da endoscopia, e para avaliar a atividade da urease de espécies bacterianas orais (DAHLÉN *et al.*, 2018). Nesse sentido, foram testadas três amostras de saliva coletadas no dia em que os indivíduos realizaram endoscopia digestiva com retirada de fragmento de tecido do estômago e do duodeno para teste histopatológico de *H. pylori*, sendo uma HP+ (resultado positivo) e duas HP- (resultado negativo). Os testes considerados como referência foram o histopatológico para duas amostras e o teste rápido de urease para uma amostra, ambos realizados por clínica especializada. Todas as amostras foram coletadas em frascos esterilizados, com no mínimo 8 h de jejum, sem higienização da boca e armazenados até a utilização (-20°C). Os resultados qualitativos (intensidade de cor) estão apresentados na Figura 67.

Figura 67 – Variação de intensidade de cor para o Multicolor PAD (A) PR, (B) BTB, (C) mCP e (D) NR para as amostras de saliva de pacientes *H. pylori* positivo (HP+) e *H. pylori* negativo (HP-). Condições: ureia 80 mM, indicador 2 mM, diluição em tampão fosfato de sódio 0,5 mM pH 6,5.



Fonte: elaborado pela autora, 2022.

Letras iguais indicam que não há diferença significativa para o mesmo parâmetro ao nível de 95% de confiança.

A variação da intensidade de cor para o sistema HP+ é maior do que para os sistemas HP- para qualquer um dos indicadores e diferem estatisticamente empregando ANOVA *One-Way* ao nível de 95% de confiança (Tabela 7A – AnexoI). A diferença é menos acentuada para o vermelho neutro (Figura 67D) associado ao menor desvio padrão. Os resultados estão de acordo com o método de referência empregado para o diagnóstico de *H. pylori* (teste histopatológico e teste rápido de urease). Dahlén *et al.* (2018) destacaram que a presença de *H. pylori* em amostras de saliva leva a uma mudança forte na coloração do indicador vermelho de fenol (do amarelo para o magenta). Hibaoui *et al.* (2022) realizaram estudos de comparação entre testes para o diagnóstico de infecção por *H. pylori*, entre eles PCR, histopatológico e teste rápido de urease (RUT) com indicador vermelho de fenol, indicando que o RUT é um método de fácil interpretação com diagnóstico preciso para detectar infecção por *H. pylori* em amostras de biópsia gástrica. Yu *et al.* (2015) empregaram *H. pylori* Saliva Test Cassette (HPS) para testar a infecção por *H. pylori* e obtiveram 51% de resultados positivos, indicando que realmente é possível empregar amostras de saliva para indicar a infecção bacteriana.

Multicolor PAD pode ser utilizado como método alternativo, simples, rápido e de baixo custo para determinação de urease bacteriana em saliva, como indicativo de infecção por bactérias ureolíticas como *H. pylori*, entretanto, faz-se necessário avaliar um maior número amostral, e cultivar as bactérias de cada amostra de saliva para indicar a abundância das espécies de bactérias ureolíticas nos resultados positivos.

3.4.4 Conclusões

Foi desenvolvido um dispositivo analítico em papel CHR 3MM com detecção colorimétrica de urease, empregando diferentes indicadores ácido-base, cuja variação de cor é proporcional ao aumento da concentração da urease. O Multicolor PAD pode determinar satisfatoriamente urease padrão e de diferentes matrizes no intervalo de 0,25 - 5 U mL⁻¹ para os indicadores vermelho de fenol e azul de bromotimol e 0,25 - 4 U mL⁻¹ para os indicadores roxo de bromocresol, roxo de *m*-cresol e vermelho neutro. O método colorimétrico Multicolor PAD mostrou-se potencial para aplicação para atividade e inibição de ureases de amostras de solos, inibição *in vitro* frente a potenciais inibidores e urease de bactérias ureolíticas da saliva humana. Os resultados foram comparados ao método espectrofotométrico do indofenol (referência) e ao teste histopatológico ou teste rápido de urease para as amostras de indivíduos infectados por *H. pylori*, e os resultados não diferiram significativamente. Assim, Multicolor PAD apresenta-se como um dispositivo simples e de baixo custo para aplicações laboratoriais, clínicas e agrícolas relacionadas à medição da atividade ou presença de urease.

CONCLUSÃO GERAL E REFERÊNCIAS

CONCLUSÃO GERAL E REFERÊNCIAS

4.1 CONCLUSÃO GERAL

O presente trabalho possibilitou avaliar o mecanismo de inibição da urease por um isotiocianato natural e benzoiltioureias sintéticas, além de apresentar o desenvolvimento de método para determinação da urease *in vitro* e *ex vivo*. Em relação aos estudos de interação, as técnicas empregadas mostraram-se eficientes e possibilitaram a obtenção de parâmetros como constante de ligação, estequiometria, forças envolvidas, sítios preferenciais de ligação, formação de adutos, distâncias moleculares, energia de ligação e alterações conformacionais da estrutura da enzima em decorrência da formação dos complexos. Além disso, os compostos foram ativos em solos com potencial de equivalente ao NBPT. Ambos compostos apresentam vantagens do ponto de vista ambiental, pois o isotiocianato é um composto natural e as BTUs são obtidas por via sintética simples, de baixo custo e economia de reagentes.

O desenvolvimento do UrePAD e do Multicolor PAD demonstrou bom desempenho analítico para determinação da atividade e inibição das ureases do solo, avaliação de potenciais inibidores de diferentes classes, e determinação de urease em amostras de saliva sintética e humana, aliando baixo custo, simplicidade e portabilidade em alternativa ao método convencional que exige etapas laboriosas e maior uso de reagentes. Nesse sentido, os estudos aqui apresentados podem ser utilizados para a projeção de novas moléculas e para o aprimoramento de métodos para determinação da urease em diferentes matrizes.

Perspectivas

- i) Caracterizar o papel CHR 3MM com e sem modificações por Microscopia de Varredura Eletrônica e Microscopia de Força Atômica;
- ii) Aumentar o número de amostras de saliva humana para aplicação do Multicolor PAD;
- iii) Cultivar as bactérias presentes na saliva humana para ter uma associação entre os resultados; do Multicolor PAD com a espécie bacteriana mais comum nas amostras analisadas;
- iv) Empregar o Multicolor PAD em amostras de fragmentos de estômago humano;
- v) Publicar os artigos;
- vi) Inserir os inibidores e dispositivos no mercado.

4.1 REFERÊNCIAS

- [1]. A. Begum, M. I. Choudhary, C. Betzel, The First Jack Bean Urease (*Canavalia Ensiformis*) Complex Obtained at 1.52 Resolution. Protein Data Bank, 2012. DOI: 10.2210/pdb4H9M/pdb
- [2]. A. KUMAR, B. LIANG, M. AARTHY, S.K. SINGH, N. GARG, I.U. MYSOREKAR, R. GIRI, Hydroxychloroquine Inhibits Zika Virus NS2B-NS3 Protease. *ACS Omega*, 3 (2018) 18132–18141. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01002>
- [3]. AAMIR, M. et al. In silico prediction, characterization, molecular docking, and dynamic studies on fungal SDRs as novel targets for searching potential fungicides against *Fusarium wilt* in tomato. *Frontiers in pharmacology*, v. 9, p. 1038, 2018.
- [4]. ABBASI, M. A. et al. Synthesis, in vitro and in silico studies of novel potent urease inhibitors: N-[4-({5-[(3-Un/substituted-anilino-3-oxopropyl)sulfanyl]-1,3,4-oxadiazol-2-yl)methyl}-1,3-thiazol-2-yl]benzamides. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 26, 3791–3804, 2018.
- [5]. ADFERT. Disponível em <<<http://www.adfert.com.br/produtos/uremax-nbpt/>>> Acesso em 24 de janeiro de 2021.
- [6]. AFKHAMI, A. & NOROOZ-ASL, R. Micelle-Mediated Extraction and Spectrophotometric Determination of Ammonia in Water Samples utilizing Indophenol Dye Formation. *R. J. Braz. Chem. Soc.*, 19, 1546-1552, 2008.
- [7]. AGRAWAL, P. et al. Benchmarking of different molecular docking methods for protein-peptide docking. *BMC bioinformatics*, v. 19, n. 13, p. 426, 2019.
- [8]. ALANAZI, A. M.; ABDELHAMEED, A. S. A spectroscopic approach to investigate the molecular interactions between the newly approved irreversible ErbB blocker "Afatinib" and bovine serum albumin. *PloS one*, v. 11, n. 1, 2016.
- [9]. ALANAZI, M. M. et al. Mechanistic interaction study of 5, 6-Dichloro-2-[2-(pyridin-2-yl) ethyl] isoindoline-1, 3-dione with bovine serum albumin by spectroscopic and molecular docking approaches. *Saudi Pharmaceutical J.*, v. 27, n. 3, p. 341-347, 2019.
- [10]. ALHARTHI, S. EL-NAGGAR, M. E. ABU-SAIED, M. A. KHATTAB, T. A. SALEH, D. I. Preparation of biosensor based on triarylmethane loaded cellulose acetate xerogel for the detection of urea. *Materials Chemistry and Physics* 276 (2022) 125377. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2021.125377>.
- [11]. ALHARTHY, R. D., SALEH, A. A Novel Trace-Level Ammonia Gas Sensing Based on Flexible PAni-CoFe₂O₄ Nanocomposite Film at Room Temperature. *Polymers* 2021, 13(18), 3077; <https://doi.org/10.3390/polym13183077>
- [12]. ALI, M. M., WOLFE, M., TRAM, K., GU, J. FILIPE, C. D. M., LI, Y., BRENNAN, J. D. ADNAzyme-Based Colorimetric Paper Sensor for *Helicobacter pylori*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2019, 58, 9907 –9911.
- [13]. ALJOUNDI, A. A.; BJIJ, I.; RASHEDY, A. EL.; SOLIMAN, M. E. S. Covalent Versus Non-covalent Enzyme Inhibition: Which Route Should We Take? A

- Justification of the Good and Bad from Molecular Modelling Perspective. *The Protein Journal*, 39, 97-105, 2020.
- [14]. ALMEIDA, D. K. C De et al. , New semisynthetic derivatives of a benzylisothiocyanate isolated from *Moringa oleifera* and evaluation of their cytotoxic activity. *Quim. Nova*, v. 40, n. 10, p. 1186-1190, 2017.
- [15]. AMTUL, Z.; ur-RAHMAN, A.; SIDDIQUI, R. A.; CHOUDHARY, M. I. Chemistry and Mechanism of Urease Inhibition. *Current Medicinal Chemistry*, v. 9, 1323-1348, 2002.
- [16]. ANANDHA, J. M., VANITHA, D., SUNDARAMAHALINGAM, K., NALLAMUTHU, N. Cornstarch/polyvinylpyrrolidone based proton conducting biocompatible polymer blend electrolyte for long life battery. *Ionics (2022)* 28:1809–1822.
- [17]. ANDA - Associação Nacional para Difusão de Adubos. Disponível em <<http://anda.org.br>> Acesso em janeiro de 2021.
- [18]. ARAUJO D. P. et al., Efficient sodium bisulfite-catalyzed synthesis of benzothiazoles and their potential as ureases inhibitors, *RSC Adv.* v. 5 28814–28821, 2015.
- [19]. ARAUJO, D. P.; MORAIS, V. S. S.; DE FÁTIMA, Â.; MODOLO, L. V. Efficient sodium bisulfite-catalyzed synthesis of benzothiazoles and their potential as ureases inhibitors. *RSC Adv.*, v. 5, 28814–28821, 2015.
- [20]. ASADI, M. et al. Synthesis and Urease Inhibitory Activity of Some 5-Aminomethylene Barbituric/Thiobarbituric Acid Derivatives, *Lett Drug Des Discov*, v. 15, 428-436, 2018.
- [21]. AZEEM, B. KUSHAARI, K.; MAN, Z. B.; BASIT, A. THANH, T. H. Review on materials & methods to produce controlled release coated urea fertilizer. *J.C. R.*, v. 181, 11-21, 2014.
- [22]. BALASUBRAMANIAN, A. et al. Structural and functional studies on urease from pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 58, 301–309, 2013.
- [23]. BALASUBRAMANIAN, A.; PONNURAJ, K. Crystal Structure of the First Plant Urease from Jack Bean: 83 Years of Journey from Its First Crystal to Molecular Structure. *J. Mol. Biol.*, v. 400, n. 3, 274–283, 2010.
- [24]. BALIGA, S. MUGLIKAR, S. KALE, R. Salivary pH: A diagnostic biomarker. *J Indian Soc Periodontol.* 2013, 17(4): 461–465.
- [25]. BAO-LI WANG, DONG-QI PAN, KAI-LI ZHOU, YAN-YUE LOU, JIE-HUA SHI. Multi-spectroscopic approaches and molecular simulation research of the intermolecular interaction between the angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACE inhibitor) benazepril and bovine serum albumin (BSA), 212 (2019) 15-24. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.12.040>
- [26]. BAO-LI WANG, SONG-BO KOU, ZHEN-YI LIN, JIE-HUA SHI, Investigation on the binding behavior between BSA and Lenvatinib with the help of various spectroscopic and in silico methods, *J. Molecular Structure* 1204 (2020) 127521. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127521>

- [27]. BARBERENA, I.M.; ESPINDULA, M.C.; ARAÚJO, L.F.B. de; MARCOLAN, A.L. Use of urease inhibitors to reduce ammonia volatilization in Amazonian soils. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.54, e00253, 2019.
- [28]. BENINI, S. et al. A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels. *Structure*, v. 7, 2005-2016, 1999.
- [29]. BENINI, S.; CIANCI, M.; MAZZEI, L.; CIURLI, S. Fluoride inhibition of *Sporosarcina pasteurii* urease: structure and thermodynamics. *J. Biol. Inorg. Chem.* v. 19, 1243-1261, 2014.
- [30]. BERMUDEZ, E. M. BONETA, E. A., BILLINGS, R. J., BURNE, R. A., GARCIA-RIVAS, V., NAZARIO, V. B., PEREZA, E. S. Urease activity in dental plaque and saliva of children during a three-year study period and its relationship with other caries risk factors. *Archives of oral biology*, 56 (2011) 1282 – 1289.
- [31]. BHAGAT, N.; VIRD, J. S.; Molecular and biochemical characterization of urease and survival of *Yersinia enterocolitica* biovar 1A in acidic pH in vitro. *BMC Microbiology*, v. 9, 2009.
- [32]. BHOWMICK, R., JAGANNADHAM, M. V., Multiple Intermediate conformations of Jack bean urease at low pH: anion-induced refolding. *The Protein Journal*, Vol. 25, No. 6, September 2006.
- [33]. BIGLAR, M. et al. Preliminary Investigation of the Jack-Bean Urease Inhibition by Randomly Selected Traditionally Used Herbal Medicine. *IJPR*, v. 11, 831-837, 2012.
- [34]. BOBONE, S.; van de WEERT, M.; STELLA, L. A reassessment of synchronous fluorescence in the separation of Trp and Tyr contribution in protein emission and in the determination of conformational changes. *J. Molecular Structure*, v. 1077, 68-76, 2014.
- [35]. BOER, J. L.; MULROONEY, S. B.; HAUSINGER, R. P. Nickel-dependent metalloenzymes. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 544, 142-152, 2014.
- [36]. BORTOLOTTI, A. et al. On the purported “backbone fluorescence” in protein three-dimensional fluorescence spectra. *RSC Advances*, v. 6, n. 114, 112870–112876, 2016.
- [37]. BRAGA, T. C. et al. Ionic liquid-assisted synthesis of dihydropyrimidin(thi)one Biginelli adducts and investigation of their mechanism of urease inhibition. *New J. Chem.*, v. 43, 15187-15200, 2019.
- [38]. BRILHANTE, R. S. N. et al. Research advances on the multiple uses of *Moringa oleifera*: A sustainable alternative for socially neglected population. *Asian Pac J Trop Biomed*, v. 10, n. 7, p. 621–630, 2017.
- [39]. BRITO, T. O. et al. Benzoylthioureas: Design, Synthesis and Antimycobacterial Evaluation. *Medicinal Chemistry*, v. 16, 93-103, 2020.
- [40]. BRITO, T. O. et al. Design, syntheses and evaluation of benzoylthioureas as urease inhibitors of agricultural interest. *RSC Advances*, v. 5, n. 55, p. 44507–44515, 2015.

- [41]. BURKITT, M. D. et al. Helicobacter pylori-induced gastric pathology: Insights from in vivo and ex vivo models. *DMM*, v. 10, n. 2, p. 89–104, 2017.
- [42]. BUSA, L. S. A. MOHAMMADI, S. MAEKI, M. ISHIDA, A. TANI, H. TOKESHI, M. Advances in Microfluidic Paper-Based Analytical Devices for Food and Water Analysis, *Micromachines* 2016, 7, 86; doi:10.3390/mi7050086.
- [43]. BYRNE, M. P. et al. Urease and Nitrification Inhibitors—As Mitigation Tools for Greenhouse Gas Emissions in Sustainable Dairy Systems: A Review. *Sustainability*, v. 12, 1-35, 2020.
- [44]. BZURA, J. et al. A mechanized urease activity assay. *Enzyme Microb. Technol.* 123, 1–7, 2019.
- [45]. CANTARELLA, H.; OTTO, R.; SOARES, J. R.; SILVA, A. G. B. Eficiência agrônômica do NBPT como um inibidor da urease: uma revisão. *J. Adv. Res.*, v. 13, 19-27, 2018.
- [46]. CAO, R. TIAN, W. SHEN, W. Polysaccharides as protectants for paper-based analytical devices with antibody. *Talanta* 165 (2017) 357–363.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.12.079>
- [47]. CARTER, E. L. et al. Interplay of metal ions and urease. *Metallomics*, v. 1, n. 3, 207–221, 2009.
- [48]. CASSIM, B.M.A.R., KACHINSKI, W.D., BESEN, M.R., CANEGLIAN, C.F., MACON, C.R., PASCHOETO, G.F., INOUE, T.T., BATISTA, M.A., 2021. Duromide increase NBPT efficiency in reducing ammonia volatilization loss from urea. *Rev. Bras. Cienc. Solo* 45, e0210017.
<https://doi.org/10.36783/18069657rbc20210017>
- [49]. CASTRO, J. T. & KORN, M. Deleterious effect of ammonium extraction from soil assisted by ultrasound. *Microchemical Journal*, 78, 41-45, 2004.
- [50]. CELIK, C., SEZGIN, G. C., KOCABAS, U. G., GURSOY, S., ILDIZ, N., TAN, W. Novel Anthocyanin-Based Colorimetric Assay for the Rapid, Sensitive, and Quantitative Detection of Helicobacter pylori. *Anal. Chem.* 2021, 93, 6246–6253.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00663>.
- [51]. CHALMERS, M. J. et al. Differential hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry analysis of protein–ligand interactions. *Expert Rev. Proteomics* 8(1), 43–59, 2011.
- [52]. CHAVES, O. A. et al. Studies of the interaction between BSA and a plumeran indole alkaloid isolated from the stem bark of *Aspidosperma cylindrocarpon* (Apocynaceae). *JBCS*, v. 28, n. 7, p. 1229-1236, 2017.
- [53]. CHAVES, O.A.; AMORIM, A.P.O.; CASTRO, L.H.E.; SANT’ANNA, C.M.R.; OLIVEIRA, M.C.C.; CESARIN-SOBRINHO, D.; NETTO-FERREIRA, J.C.; FERREIRA, A.B.B. Fluorescence and Docking Studies of the Interaction between Human Serum Albumin and Pheophytin, *Molecules*, v.20, 19526-19539, 2015.
- [54]. CICHERO, M. C. & SANTOS, J. H. Z.. Encapsulated bromocresol purple-based sensitive materials: The role of the nature and distribution of matrix layers on ammonia sensing performance. *Applied Surface Science Advances* 4 (2021) 100078.
<https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2021.100078>

- [55]. CORDERO, I. et al. High throughput method for measuring urease activity in soil. *Soil Biol. Biochem.*, v. 134, 72–77, 2019.
- [56]. COSTA, M. C. G.; VITTI, G. C.; CANTARELLA, H. Volatilização de N-NH₃ de fontes nitrogenadas em cana-de-açúcar colhida sem despalha a fogo. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, 27, 631-637, 2003.
- [57]. D. BHOWMIK, R. NANDI, R. JAGADEESAN, N. KUMAR, A. PRAKASH, D. KUMAR, Identification of Potential Inhibitors against SARS-CoV-2 by Targeting Proteins Responsible for Envelope Formation and Virion Assembly Using Docking Based Virtual Screening, and Pharmacokinetics Approaches. *Infect. Genet. Evol.*, 84 (2020) 104451. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104451>
- [58]. D. ZHANG, R. LAZIM, Application of Conventional Molecular Dynamics Simulation in Evaluating the Stability of Apomyoglobin in Urea Solution. *Sci. Rep.*, 7 (2017) 44651. <https://doi.org/10.1038/srep44651>
- [59]. DAHLÉN, G. HASSAN, H. BLOMQVIST, S. CARLÉN, A. Rapid urease test (RUT) for evaluation of urease activity in oral bacteria in vitro and in supragingival dental plaque ex vivo, *BMC Oral Health* (2018) 18:89 <https://doi.org/10.1186/s12903-018-0541-3>, 2018.
- [60]. DAWSON, R. M. C. et al. Data for Biochemical Research; 3rd ed., Oxford Science Publ. <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html> (accessed 13 July 2020).
- [61]. DENG, H.; HONG, G.; LIN, F.; LIU, A.; XIA, X.; CHEN, W. Colorimetric detection of urea, urease, and urease inhibitor based on the peroxidase-like activity of gold nanoparticles. *Anal. Chim. Acta*, 915, 74-80, 2016.
- [62]. DENG, H-H. et al. pH sensitive gold nanoclusters: preparation and analytical applications for urea, urease, and urease inhibitor detection. *Chem Commun.*, v. 51, 7847–50, 2015.
- [63]. DÍAZ-S´ANCHEZ, ´A.G., ALVAREZ-PARRILLA, E., MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, A., AGUIRRE-REYES, L., OROZPE-OLVERA, J.A., RAMOS-SOTO, M.A., NÚÑEZ-GAST´ELUM, A.J., ALVARADO-TENORIO, B., DE LA ROSA, L.A., 2016. Inhibition of urease by disulfiram, an FDA-approved thiol reagent used in humans. *Molecules* 21. <https://doi.org/10.3390/molecules21121628>.
- [64]. DINDAR, B.; KARAKUS, E.; ABASIYANIK, F. New Urea Biosensor Based on Urease Enzyme Obtained from *H. pylori*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v.165, 1308–1321, 2011.
- [65]. DIRECTIVE (EU) 2016/2284. NEC Directive reporting status 2015. Disponível em <<<https://www.eea.europa.eu/themes/air/airpollution-sources-1/national-emission-ceilings/national-emissionreduction-commitments-directive>, acesso em junho 2022.
- [66]. DOMÍNGUEZ, M. J. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of phosphoramidate derivatives as urease inhibitors. *J. Agric. Food Chem.*, v. 56, 3721–3731, 2008.

- [67]. DONG, X. et al. Synthesis, structure and urease inhibition studies of Schiff base copper(II) complexes with planar four-coordinate copper(II) centers. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 127, p. 82–89, 2013.
- [68]. DONG, X. et al. Synthesis, structures and urease inhibition studies of copper(II) and nickel(II) complexes with bidentate N,O-donor Schiff base ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 108, p. 22–29, 2012.
- [69]. DU, N. et al. Kinetics of competitive inhibition of jack bean urease by boric acid. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, v. 82, 53–58, 2012.
- [70]. DU, X. et al. Insights into Protein – Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 17, p. 144-178, 2016.
- [71]. EL-HEFNAWY, M. E. et al. Extraction, purification, kinetic and thermodynamic properties of urease from germinating *Pisum Sativum* L. seeds. *BMC Biochem.* 15, 1–8, 2014.
- [72]. ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.
- [73]. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ), M. de métodos de análise de solo / C.N. De, 1997. Pesquisa de Solos. – 2. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro, 212p.: il. (EMBRAPA-CNPS. Documentos ; 1, Manual de Métodos de Análise de Solo, https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Manual+de+Metodos_000fzvhotqk02wx5ok0q43a0ram31wtr.pdf.
- [74]. ENGEL, R.E., TOWEY, B.D., GRAVENS, E., 2015. Degradation of the urease inhibitor NBPT as affected by soil pH. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 79, 1674–1683. <https://doi.org/10.2136/sssaj2015.05.0169>.
- [75]. ERICSON, M. N. SHANKAR, S. K. CHACINE, L. M. OMARY, M. A. Development of Neutral Red as a pH/pCO₂ Luminescent Sensor for Biological Systems. *Chemosensors* 2021, 9, 210. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9080210>.
- [76]. ERICSON, M. N., SHANKAR, S. K., CHAHINE, L. M., OMARY, M. A. von HERBING, I., MARPU, S. B. Development of Neutral Red as a pH/pCO₂ Luminescent Sensor. *Chemosensors* 2021, 9, 210. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9080210>
- [77]. EVANS, E. et al. Modification of microfluidic paper-based devices with silica nanoparticles. *Analyst.* 139, 5560–5567, 2014.
- [78]. EVANS, E. MOREIRA, E. F., COLTRO, W. K. T. GARCIA, C. D. Rational selection of substrates to improve color intensity and uniformity on microfluidic paper-based analytical devices
- [79]. F. NEESE, The ORCA Program System. *WIREs Comput. Mol. Sci.*, 2 (2012) 73–78. <https://doi.org/10.1002/wcms.81>
- [80]. F.C. BERNSTEIN, T. F. KOETZLE, G. J. B. WILLIAMS, E. F. MEYER, M. D. BRICE, J. R. RODGERS, O. KENNARD, T. SHIMANOUCI, M. TASUMI, The Protein Data Bank: A Computer-Based Archival File for Macromolecular Structures. *J. Mol. Biol.* 112 (1977) 535–542. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11885.x>

- [81]. FAHEY, J. W. et al. Urease from *Helicobacter pylori* is inactivated by sulforaphane and other isothiocyanates. *Biochem Biophys Res Commun.*, v. 435, n. 1, p. 1–7, 2013.
- [82]. FAWAD, N. F. The effect of light activated bleaching versus orange juice on enamel's micro-hardness. *Tanta Dental Journal*. Volume 12, Issue 4, December 2015, Pages 302-307. <https://doi.org/10.1016/j.tdj.2015.09.002>
- [83]. FERREIRA, C. M. H. et al. (Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions-a review. *RSC Adv.*, v. 5, 30989–31003, 2015.
- [84]. FERRER, F. M., HOBART, K., BAILEY, J. V. Field detection of urease and carbonic anhydrase activity using rapid and economical tests to assess microbially induced carbonate precipitation. *Biotechnology*, 13, 1877–1888.
- [85]. FIGUEREDO, F. et al. Enhanced Analytical Performance of Paper Microfluidic Devices by Using Fe₃O₄ Nanoparticles, MWCNT, and Graphene Oxide. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 8, 11–15, 2016.
- [86]. FREITAS, S. V. et al. Uncovering the Formation of Color Gradients for Glucose Colorimetric Assays on Microfluidic Paper-Based Analytical Devices by Mass Spectrometry Imaging. *Anal. Chem.*, v. 90, 11949–11954, 2018.
- [87]. GILCHRIST, A., NOBBS, G. Colorimetry, Theory. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition)*. 2017, Pages 328-333. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00124-2>.
- [88]. GLOBALFERT. Disponível em <<
<https://www.globalfert.com.br/analises/importacao-de-fertilizantes-bate-recorde-em-2020/>>> Acesso em 20 de janeiro de 2021.
- [89]. GOMOLLÓN-BEL, F. MARTÍNEZ, J. G. Emerging chemistry technologies for a better world. *Nature Chemistry*, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41557-021-00887-9>
- [90]. GOUR, A., DOGRA, A., KOUR, D., SINGH, G., KUMAR, A., NANDI, U. Effect of Concomitant Hydroxyurea Therapy with Rutin and Gallic Acid: Integration of Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Approaches. *ACS Omega* 2021, 6, 14542–14550.
- [91]. GRAHAM, D. Y.; MIFTAHUSSURUR, M. *Helicobacter pylori* urease for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: A mini review. *J. Adv. Res*, v. 13, 51–57, 2018.
- [92]. GUAN, F. SONG, Z., XIN, F., WANG, H., YU, D., LI, G., LIU, W. Preparation of hydrophobic transparent paper via using polydimethylsiloxane as transparent agent. *Journal of Bioresources and Bioproducts* 5 (2020) 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2020.03.004>
- [93]. GUAN, Y.; ZHANG, H.; WANG, Y. New insight into the binding interaction of hydroxylated carbon nanotubes with bovine serum albumin, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, v. 124, 556-563, 2014.

- [94]. GUERMAT, N. SAHLI, S. BELLEL, A. RAYNAUD, P. Electrical and structural characterisation of plasma-polymerized TEOS thin films as humidity sensors. *M. J. Condensed Matter*, Vol. 12, n° 3, 2010. <https://www.researchgate.net/publication/267842952>.
- [95]. GUERRA, R. R.; CARLINI, C. R.; STANISÇUASKI, F. Role of lysine and acidic amino acid residues on the insecticidal activity of Jackbean urease. *Toxicon*, v. 71, p. 76–83, 2013.
- [96]. H. SARMA, V. S. K. MATTAPARTHI, Structure-Based Virtual Screening of High-Affinity ATP-Competitive Inhibitors Against Human Lemur Tyrosine Kinase-3 (LMTK3) Domain: A Novel Therapeutic Target for Breast Cancer. *Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci.*, 11 (2019) 527–541. <https://doi.org/10.1007/s12539-018-0302-7>
- [97]. H.J.C. BERENDSEN, D. VAN DER SPOEL, R. VAN DRUNEN, GROMACS: A Message-Passing Parallel Molecular Dynamics Implementation. *Comput. Phys. Commun.*, 91 (1995) 43–56. [https://doi.org/10.1016/0010-4655\(95\)00042-E](https://doi.org/10.1016/0010-4655(95)00042-E)
- [98]. HAMEED, A. et al. Synthesis, biological evaluation and molecular docking of N-phenyl thiosemicarbazones as urease inhibitors. *Bioorg. Chem.*, v. 6, 51–57, 2015.
- [99]. HANIF, M. et al. Symmetrical Heterocyclic Cage Skeleton: Synthesis, Urease Inhibition Activity, Kinetic Mechanistic Insight, and Molecular Docking Analyses. *Molecules*, v.24, 1-13, 2019.
- [100]. HANIF, M. et al. Synthesis, Urease Inhibition, Antioxidant, Antibacterial, and Molecular Docking Studies of 1,3,4-Oxadiazole Derivatives. *ISRN Pharmacol.*, 1–9, 2012.
- [101]. HARRIS, E. B. et al. Urease assay using a rapid radiometric procedure. *Anal. Biochem.*, v. 249, 117–118, 1997.
- [102]. HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C.; FISHER, B. D. *Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology*. 2 ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007.
- [103]. HE, L-L. et al. Studies on the interaction between promethazine and human serum albumin in the presence of flavonoids by spectroscopic and molecular modeling techniques, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.145, 820-829, 2016.
- [104]. HERNÁNDEZ-SANTOYO, A. et al. Protein-protein and protein-ligand docking. In: *Protein engineering-technology and application*. InTech Rijeka, p. 66, 2013.
- [105]. HIBAOU, L., MASSIK, A., LEBBAR, Z. YAHYAOU, G., MAHMOUD, M., BOUGNOUCH, L., HAMASS, N., CHBANI, L., BENNANI, B. BERRAHOU, M. A., IDRIS, M. L., HIDA, M. The high sensitivity and specificity of rapid urease test in diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in Moroccan children. *IRAN. J. MICROBIOL.* Volume 14 Number 5 (October 2022) 669-676.
- [106]. HORTA, L. P. et al. Urease Inhibitors of Agricultural Interest Inspired by Structures of Plant Phenolic Aldehydes. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 27, 1512-1519, 2016.
- [107]. HOSPODAROVA, V. SINGOVSKA, E. STEVULOVA, N. Characterization of Cellulosic Fibers by FTIR Spectroscopy for Their Further Implementation to

- Building Materials. American Journal of Analytical Chemistry, 2018, 9, 303-310.
<https://doi.org/10.4236/ajac.2018.96023>.
- [108]. HOWELL, F. et al. Buffer Effects upon Urease Activity, J. Biol. Chem., v. 619–626, 1934.
- [109]. HOWELL, S. F. & SUMNER, J. B. The specific effects of buffers upon urease activity. Received for publication, January 17, 1934. Downloaded from <http://www.jbc.org/> by guest on July 7, 2020.
- [110]. HU, S. et al. Raman tracking the activity of urease in saliva for healthcare. Biosens. Bioelectron., v. 129, 24–28, 2019.
- [111]. HU, Y. SCHMIDHALTER, U. Urease inhibitors: opportunities for meeting EU national obligations to reduce ammonia emission ceilings by 2030 in EU countries. Environ. Res. Lett. 16 (2021) 084047 <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ac16fe>
- [112]. HU, Y.; ZHU, Y.; LU, N. H.. Novel and effective therapeutic regimens for helicobacter pylori in an era of increasing antibiotic resistance. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 7, n. MAY, p. 1–20, 2017.
- [113]. HUBALEK, J. et al. Spectrometric and voltammetric analysis of urease - Nickel nanoelectrode as an electrochemical sensor. Sensors., v. 7, 1238–1255, 2007.
- [114]. IIZUMI, T. et al. Augmentation of Helicobacter pylori urease activity by its specific IgG body: implications for bacterial colonization enhancement. Biomed. Res., 26, 1, 35-42, 2005.
- [115]. IKRAM, M. et al. Urease and α -chymotrypsin inhibitory activities of transition metal complexes of new Schiff base ligand: Kinetic and thermodynamic studies of the synthesized complexes using TG-DTA pyrolysis. Thermochimica Acta, v. 562, 22–28, 2013.
- [116]. IKRAM, M. et al. Urease and α -chymotrypsin inhibitory activities of transition metal complexes of new Schiff base ligand: Kinetic and thermodynamic studies of the synthesized complexes using TG-DTA pyrolysis. Thermochimica Acta, v. 562, 22–28, 2013.
- [117]. IPNI. International Plant Nutrition Institute, Informações Agronômicas N° 117/2007. Disponível em << [http://www.ipni.net/publication/ia-brasil.nsf/0/57016453CC87592483257AA100616469/\\$FILE/page1-21-117.pdf](http://www.ipni.net/publication/ia-brasil.nsf/0/57016453CC87592483257AA100616469/$FILE/page1-21-117.pdf)>> Acesso em 20 janeiro 2021.
- [118]. ISHII, K.; NODA, M.; UCHIYAMA, S. Mass spectrometric analysis of protein–ligand interactions. Biophysics and Physicobiology. v. 13, 87–95, 2016.
- [119]. ITO, S. Structural features of bromocresol purple and its binding sites on human serum albumin for a proton-exchange reaction. IJPC (2016) 06 (03).
- [120]. JAJA-CHIMEDZA, A. et al. A dietary isothiocyanate-enriched moringa (Moringa oleifera) seed extract improves glucose tolerance in a high-fat-diet mouse model and modulates the gut microbiome. Journal of Functional Foods, v. 47, n. May, p. 376–385, 2018.
- [121]. JAKHAR, S.; PUNDIR, C. S. Preparation, characterization and application of urease nanoparticles for construction of an improved potentiometric urea biosensor. Biosensors and Bioelectronics, v. 100, 242–250, 2018.

- [122]. JANNAH, F. & KIM, J. pH-sensitive colorimetric polydiacetylene vesicles for urease sensing. *Dyes Pigments*, 169, 15-21, 2019.
- [123]. JIANG, X.-Y. et al. Mechanism, kinetics, and antimicrobial activities of 2-hydroxy-1-naphthaldehyde semicarbazone as a new Jack bean urease inhibitor. *New J. Chem.*, v. 40, 3520-3527, 2016.
- [124]. JUNG, K. et al. Assessment of urease inhibition assays for measuring toxicity of environmental samples. *Water Res.*, v. 29, 1929–1933, 1995.
- [125]. KAFARSKI, M.; TALMA, P. Recent advances in design of new urease inhibitors: A review, *J. Adv. Res.*, v. 13, 101–112, 2018.
- [126]. KANWAL et al. Syntheses, in vitro urease inhibitory activities of urea and thiourea derivatives of tryptamine, their molecular docking and cytotoxic studies. *Bioorganic Chemistry*, v. 83, 595-610, 2019.
- [127]. KAPPAUN, K. et al. Ureases: historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – a review. *J. Adv. Res.*, v. 13, 3-17, 2018.
- [128]. KARMALI, K. et al. The use of Fourier transform infrared spectroscopy to assay for urease from *Pseudomonas aeruginosa* and *Canavalia ensiformis*. *Anal. Biochem.*, v. 331, 115–121, 2004.
- [129]. KASCHULA, C. H.; HUNTER, R. Synthesis and Structure–Activity Relations in Allylsulfide and Isothiocyanate Compounds From Garlic and Broccoli Against In Vitro Cancer Cell Growth. 2016. ISSN 15725995.v. 50 .
- [130]. KHACHORNSAKKUL, k. HUNG, K. CHANG, J. DUNGCHAI, W. CHEN, C. A rapid and highly sensitive paper-based colorimetric device for the on-site screening of ammonia gas. *The Royal Society of Chemistry* 2021. *Analyst*, 2021, 146, 2919; doi: 10.1039/d1an00032b.
- [131]. KHAN, H. U. TARIQ, M. SHAH, M. IQBAL, M. JAN, M. T. Inquest of highly sensitive, selective and stable ammonia (NH₃) gas sensor: Structural, morphological and gas sensing properties of polyvinylpyrrolidone (PVP)/CuO nanocomposite. *Synthetic Metals* 268 (2020) 116482. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2020.116482>.
- [132]. KHOBZAOUI, Moussa; TILLEKERATNE, L. M. Viranga; HUDSON, Richard A. Potent isothiocyanate inhibitors of carbonic anhydrase: Synthesis and evaluation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 318, n. 1, p. 1–3, 2004.
- [133]. KIM, A. L., MUSIN, E. V.; DUBROVSKIIA, A. V.; TIKHONENKO, S. A. Determination of urea concentration using urease-containing polyelectrolyte microcapsules. *Anal. Methods*, 11, 1585-1590, 2019.
- [134]. KIM, Y. H. SATHIYANARAYANAN1, G. KIM, H. J. BHATIA, S. K. SEO, H. KIM, J. SONG, H. KIM, Y. PARK, K. YANG, Y. A Liquid-Based Colorimetric Assay of Lysine Decarboxylase and Its Application to Enzymatic Assay. *J. Microbiol. Biotechnol.* (2015), 25(12), 2110–2115. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1505.05063>.
- [135]. KONIECZNA, I. ZARNOWIEC, P., KWINKOWSKI, M., KOLESINSKA, B., FRACZYK, J. KAMINSKI, Z. KACA, W. Bacterial Urease and its Role in Long-Lasting Human Diseases. *Current Protein and Peptide Science*, 2012, 13, 789-806

- [136]. KRAJEWSKA, B. et al. Jack bean urease: The effect of active-site binding inhibitors on the reactivity of enzyme thiol groups. *Bioorg. Chem.*, v. 35, 355–365, 2007.
- [137]. KRAJEWSKA, B.; BRINDELL, M. Thermodynamic study of competitive inhibitors' binding to urease. *J. Therm. Anal. Calorim.*, v. 123, 2427–2439, 2016.
- [138]. KRAJEWSKA, Barbara. Urease I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 59, 9–21, 2009.
- [139]. KROM, M. D. Spectrophotometric Determination of Ammonia: A Study of a Modified Berthelot Reaction Using Salicylate and Dichloroisocyanurate. *Analyst*, 105, 305-316, 1980.
- [140]. KURREY, R., KANTI, M., DEB, M. K. SHRIVAS, K. NIRMALKAR, J., SEN, B. K., MAHILANGA, M. JAIND, V. K. A KBr-impregnated paper substrate as a sample probe for the enhanced ATR-FTIR signal strength of anionic and non-ionic surfactants in an aqueous Medium.
- [141]. KUŹMIŃSKA, A. BUTRUK-RASZEJA, B. A. STEFANOWSKA, A. CIACH, T. Polyvinylpyrrolidone (PVP) hydrogel coating for cylindrical polyurethane scaffolds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 192 (2020) 111066. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111066>.
- [142]. LADEIRA, M. S. P.; SALVADORI, D. M. F.; RODRIGUES, M. A. M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 39, n. 4, 335-342, 2003.
- [143]. LAGE, T. C. A. et al. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* and interaction studies of lichen natural products with jack bean urease. *New J. Chem.*, v. 42, 5356-5366, 2018.
- [144]. LAWSON, A. P. et al. Naturally occurring isothiocyanates exert anticancer effects by inhibiting deubiquitinating enzymes. *Cancer Research*, v. 75, n. 23, 5130–5142, 2015.
- [145]. LI, J., WANG, S., LUO, J., LINDSEY, S., WANG, L., ZHANG, L., SHI, Y., 2021. Potential of Chamomile recutita plant material to inhibit urease activity and reduce NH₃ volatilization in two agricultural soils. *Atmosphere* 12, 1223. <https://doi.org/10.3390/atmos12091223>.
- [146]. LIBRETEXTS. Infrared Spectroscopy Absorption Table. Last updated: Nov 2, 2020. https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Reference/Reference_Tables/Spectroscopic_Reference_Tables/Infrared_Spectroscopy_Absorption_Table
- [147]. LIU, J. et al. Characterizing the binding interaction of astilbin with bovine serum albumin: a spectroscopic study in combination with molecular docking technology. *RSC advances*, v. 8, n. 13, p. 7280-7286, 2018.
- [148]. LIU, X. et al., Enzyme and inhibition assay of urease by continuous monitoring of the ammonium formation based on capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 37, 20, 2692-2698, 2016.
- [149]. LOKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3ed. Springer, Baltimore, 2006.

- [150]. LONDALE, W. et al. Rapid measurement of urease activity using a potentiometric RuO₂ pH sensor for detection of *Helicobacter pylori*. *Sensors Actuators, B Chem.*, v. 242 1305–1308, 2017.
- [151]. LU, Q., TAN, D., XU, Y., LIU, M., HE, Y., LI, C., 2021. Inactivation of Jack bean urease by nitidine chloride from *Zanthoxylum nitidum*: elucidation of inhibitory efficacy, kinetics, and mechanism. *J. Agric. Food Chem.* 69, 13772–13779. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c04801>.
- [152]. LUTHER, J. L. et al. Paper test card for detection of adulterated milk. *Anal. Methods*, v. 9 5674–5683, 2017.
- [153]. LYRA, A. C. F. et al. Molecular interaction of sulfonamides and ovalbumin, an allergenic egg protein, exploring biophysical, theoretical and biological studies. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, v. 228, p. 117747, 2020.
- [154]. M. A. LILL, M. L. DANIELSON, Computer-Aided Drug Design Platform Using PyMOL. *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, 25 (2011) 13–19. <https://doi.org/10.1007/s10822-010-9395-8>
- [155]. M. L. VERDONK, J. C. COLE, M. J. HARTSHORN, C. W. MURRAY, R. D. TAYLOR, Improved Protein-Ligand Docking Using GOLD. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, 52 (2003) 609–623. <https://doi.org/10.1002/prot.10465>
- [156]. M. SAEIDIFAR, H. MANSOURI-TORSHIZI, A.A. SABOURY, Biophysical study on the interaction between two palladium (II) complexes and human serum albumin by multispectroscopic methods, *J. Lumin.* 167 (2015) 391–398. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2015.07.016>
- [157]. M. WU, Y. SUN, M. ZHU, L. ZHU, J. LÜ, F. GENG, Molecular Dynamics-Based Allosteric Prediction Method to Design Key Residues in Threonine Dehydrogenase for Amino-Acid Production. *ACS Omega*, 16, 2021. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00798>
- [158]. M.O. IDRIS, A.A. YEKEEN, O.S. ALAKANSE, O.A. DUROJAYE, Computer-Aided Screening for Potential TMPRSS2 Inhibitors: A Combination of Pharmacophore Modeling, Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation Approaches. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, (2020) 1–19. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1792346>
- [159]. MA, J. et al. Optimization of a salinity-interference-free indophenol method for the determination of ammonium in natural waters using *o*-phenylphenol. *Talanta*, v. 179, 608–614, 2018.
- [160]. MA, Liang; PANG, Ai-P; LUO, Y. LU, X. LIN, F. Beneficial factors for biomineralization by ureolytic bacterium *Sporosarcina pasteurii*. *Microb. Cell. Fact.*, v. 19, 1–12, 2020.
- [161]. MA, X. et al. Binding mechanism of trans-N-caffeoyltyramine and human serum albumin: Investigation by multi-spectroscopy and docking simulation. *Bioorganic Chemistry*, v. 66, 102–110, 2016.

- [162]. MACEGONIUK, K. et al. Potent covalent inhibitors of bacterial urease identified by activity-reactivity profiling. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 27, 1346–1350, 2017.
- [163]. MACEGONIUK, K. Inhibitors of bacterial and plants urease. A review. *Folia Biol. et Oecologica*, v. 9, 9-16, 2013.
- [164]. MAHMUD, M. A. BLONDEEL, E. J. M. KADDOURA, M. MACDONALD, B. D. Features in Microfluidic Paper-Based Devices Made by Laser Cutting: How Small Can They Be?. *Micromachines* 2018, 9, 220; doi:10.3390/mi9050220.
- [165]. MAHMUD, M. A., Blondeel, E. J. M., KADDOURA, M. MacDONALD, B. D. Features in Microfluidic Paper-Based Devices Made by Laser Cutting: How Small Can They Be? *Micromachines* 2018, 9, 220; doi:10.3390/mi9050220.
- [166]. MALEKGHASEMI, S. KAHVECI, E.; DUMAN, M. Rapid and alternative fabrication method for microfluidic paper based analytical devices. *Talanta*, 159, 401-411, 2016.
- [167]. MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aditivos autorizados para uso em fertilizantes minerais. Disponível em << <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/anexo-iii-in-39-2018-aditivos-inclui-nbpt-rnuf-30-01-19.pdf> >> acesso em julho de 2022.
- [168]. MARCELLETTI, J. F., EVANS, C. L., SAXENA, M., LOPEZ, A. E. Calculations for Adjusting Endogenous Biomarker Levels During Analytical Recovery Assessments for Ligand-Binding Assay Bioanalytical Method Validation. *The AAPS Journal*, Vol. 17, No. 4, 2015.
- [169]. MARTINEZ, A. W., PHILLIPS, S. T., BUTTE, J., WHINTSIDES, G. M. Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 1318–1320.
- [170]. MATHIALAGAN, R. et al. Evaluation of Allicin as Soil Urease Inhibitor. *Procedia Engineering*, v. 184, 449 – 459, 2017.
- [171]. MAZZEI, L. et al. Inactivation of urease by catechol: Kinetics and structure. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 166, 182–189, 2017.
- [172]. MAZZEI, L.; BROLL, V.; CIURLI, S. An Evaluation of Maleic-Itaconic Copolymers as Urease Inhibitors. *Soil Sci. Soc. Am. J.* v. 82, 994–1003, 2018.
- [173]. MAZZEI, L; MUSIANI, F.; CIURLI, S. The structure-based reaction mechanism of urease, a nickel dependent enzyme: tale of a long debate. *JBIC*, v. 25:829–845, 2020.
- [174]. McINTOSH, K. A. et al. situ detection of urease-positive *Helicobacter pylori*-like organisms on swine gastric mucosa. *Can. J. Vet. Res.*, 74, 237-240, 2010.
- [175]. MEYER, T. HMELSO, K., Van SPEYBROECK, V., CLERCK, K. Substituent effects on absorption spectra of pH indicators: An experimental and computational study of sulfonphthaleine dyes. *Dyes and Pigments* 102 (2014) 241e250.
- [176]. MICHAEL, A. M. et al. A Validated Assay of Urease Enzyme in Different Sources Using Silver Nanoparticles. *Food Anal. Methods.*, v. 8, 2482–2486, 2015.

- [177]. MICOLAS, M., BEYOY, E, FUMAGALLI, M. Two-step synthesis of polystyrene sulfonate-based copolymers bearing pendant primary amines. *European Polymer Journal* 152 (2021) 110455.
- [178]. MILO, S. HEYLEN, R. A. GLANCY, J. WILLIAMS, G. T. PATENALL, B. L. HATHAWAY, H. J. THET, N. T. ALLINSON, S. L. LAABEL, M. JENKINS, A. T. A. A small-molecular inhibitor against *Proteus mirabilis* urease to treat catheter-associated urinary tract infections. *Scientific Reports* (2021) 11:3726. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83257-2>
- [179]. MODOLO, L. V. et al. An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: A review. *J. Adv. Res.*, v. 6, 35-44, 2015.
- [180]. MOHAMMED, F. F.; BADR EL-DIN, K. M.; DERAYEA, S. M. Switch on fluorescence probe for the selective determination of lisinopril in pharmaceutical formulations: application to content uniformity testing. *RSC Adv.*, 16269–16277, 2018.
- [181]. MONDAL, S. et al. Urease immobilized single-kit for sensing of thiourea-glucose pair employing fluorescence ‘Turn off - Turn on and as an efficient sorbent for selective sample cleanup of thiourea. *Analytica Chimica Acta*, v. 1141, 180-193, 2021.
- [182]. MORBIOLI, G. G. et al. Technical aspects and challenges of colorimetric detection with microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs) - A review. *Anal. Chim. Acta.*, v. 970,1–22, 2017.
- [183]. MOREIRA, C. M. SCALA-BENUZZI, M. L. TAKARA, E. A. PEREIRA, S. V. REGIART, M. SOLER-ILLIA G. J. A. A. RABA, J. MESSINA G. A. *Talanta* 200 (2019) 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.051>.
- [184]. MUÑOZ-BLANCO, J., & CÁRDENAS, J. Determination of urease activity by thermal conductivity gas chromatography. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 13(2), 77-84, 1986.
- [185]. N. KUMAR, R. SRIVASTAVA, A. Prakash, A. M. Lynn, Structure-Based Virtual Screening, Molecular Dynamics Simulation and MM-PBSA toward Identifying the Inhibitors for Two-Component Regulatory System Protein NarL of *Mycobacterium Tuberculosis*. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 38 (2020) 3396–3410. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1657499>
- [186]. N. SELVAKUMARAN, A. PRATHEEPKUMAR, S. W. NG, EDWARD R. T. TIEKINK R. Karvembu Synthesis, structural characterization and cytotoxicity of nickel(II) complexes containing 3,3-dialkyl/aryl-1-benzoylthiourea ligands, , *Inorganica Chimica Acta*, 404 (2013) 82-87. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2013.04.024>
- [187]. NAKAMURA, T. et al. Covalent modification of lysine residues by allyl isothiocyanate in physiological conditions: Plausible transformation of isothiocyanate from thiol to amine. *Chemical Research in Toxicology*, v. 22, n. 3, p. 536–542, 2009.
- [188]. NAMWONG, P. et al. Fabricating Simple Wax Screen-Printing Paper-Based Analytical Devices to Demonstrate the Concept of Limiting Reagent in Acid-Base Reactions. *J. Chem. Educ.*, v. 95, 305–309, 2018.

- [189]. NDC - NATIONALLY DETERMINED CONTRIBUTION. Disponível em <<https://unfccc.int/NDCREG>> Acesso em julho de 2022.
- [190]. NELSON, David L. Princípios de bioquímica de Lehninger [recurso eletrônico] / David L. Nelson, Michael M. Cox; [tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga ... et al.]; revisão técnica: Carlos Termignoni [et al.]. – 6. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre: Artmed, 2014.
- [191]. NG, J S. & HASHIMOTO, M. 3D-PAD: Paper-Based Analytical Devices with Integrated Three-Dimensional Features. *Biosensors* 2021, 11, 84. <https://doi.org/10.3390/bios11030084>.
- [192]. NOIPHUNG, J. et al. Henry, Development of paper-based analytical devices for minimizing the viscosity effect in human saliva, *Theranostics*, v. 8, 3797–3807, 2018.
- [193]. NOVIANA, E. CARRÃO, D. B. PRATIWI, R. HENRY, C. S. Emerging applications of paper-based analytical devices for drug analysis: A review. *Analytica Chimica Acta* 1116 (2020) 70e90. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.03.013>.
- [194]. NUSSINOV, R.; MA, B.; TSAI, C-J.; Multiple conformational selection and induced fit events take place in allosteric propagation. *Biophysical Chemistry*, v. 186, 22–30, 2014.
- [195]. O. LU, C. LI, G. WU, Insight into the inhibitory effects of Zanthoxylum nitidum against Helicobacter pylori urease and jack bean urease: Kinetics and mechanism. *J. Ethnopharmacol.* 249 (2020) 112419. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112419>
- [196]. OKYAY, T. O. & RODRIGUES, D. F. High throughput colorimetric assay for rapid urease activity quantification. *J. of Microbiol. Methods*, 95, 324-326, 2013.
- [197]. OLIVEIRA, W.S., SANTOS, J.C.C., 2020. Determination of total antioxidant capacity using thiamine as a natural fluorescent probe. *J. Braz. Chem. Soc.* 31, 2479–2490. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20200123>
- [198]. OZIL, M., TUZCUOĞLU, O., EMIRIK, M., 2021. Synthesis and molecular docking studies of potent urease inhibitors based on benzoxazole scaffold. *Chem. Sel.* 6, 5307–5312. <https://doi.org/10.1002/slct.202100928>.
- [199]. P. CSIZMADIA, MARVIN SKETCH AND MARVIN VIEW: Molecule Applets for the World Wide Web In: *Proceedings of the Proceedings of The 3rd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*; MDPI: Basel, Switzerland, 1999; p. 1775.
- [200]. PACHOLARZ, K. J.; GARLISH, R. A.; TAYLOR, R. J.; BARRAN, P. E. Mass spectrometry-based tools to investigate protein–ligand interactions for drug discovery. *Soc. Rev.*, v. 41, 4335–4355, 2012.
- [201]. PADARIYA, M. et al. Computer-Aided Design of Organophosphorus Inhibitors of Urease. *International Journal for Computational Biology*, v. 3, n. 1, 31, 2014.
- [202]. PALMER, T.; BONNER, P. L. *Enzymes*, 2 ed. Chapter 8 – Enzyme inhibition, *Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry*, 126-152, 2011.

- [203]. Paul, L.T., Fowler, L.A., Barry, R.J., Watts, S.A., 2013. Evaluation of Moringa oleifera as a dietary supplement on growth and reproductive performance in zebrafish. *J. Nutr. Ecol. Food Res.* 1, 322–328. <https://doi.org/10.1166/jnef.2013.1050>.
- [204]. PDB – Protein Data Bank. Crystal structure of the first plant urease from Jack bean (*Canavalia ensiformis*). Disponível em <<https://www.rcsb.org/structure/3la4>> acesso em janeiro de 2021.
- [205]. PEREIRA, P. M. L. et al. In vitro evaluation of antitrypanosomal activity and molecular docking of benzoylthioureas. *Parasitology International*, v. 80, 2021.
- [206]. PETERS, J. J., ALMEIDA, M. I. G. S., SRAJ, L. O’C. McKELVIE, I. D. KOLEV, S. D. Development of a micro-distillation microfluidic paper based analytical device as a screening tool for total ammonia monitoring in freshwaters. *Analytica Chimica Acta* 1079 (2019) 120e128. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.05.050>.
- [207]. PETROVIC, D. et al. Conformational dynamics, and enzyme evolution. *J. R. Soc. Interface*, v. 15, 1-18, 2018.
- [208]. PGNATARO, M. F.; HERRERA, M. G.; DODERO, V. I. Evaluation of Peptide/Protein Self-Assembly and Aggregation by Spectroscopic Methods, *Molecules*, v. 25, 1-35, 2020.
- [209]. PHUANGSAIJAI, N., JAKMUNEE, J. KITTIWACHANA, S. Investigation into the predictive performance of colorimetric sensor strips using RGB, CMYK, HSV, and CIELAB coupled with various data preprocessing methods: a case study on an analysis of water quality parameters. *J Anal Sci Technol* 12, 19 (2021). <https://doi.org/10.1186/s40543-021-00271-9>.
- [210]. POULSEN, J.L., GIMSING, A.L., HALKIER, B.A., BJARNHOLT, N., HANSEN, H.C.B., 2008. Mineralization of benzyl glucosinolate and its hydrolysis product the biofumigant benzyl isothiocyanate in soil. *Soil Biol. Biochem.* 40, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.015>.
- [211]. PREETHICHANDRA, D. M. G, GHOLAMI, M. D., IZAKE, E. L., O’MULLANE, A. P., SONAR, P. Conducting Polymer Based Ammonia and Hydrogen Sulfide Chemical Sensors and Their Suitability for Detecting Food Spoilage. *Adv.Mater. Technol.*2022, 2200841.
- [212]. PUBCHEM. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 1176, Urea. Disponível em <<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Urea>>> Acesso em 18 de janeiro, 2021.
- [213]. PURIGTON, E., BOUSFIELD, D., GRAMLICH, W. M. Fluorescent Dye Adsorption in Aqueous Suspension to Produce Tagged Cellulose Nanofibers for Visualization on Paper. *Cellulose (Lond)*. 2019; 26(8): 5117–5131.
- [214]. R. KUMARI, R. KUMAR, A. LYNN, G_mmpbsa —A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations. *J. Chem. Inf. Model.*, 54 (2014) 1951–1962. <https://doi.org/10.1021/ci500020m>
- [215]. R. S. OCHS, Understanding Enzyme Inhibition. *JChemEd.*, 77 (2000) 1453 – 1456. <https://doi.org/10.1021/ed077p1453>

- [216]. R.D. GORHAM JR, W. RODRIGUEZ, D. MORIKIS, Molecular Analysis of the Interaction between Staphylococcal Virulence Factor Sbi-IV and Complement C3d. *Biophys. J.*, 106 (2014) 1164–1173. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.01.033>
- [217]. RAHIM, F.; ALI, M.; ULLAH, S.; RASHID, U.; ULLAH, H. TAHA, M.; JAVED, M. T. REHMAN, W.; KHAN, A. A.; ABID, O. U. R.; BILAL. M. Development of bis-thiobarbiturates as successful urease inhibitors and their molecular modeling studies. *Chinese Chemical Letters*, v. 27, 693–697, 2016.
- [218]. RAHIMPOURA, E., KHOUBNASABJAFARIC, M., HOSSEINIE, M. B., JOUYBAND, A. Copper nanocluster-based sensor for determination of vancomycin in exhaled breath condensate: A synchronous fluorescence spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 196 (2021) 113906. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.113906>.
- [219]. RAHMAM, N. A., HANIFAH, S. A., MOBARAK, N. N., SUAIT, M. S. AHMAD, A., SHYUAN, L. K. KHOON, L. T. Synthesis and characterizations of onitrochitosan based biopolymer electrolyte for electrochemical devices. *PLoS ONE* 14(2): e0212066.
- [220]. RANA, M.A., MAHMOOD, R., ALI, S., 2021. Soil urease inhibition by various plant extracts. *PLoS ONE* 16, 0258568. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258568>.
- [221]. RAUF, A., SHAHZAD, S., BAJDA, M., YAR, M., AHMED, F., HUSSAIN, N., AKHATAR, M.N., KHAN, A., JONZYK, J., 2015. Design and synthesis of new barbituric- and thiobarbituric acid derivatives as potent urease inhibitors: structure-activity relationship and molecular modeling studies. *Bioorg. Med. Chem.* 23, 6049–6058. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.05.038>.
- [222]. REGO, Y. F. et al. A review on the development of urease inhibitors as antimicrobial agents against pathogenic bacteria. *J. Adv. Res.* 13,69–100, 2018.
- [223]. Regulations EU, 2019. Regulation (EU) 2019/1009 of the European parliament and the Council of 5 June 2019 laying down rules on the making available on the market of EU fertilizing products and amending Regulations (EC) No 1069/2009 and (EC) N° 1107/2009 and repealing Regulation (EC) No 2003/2003 (OJ L 170, 25.6.2019, p.1). <http://data.europa.eu/eli/reg/2019/1009/oj> (acesso em 20 November 2021).
- [224]. REYES, E. MARTIN, J. MONCADA, G., NEIRA, M., PALMA, P., GORDAN, V., OYARZO, J. F., YEVENES, I. Caries-free subjects have high levels of urease and arginine deiminase activity. *J Appl Oral Sci.*, 2014;22(3):235-40 <http://dx.doi.org/10.1590/1678-775720130591>
- [225]. ROBERTSON, S.; PENZAK, S. R.; HUANG, S-M. Principles of clinical pharmacology, 3 ed. – Chapter 15 – Drug interactions, Academic Press, 239-257, 2012.
- [226]. ROSKOSKI, R. Modulation of Enzyme Activity. LSU Health Sciences Center, New Orleans, USA, 2007 Elsevier Inc.
- [227]. ROY, A. D., DEURI, S. DUTTA, U. C. The diagnostic accuracy of rapid urease biopsy test compared to histopathology in implementing “test and treat” policy

- for helicobacter pylori. *Int J Appl Basic Med Res.* 2016 Jan-Mar;6(1):18-22. doi: 10.4103/2229-516X.174003.
- [228]. ROY, S.; SENGUPTA, P. S.; GUIN, P. S. Electrochemical and UV–Vis spectroscopic studies on the interaction of sodium 1, 4-dihydroxy-9, 10-anthraquinone-2-sulphonate with cetyltrimethylammonium bromide micelles. *Chemical Physics Letters*, v. 694, p. 7-13, 2018.
- [229]. S. BHARADWAJ, K.E. LEE, V.D. DWIVEDI, S.G. KANG, Computational Insights into Tetracyclines as Inhibitors against SARS-CoV-2 Mpro via Combinatorial Molecular Simulation Calculations. *Life Sci.*, 257 (2020) 118080. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118080>
- [230]. S. LU, W, HUANG, J. ZHANG, Recent Computational Advances in the Identification of Allosteric Sites in Proteins. *Drug Discov. Today*, 19 (2014) 1595–1600. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.07.012>
- [231]. SAEED, A.; MAHESAR, P. A.; CHANNAR, P. A.; LARIK, F. A.; ABBAS, Q.; HASSAN, M.; RAZA, H.; SEO, S-Y. Hybrid Pharmacophoric Approach in the Design and Synthesis of Coumarin Linked Pyrazolinyl as Urease Inhibitors, Kinetic Mechanism and Molecular Docking. *Chem. Biodiversity*, v. 14,1-14, 2017.
- [232]. SAEIDIFAR, M.; MANSOURI-TORSHIZI, H.; SABOURY, A. A. Biophysical study on the interaction between two palladium (II) complexes and human serum albumin by Multispectroscopic methods, *Journal of Luminescence*, v. 167, 391-398, 2015.
- [233]. SAENCHOOPA, A. KLANGPHUKHIEW, S. SOMSUB, R. TALODTHAISONG, C. PATRAMANON, R. DADUNG, J. DADUNG, S. KULCHAT, S. A Disposable Electrochemical Biosensor Based on Screen-Printed Carbon Electrodes Modified with Silver Nanowires/HPMC/Chitosan/Urease for the Detection of Mercury (II) in Water. *Biosensors* 2021, 11, 351. <https://doi.org/10.3390/bios11100351>.
- [234]. SANTOS, A. O. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and toxicological evaluation of semi-synthetic molecules obtained from a benzyl-isothiocyanate isolated from *Moringa oleifera* Lam. in a temporomandibular joint inflammatory hypernociception model in rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 98, n.
- [235]. SARWAR, M. S. GHAFFAR, A. HUANG, Q. Development and characterization of sodium alginate/poly(sodium 4-styrenesulfonate) composite films for release behavior of ciprofloxacin hydrogen chloride monohydrate. *Polymers and Polymer Composites*, 2021, Vol.29; doi: 10.1177/0967391121990278.
- [236]. SATO, T. et al. Endoscopic urease sensor system for detecting *Helicobacter pylori* on gastric mucosa. *Gastrointest. Endosc.*, v. 49, 32–38, 1999.
- [237]. SATO, T. et al. Immunological rapid urease test-a new diagnostic system for detecting *Helicobacter pylori*. *Gastrointest. Endosc.*, v. 51, AB209, 2000.
- [238]. SCARANO, E., FIORITA, A., PICCIOTTI, P. M., PASSALI, G. C., CALO, L., CABRAS, T., INZITARI, R., FANALI, C. MESSANA, I., CASTAGNOLA, M., PALUDETTI, G. Proteomics of saliva? Personal experience. *ACTA otorhinolaryngologica italica* 2010;30:125-130.

- [239]. SCHAFFER, J. N. & PEARSON, M. M. *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections. *Microbiol Spectrum* 3(5):UTI-0017-201;. doi:10.1128/microbiolspec.UTI-0017-2013.
- [240]. SCOTT, D. R.; SACHS, G.; MARCUS, E. A. The role of acid inhibition in *Helicobacter pylori* eradication. *F1000Research*, v. 5 (F1000 Faculty Rev): 1747, 1-7, 2016.
- [241]. SHIBATA, T. et al. Transthiocarbamylation of proteins by thiolated isothiocyanates. *J. Biological Chemistry*, v. 286, n. 49, p. 42150–42161, 2011.
- [242]. SHIMADA, T. & HASEGAWA, T. Determination of equilibrium structures of bromothymol blue revealed by using quantum chemistry with an aid of multivariate analysis of electronic absorption spectra. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 185 (2017) 104–110.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.040>.
- [243]. SHU, M., BERMUDEZ, E. M. PÉREZ, S., MIRANDA, C. R., BROWNGARFT, C. M., CHEN, Y. Y. M., MAGNUSSON, I., BURNE, R. A. The relationship between dental caries status and dental plaque urease activity. *Oral Microbiology Immunology* 2007: 22: 61–66.
- [244]. SIGURDARSON, J. J.; SVANE, S.; KARRING, H. The molecular processes of urea hydrolysis in relation to ammonia emissions from agriculture. *Rev Environ Sci Biotechnol*, v. 17, n. 2, 241–258, 2018.
- [245]. SILVA, A. P. B.; BOTERO, W. G.; OLIEIRA, L. C.; FERNANDES, A. P. Influência do tipo de manejo (orgânico e convencional) na matéria orgânica de solos cultivados com citros [recurso eletrônico] / Amanda Paulina Bezerra da Silva... [et al.]. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019.
- [246]. SINGH, J.; PETTER, R.; BAILLIE, T. A.; W. A. The resurgence of covalent drugs. *nature reviews, drug discovery*, v. 10, 307-317, 2011.
- [247]. SIRTORI, F. R. et al. MS methods to study macromolecule-ligand interaction: Applications in drug discovery. *Methods* v. 144, 152–174, 2018.
- [248]. SONI, A. et al. Smartphone based optical biosensor for the detection of urea in saliva. *Sensors Actuators, B Chem.* 269, 346–353, 2018.
- [249]. STAROTIN, Comparison of diagnostic characteristics of indicator paper and selective urease test for the qualitative determination of *helicobacter pylori*. *Universum: Medicine and pharmacology: electron. scientific magazine* 2020. No. 2-3(66). URL: <http://7universum.com/ru/med/archive/item/9010>
- [250]. Su, B., Chen, X., 2020. Current status and potential of *Moringa oleifera* leaf as an alternative protein source for animal feeds. *Front. Vet. Sci.* 7, 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00053>.
- [251]. ŠUDOMOVÁ, M., HASSAN, S. T. S., KHAN, H., RASEHIAN, M., NABA VI, S. M. A Multi-Biochemical and In Silico Study on Anti-Enzymatic Actions of Pyroglutamic Acid against PDE-5, ACE, and Urease Using Various Analytical Techniques: Unexplored Pharmacological Properties and Cytotoxicity Evaluation. *Biomolecules* 2019, 9, 392.

- [252]. SUN, M. JOHNSON, M. A. Measurement of total antioxidant capacity in sub-mL blood samples using craft paper-based analytical devices. *RSC Adv.*, 2015, 5, 55633.
- [253]. SURESH, V. QUNYA, O. KANTA, B. L. YUH, L. Y., CHONG, K. S. L. Non-invasive paper-based microfluidic device for ultra-low detection of urea through enzyme catalysis. *R. Soc. open sci.* 5: 171980. <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.171980>
- [254]. SVANE, S. SIGURDARSON, J. J. FINKENWIRTH, F. EITINGER, T. KARRING, H. Inhibition of urease activity by diferent compounds provides insight into the modulation and association of bacterial nickel import and ureolysis. *Scientific Reports* (2020) 10:8503. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65107-9>
- [255]. SVANE, S. SIGURDARSON, J. J., FINKERWIRTH, F. EITINGER, T. KARNING, H. Inhibition of urease activity by different compounds provides insight into the modulation and association of bacterial nickel import and ureolysis. *Scientific Reports* | (2020) 10:8503 | <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65107-9>
- [256]. T. A. WANI, A. H. BAKHEIT, S. ZARGAR, M. A. HUMIDADDIN, I. A. DARWISH, Spectrophotometric and molecular modeling studies on in vitro interaction of tyrosine kinase inhibitor linifanib with bovine serum albumin, *PLoS One* 12 (2017) 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176015>
- [257]. T. D. GODDARD, C. C. HUANG, T. E. FERRIN, Software Extensions to UCSF Chimera for Interactive Visualization of Large Molecular Assemblies. *Structure*, 13 (2005) 473–482. <https://doi.org/10.1016/j.str.2005.01.006>
- [258]. TAI, W. C., Y. C. C., CHOU, FU, L. M. Lab-on-Paper Devices for Diagnosis of Human Diseases Using Urine Samples—A Review. *Biosensors* 2021, 11, 260. <https://doi.org/10.3390/bios11080260>.
- [259]. TAKISHIMA, K.; SUGA, T.; MAMIYA, G.. The structure of jack bean urease: The complete amino acid sequence, limited proteolysis and reactive cysteine residues. *European Journal of Biochemistry*, v. 175, n. 1, p. 151–157, 1988.
- [260]. TANG, L. et al. Total isothiocyanate yield from raw cruciferous vegetables commonly consumed in the United States. *J. of Functional Foods*, v. 5, n. 4, p. 1996–2001, 2013.
- [261]. TANG, P. KASPERSKY, N. SUN, G. Robust, rapid, and ultrasensitive colorimetric sensors through dye chemisorption on poly-cationic nanodots. *Talanta* 219 (2020) 121149. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121149>.
- [262]. TANG, R. H., LI, M., LIU, N. L., ZHANG, S. F., ALAM, N. YOU, M., NI, Y. H., LI, Z. D. Chitosan-modified nitrocellulose membrane for paper-based point-of-care testing. *Cellulose* (2020) 27:3835–3846. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03031-x>.
- [263]. TANNER, N. A., ZHANG, Y., EVANS JR, T. C. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *BioTechniques* 58:59–68, 2015.

- [264]. TAVARES, M. et al. Organic Matter Leached from Tropical Soils by Simulated Rain, Hard (NaOH) and Soft (NaNO₃) Extractions: A Realistic Study about Risk Assessment in Soils. *JBCS*, v. 00, n. 00, p. 1–8, 2021.
- [265]. TAVARES, M.C., OLIVEIRA, K.A., DE F'ATIMA, A., COLTRO, W.K.T., SANTOS, J.C.C., 2021a. Paper based analytical device with colorimetric detection for urease activity determination in soils and evaluation of potential inhibitors. *Talanta* 230, 122301. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122301>.
- [266]. THAKUR, M. SHARMA, A. AHLAWAT, V. BHATTACHARYA, M. GOSWAMI, S. *Materials Science for Energy Technologies* 3 (2020) 328–334. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2019.12.005>.
- [267]. TIAN, F-F. et al. Synthesis of a novel hydrazone derivative and biophysical studies of its interactions with bovine serum albumin by spectroscopic, electrochemical, and molecular docking methods, *J. Phys. Chem. B*, v. 114, 14842–14853, 2014.
- [268]. TIRAPU-AZPIROZ, J. FERREIRA, M. E., MARÇAL, D. V. L. M. SILVA, A. F. OHTA, R. L., STEINERA, M. B. High-resolution colorimetric detection on paper-based microfluidic devices via indicator merging and machine learning. *Proc. of SPIE* Vol. 11637, 2021.
- [269]. TODD, M. J. et al. Competitive Inhibitors of *Klebsiella aerogenes* Urease. *Biochemistry.*, v. 264, 15835–15842, 1989.
- [270]. TUMER, T. B. et al. Direct and indirect antioxidant activity of polyphenol- and isothiocyanate-enriched fractions from moringa oleifera. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, n. 5, p. 1505–1513, 2015.
- [271]. UOTANI, T., GRAHAM, D. Y. Diagnosis of *Helicobacter pylori* using the rapid urease test. *Ann Transl Med* 2015;3(1):9. <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.12.04>.
- [272]. UPADHYAY, L. S. B. Urease inhibitors: A review. *Indian Journal of Biotechnology*. Vol 11, October 2012, pp 381-388
- [273]. URBANOWICZ, M., SADOWSKA, K., PAZIEWSKA-NOWAK, A., SOLDATOWSKA, A., PIJANOWSKA, D. G. Highly Stable Potentiometric (Bio)Sensor for Urea and Urease Activity Determination. *Membranes* 2021, 11, 898. <https://doi.org/10.3390/membranes11110898>.
- [274]. URBANSKY, E. T. et al. Understanding, Deriving, and Computing Buffer Capacity. *J. Chem. Educ.*, v. 77, 1640–1644, 2000.
- [275]. V. A. FEHER, J. D. DURRANT, A. T. VAN WART, R.E. AMARO, Computational Approaches to Mapping Allosteric Pathways. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 25 (2014) 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.02.004>
- [276]. VICENTE, C. Reversal by L-cysteine of the inactivation of urease by L-usnic acid, *Plant Sci. Lett.*, v. 15, 165–168, 1979.
- [277]. WAHID, S., JAHAGIR, S., VERSIANI, M.A., KHAN, K.M., SALAR, U., ASHRAF, M., FARZAND, U., WADOOD, A., KANWAL, ASHFAQ-UR-REHAMAN, ARSHIA, T., M., PERVEEN, S., 2020. Atenolol thiourea hybrid as

- potent urease inhibitors: design, biology-oriented drug synthesis, inhibitory activity screening, and molecular docking studies. *Bioorg. Chem.* 94.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103359>.
- [278]. WANG, Y. ZHANG, G. ZHANG, H. Study on the Interaction of Pentachlorophenol with Urease in Aqueous Solution by Multiple Spectroscopic Techniques. *J Solution Chem* (2011) 40: 458–469; doi: 10.1007/s10953-011-9664-8.
- [279]. WANI, T. A.; BAKHEIT, A. H.; ZARGAR, S.; HUMIDADDIN, M. A.; DARWISH, I. A. Spectrophotometric and molecular modeling studies on in vitro interaction of tyrosine kinase inhibitor linifanib with bovine serum albumin, *PLoS One* 12 (4), 1–12, 2017.
- [280]. WATERMAN, C. et al. Stable, water extractable isothiocyanates from *Moringa oleifera* leaves attenuate inflammation in vitro. *Phytochemistry*, v. 103, p. 114–122, 2014.
- [281]. WATSON, C. J.; STEVENS, R. G.; LAUGHLIN, R. J. Effectiveness of the urease inhibitor NBPT (N-(n-butyl) thiophosphoric triamide) for improving the efficiency of urea for ryegrass production. *Fertilizer Research*, v. 24, 11-15, 1990.
- [282]. WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* v. 39, 8, 971–974, 1967.
- [283]. WILLIAMS, M. A.; DAVITER, T. Protein-ligands interactions – Methods and application. 2 ed. London: Humana Press, 2013.
- [284]. WOOLF, M. S., DIGNAN, L. M., SCOTT, A. T., LANDERS, J. P. Digital postprocessing and image segmentation for objective analysis of colorimetric reactions. *Nature protocols* |vol 16 |january 2021 | 218–238,
- [285]. XIE, W. et al. A high-resolution colorimetric immunoassay platform realized by coupling enzymatic multicolor generation with smartphone readout. *Analyst.* 143, 2901–2907, 2018.
- [286]. YANG, D. et al. Immobilization adjusted clock reaction in the urea-urease-H⁺ reaction system. *RSC Adv.*, v. 9, 3514–3519, 2019.
- [287]. YANG, L-P. et al.; A supramolecular system that strictly follows the binding mechanism of conformational selection. *Nature communications*, v. 11, 1-9, 2020.
- [288]. YAN-QING, W., GEN-CHENG, Z., HONG-MEI, Z., 2011. Study on the interaction of pentachlorophenol with urease in aqueous solution by multiple spectroscopic techniques. *J. Solut. Chem.* 40, 458–469.
<https://doi.org/10.1007/s10953-011-9664-8>.
- [289]. YAN-QING, W.; HONG-MEI, Z. Spectral studies on the interaction between Cu²⁺ and urease. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, v. 96, p. 352–357, 2012.
- [290]. YU, M., ZHANG, X. Y., YU, Q. Detection of oral *Helicobacter Pylori* infection using saliva test cassette. *Pak J Med Sci* 2015 Vol. 31 No. 5.
- [291]. YU, P., DENG, M., YANG, Y. New Single-Layered Paper-Based Microfluidic Devices for the Analysis of Nitrite and Glucose Built via Deposition of Adhesive Tape Peng Yu, Muhan Deng and Yi Yang. *Sensors* 2019, 19, 4082; doi:10.3390/s19194082.

- [292]. ZHANG, H-M.; ZHANG, G-C.; WANG, Y-Q. The Interaction of Chromium(VI) with Urease in Solution. *Biol Trace Elem Res*, v. 141, 53–64, 2011.
- [293]. ZHANG, Q. LIU, Y. CHEN, K. C. ZHANG, G. SHI, X. CHEN, H. Surface biocompatible modification of polyurethane by entrapment of a macromolecular modifier. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 102 (2013) 354–360. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.037>.
- [294]. ZHANG, Y. et al. Interactions of chromium (III) and chromium (VI) with bovine serum albumin studied by UV spectroscopy, circular dichroism, and fluorimetry. *Biological Trace Element Research*, v. 130, n. 2, p. 172–184, 2009.
- [295]. ZHANG, Y. LIM, L. Inkjet-printed CO₂ colorimetric indicators. *Talanta* 161 (2016) 105–113. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.08.014>.
- [296]. ZHANG, Z. XU, X. Wrapping carbon nanotubes with poly (sodium 4-styrenesulfonate) for enhanced adsorption of methylene blue and its mechanism. *Chemical Engineering Journal* 256 (2014) 85–92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2014.06.020>.
- [297]. ZHENG, Y-Y. et al. Molecular Interaction Kinetics and Mechanism Study of Phytohormones and Plant Protein with Fluorescence and Synchronous Fluorescence Techniques. *Chemistry Select*, v. 2, n. 14, p. 3993-4000, 2017.
- [298]. ZHU, M. KARI, N. YAN, Y. YIMIT, A. The fabrication and gas sensing application of a fast-responding m-CP-PVP composite film / potassium ion-exchanged glass optical waveguide. *Analytical Methods*, 2017, 9, 5494; doi: 10.1039/c7ay01541k
- [299]. ZOU, X., WANG, Y., LIU, W., CHEN, L. m-Cresol purple functionalized surface enhanced Raman scattering paper chips for highly sensitive detection of pH in the neutral pH range. *Analyst*, 2017, 142, 2333-2337.
- [300]. ZULFIQAR, AHMED, D. Solvent-free mechanochemical green synthesis of Schiff bases of tranexamic acid and study of their urease inhibitory and antioxidant activities. *Asian Journal of Green Chemistry* 6 (2022) 40-47.

ANEXO I

Tabela A1 – Características físico-químicas das amostras de solos (S1, S2, S3, S4).

Parâmetros	Solos			
	S1	S2	S3	S4
Matéria orgânica (%)	12	5	14	14
pH	6,10	6,43	5,87	6,03
H + Al (mmol L ⁻¹)	34	12	38	38
Saturação por bases (%)	72	74	18	21
K (mmol L ⁻¹)	15	5	3	3
Ca (mmol L ⁻¹)	50	27	60	63
Mg (mmol L ⁻¹)	19	6	10	12
P (mmol L ⁻¹)	4	1	3	4

Tabela A2. Pontuação de ajuste e valores de RMSD comparando o HAE cristalizado e recolocado obtido empregando as quatro funções de pontuação diferentes de *Gold*[®] software.

PDB	ChemPLP		GoldScore		ChemScore		ASP	
	Fit score	RMSD	Fit score	RMSD	Fit score	RMSD	Fit score	RMSD
4H9M	34,61	0,212	22,07	0,67	27,66	0,277	21,10	0,286

Tabela A3 – Características analíticas de cada parâmetro otimizado durante o desenvolvimento do método para determinação da atividade da urease pelo UrePAD ($n = 6$).

Nível	Sensibilidade normalizada (%)	¹ RSD (%)	Branco analítico (u. a.)	² RSD (%)	r
Ordem de adição das soluções					
A	41,4	15,3	60,4	8,6	0,738
B	53,1	5,4	74,8	6,9	0,963
C	74,6	5,1	95,6	6,2	0,967
D	57,4	10,0	70,8	12,9	0,879
E	54,9	9,6	97,9	7,4	0,888
F	100	1,3	110	11,4	0,997
Volume de cada solução / μ L					
1,5	22,5	9,7	127	0,1	0,856
1,0	97,8	7,1	128	5,7	0,919
0,8	93,8	4,6	116	12,6	0,965
0,6	100	11,7	95,8	3,7	0,798
0,5	86,9	8,8	88,4	1,6	0,880
Tempo / min					
20	100	1,2	155	9,1	0,983
30	51,9	1,7	85,5	9,3	0,965
40	58,4	2,5	60,6	4,1	0,973
Concentração do indicador / % (m/v)					
0,050	98,2	2,9	137	0,8	0,972
0,025	100	1,2	98,5	2,8	0,986
0,013	71,5	6,1	68,2	2,5	0,885
pH inicial					
6,8	100	1,6	167	9	0,993
6,6	96,4	2,9	137	0,8	0,972
6,4	85,3	1,5	144	7	0,994
6,2	85,9	4,3	122	1	0,942

6,0	80,3	2,5	125	5	0,979
5,5	83,1	1,3	153	4	0,993
5,0	79,7	5,9	129	3	0,894
Tipo de tampão					
Fosfato	84,9	4,4	36,3	2,9	0,967
Citrato	100	14,9	44,7	6,0	0,749
MOPS	98,4	8,3	69,2	5,4	0,889
Concentração do tampão / mM					
0,5	100	1,7	87,7	0,1	0,969
1,0	89,3	0,9	101	5	0,992
1,5	66,2	3,9	128	4	0,878
Concentração da ureia / mM					
10	79,3	3,81	78,9	9,4	0,965
5,0	100	3,75	36,3	2,9	0,966
2,5	51,6	5,78	83,1	10,8	0,909
1,0	42,6	1,87	72,6	21,9	0,978
0,1	42,6	9,55	38,0	7,1	0,843

¹RSD da sensibilidade normalizada (%) // ²RSD do branco analítico.

Tabela A4. Valores médios de intensidade de cor normalizados (%) para os diferentes indicadores na ausência e na presença dos modificadores PSS e PVP. Condição: Urease 3 U mL⁻¹, tampão fosfato de sódio 0,5 mM, pH = 6,5 para PR, BTB, mCP e NR. tampão acetato de sódio 0,5 mM, pH = 5,5 para BCP.

Sistema PR	Intensidade média normalizada (%)			
	Tempo (min) ^{1,2}			
	5	7	10	20
SNM	93,6 ± 3,2 ^{a,*}	90,5 ± 1,3 ^{a,*}	79,7 ± 1,3 ^{a,**}	64,4 ± 1,4 ^{a,***}
PSS	100 ± 1 ^{b,*}	98,9 ± 0,7 ^{b,*}	86,6 ± 0,8 ^{b,**}	67,7 ± 1,4 ^{a,***}
PVP	96,5 ± 3,1 ^{a,*}	93,3 ± 4,9 ^{a,*}	79,4 ± 0,9 ^{a,**}	62,9 ± 1,5 ^{a,***}
Sistema BTB				
SNM	74,7 ± 3,7 ^{a,*}	63,8 ± 2,9 ^{a,**}	51,6 ± 3,3 ^{a,***}	45,1 ± 1,8 ^{a,****}
PSS	100 ± 2,9 ^{b,*}	92,9 ± 2,7 ^{b,**}	87,1 ± 3,8 ^{b,**}	69,3 ± 4,4 ^{b,***}
PVP	92,1 ± 2,4 ^{c,*}	78,1 ± 2,4 ^{c,**}	70,5 ± 2,7 ^{c,***}	64,0 ± 1,2 ^{b,****}
Sistema BCP				
SNM	89,4 ± 0,8 ^{a,*}	81,2 ± 0,8 ^{a,**}	74,2 ± 1,1 ^{a,***}	69,6 ± 0,7 ^{a,***}
PSS	100 ± 2,5 ^{b,*}	91,4 ± 2,3 ^{b,**}	84,5 ± 2,3 ^{b,***}	77,0 ± 1,8 ^{b,***}
PVP	90,2 ± 1,9 ^{a,*}	84,2 ± 1,2 ^{c,**}	75,8 ± 1,4 ^{a,***}	70,5 ± 0,51 ^{a,***}
Sistema mCP				
SNM	76,1 ± 4,3 ^{a,*}	76,0 ± 3,5 ^{a,*}	71,6 ± 2,4 ^{a,*}	69,2 ± 2,5 ^{a,*}
PSS	100 ± 6,7 ^{b,*}	94,1 ± 1,8 ^{b,*}	87,4 ± 3,4 ^{b,**}	77,7 ± 4,0 ^{b,***}
PVP	80,0 ± 1,6 ^{c,*}	78,3 ± 0,7 ^{a,*}	73,8 ± 1,6 ^{a,**}	70,7 ± 0,8 ^{a,***}
Sistema NR				
SNM	76,8 ± 3,2 ^{a,*}	66,7 ± 3,3 ^{a,**}	58,9 ± 2,3 ^{a,***}	58,3 ± 2,7 ^{a,***}
PSS	100 ± 5,7 ^{b,*}	94,2 ± 2,0 ^{b,*}	85,6 ± 3,3 ^{b,**}	79,9 ± 1,4 ^{b,***}
PVP	93,2 ± 1,7 ^{b,*}	83,8 ± 2,0 ^{c,**}	76,6 ± 1,6 ^{c,***}	75,0 ± 2,3 ^{c,***}

Legenda: ¹Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os valores em relação aos sistemas de modificação de superfície, enquanto ²os asteriscos (*) indicam que não há diferença estatística entre os valores do tempo para a mesma modificação. Para avaliação estatística dos resultados se empregou ANOVA *one-way* (95% de confiança).

Tabela A5 – Comparação da sensibilidade das curvas analíticas empregando tampão e saliva sintética.

Indicador	Tampão		Saliva sintética		
	Sensibilidade	<i>r</i>	Sensibilidade	<i>r</i>	<i>p</i> valor
PR	11,62 ± 0,91	0,9879	10,33 ± 1,09	0,9782	0,177
BTB	9,51 ± 0,51	0,9942	9,03 ± 1,10	0,9722	0,525
<i>m</i> CP	8,3 ± 0,50	0,9927	8,39 ± 0,78	0,9832	0,806
NR	9,03 ± 0,98	0,9773	7,97 ± 1,19	0,9581	0,262

Fonte: elaborado pela autora, 2022.

$p > \alpha = 0,05$ indica que não há diferença significativa entre os valores para o mesmo indicador (teste simples *t*-Student 95% de confiança).

Tabela A6 – Valores médios da variação de intensidade de cor para as amostras de saliva *H. pylori* positivo (HP+) e *H. pylori* negativo (HP-) empregando o Multicolor PAD: PR, BTB, *m*CP e NR. Condições: ureia 80 mM, indicador 2 mM, diluição em tampão fosfato de sódio 0.5 mM pH 6.5.

Amostra	Variação da intensidade de cor (u.a.)			
	Indicador ácido-base			
	PR	BTB	<i>m</i> CP	NR
HP+	14,2 ± 1,3 ^a	15,6 ± 2,9 ^a	14,3 ± 2,3 ^a	12,0 ± 1,2 ^a
HP-(1)	7,6 ± 2,3 ^b	6,0 ± 1,9 ^b	6,2 ± 2,0 ^b	9,5 ± 0,8 ^b
HP-(2)	7,3 ± 2,0 ^b	7,9 ± 1,8 ^b	9,4 ± 0,7 ^b	8,7 ± 0,9 ^b
<i>p</i> HP+/HP-(1)	0,014	0,005	0,004	0,045
<i>p</i> HP+/HP-(2)	0,012	0,014	0,036	0,013
<i>p</i> HP-(1)/HP-(2)	0,98	0,58	0,15	0,55

Legenda: ¹Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os valores em relação às amostras de saliva para o mesmo indicador. Para avaliação estatística dos resultados se empregou ANOVA *one-way* (95% de confiança) e Teste de Tukey para comparação de médias.

ANEXO 2

FIGURA A1 - (A) Gráficos de RMSD e (B) RMSF para os átomos C α do esqueleto, e (C) Gráficos de R $_g$ da Jack bean urease complexada com derivados de benzoiltioureia. (D) Gráficos SASA de Jack bean urease e (E) ligantes complexados. (F) O número médio de ligações de hidrogênio entre a Jack bean urease e os ligantes. **BTU1** (preto), **BTU2** (vermelho), **BTU3** (verde), **BTU4** (azul) e **BTU5** (amarelo).

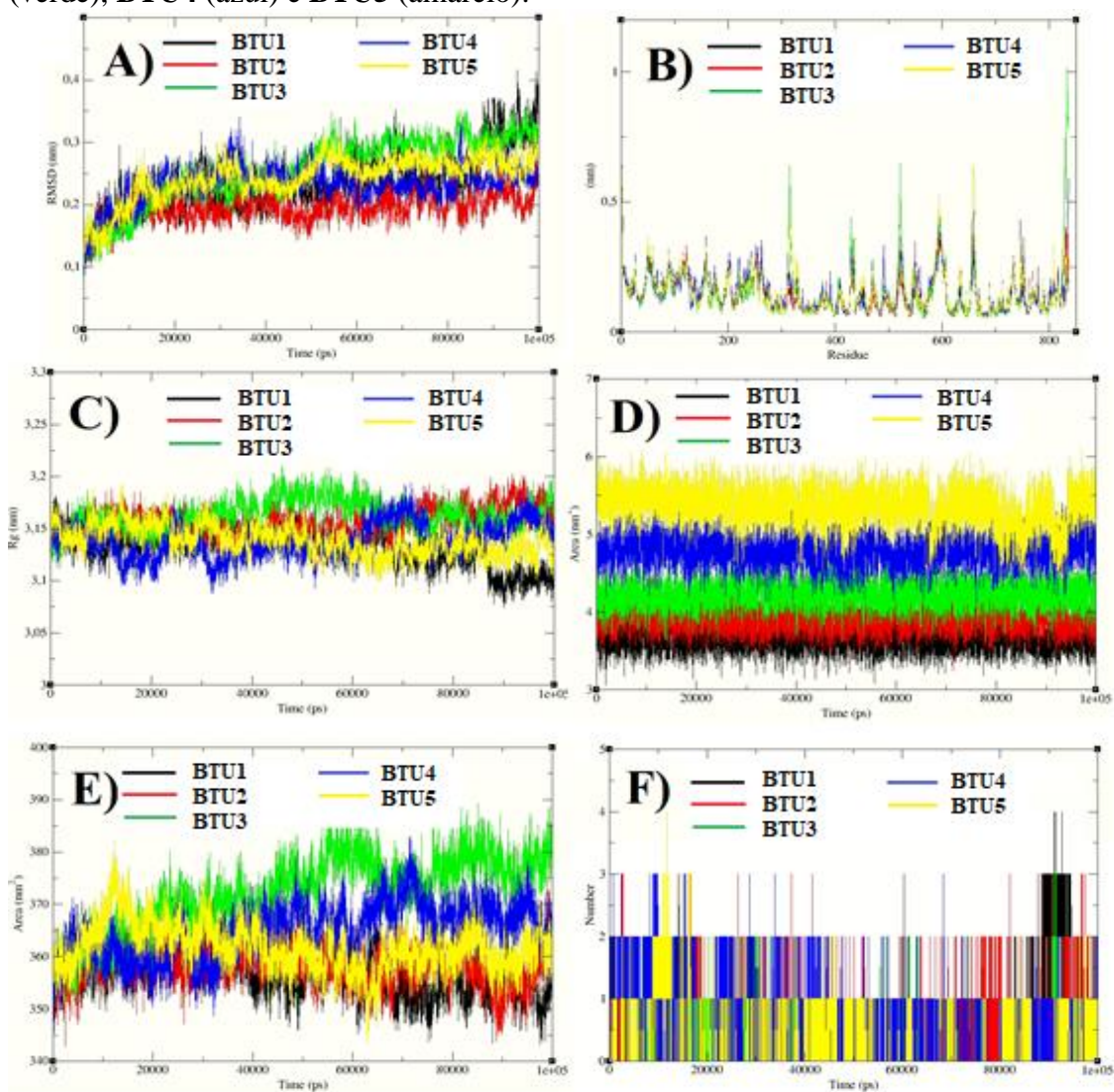


FIGURA A2 – Intensidade de cor média obtida para cada canal de cor (CMYK, ciano, magenta, amarelo, preto, RGB, vermelho, verde, azul e índice) para os cinco indicadores ácido base. Condições: Urease 0 – 5 U mL⁻¹, Ureia 20 mM, Indicador = 1 mM, tampão fosfato de sódio 0,5 mM, pH = 6,0.

