

## DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO DE COMPOSTOS DERIVADOS DO EUGENOL NA ATIVIDADE DE CISTEÍNO PROTEASES DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

Pâmela Moraes e Silva<sup>1</sup>; Márcia Paranho Veloso<sup>2</sup>; Wagner Alves de Souza Júdice<sup>3</sup>

1. Estudante do curso de Engenharia Química; e-mail: pamellamoraes.silva@hotmail.com
2. Professor e Pesquisador da Unifal; e-mail: mparanho@gmail.com
3. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagnerjudice@gmail.com

Área de conhecimento: **Enzimologia**

**Palavras-chave:** Leishmaniose; cisteíno proteases; eugenol.

### INTRODUÇÃO

A espécie *Leishmania* possuem enzimas da classe das cisteíno proteases (CP) essenciais para o crescimento e à viabilidade celular do parasito, as quais alvos no desenvolvimento de novos fármacos (NORTH, COOMBS, 1981; ROBERTSON, COOMBS, 1996). As CPs são encontradas em diferentes espécies de *Leishmania*, e na *L. mexicana* há três classes de CP designadas CPA e CPB, ambas catepsina-L símile, e CPC, uma catepsina-B símile. Dessa forma a modulação da atividade enzimática dessas proteases pode implicar no controle de infectividade e patogenicidade do parasito no hospedeiro (AZIZI et al., 2009; JUDICE et al., 2013; MOTTRAM et al., 1997). O gene CPB2.8 compreende 14 cópias e a enzima CPB2.8 é a principal e a abundante sendo estágio-regulada. Ela apresenta os aminoácidos His<sup>18</sup>, Asn<sup>60</sup>, Asp<sup>61</sup> e Asp<sup>64</sup>; a CPB3.0 possui His<sup>18</sup>, Asp<sup>60</sup>, Asn<sup>61</sup> e Ser<sup>64</sup>; e a CPB18, contém Tyr<sup>18</sup>, Asp<sup>60</sup>, Asn<sup>61</sup> e Ser<sup>64</sup> (JUDICE et al., 2004). Compostos morfolínicos derivados de eugenol tem sido considerado como possíveis protótipos de fármacos leishmanicidas (HUANG et al., 2015; MODJINO et al., 2016; PEREIRA; MENDES; LIMA, 2013).

### OBJETIVO

Efetuar a caracterização de compostos morfolínicos derivados do eugenol na atividade das proteases rCPB2.8, rCPB3.0 e rH84Y recombinantes de *L. mexicana*.

### METODOLOGIA

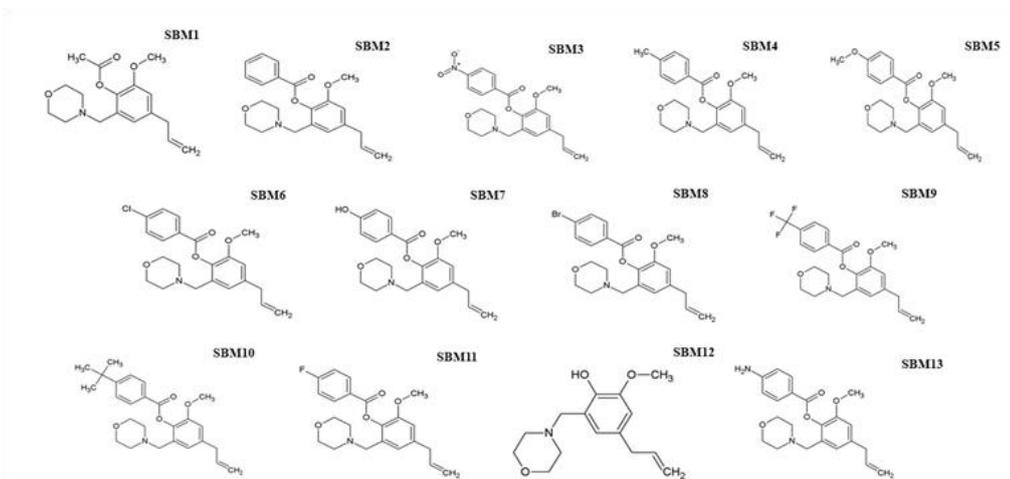
#### Ensaio enzimáticos de triagem de atividade inibitória

Compostos morfolínicos derivados do eugenol (**Figura 1**) foram avaliados como inibidores nas concentrações de 10 $\mu$ M e 100 $\mu$ M, sobre as enzimas rCPB2.8, rCPB3.0 e rH84Y em tampão acetato de sódio 100 mM, glicerol a 20%, triton X-100 a 0,01%, pH 5,5, 3mM de DTT a 37°C. Monitoramos a atividade enzimática por espectrofluorimetria utilizando substrato Z-FR-MCA nos  $\lambda$ Ex=360nm e  $\lambda$ Em=480nm.

### Ensaio cinéticos e determinação do potencial inibitório IC<sub>50</sub>

As inibições das enzimas foram realizados em concentrações crescentes dos composto usando o mesmo tampão mencionado. Os dados foram avaliados por regressão não-linear (equação 1) e o IC<sub>50</sub> determinado em programa Grafit 5.0.13.

$$y = \frac{100\%}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^s} \quad \text{Eq 1.}$$



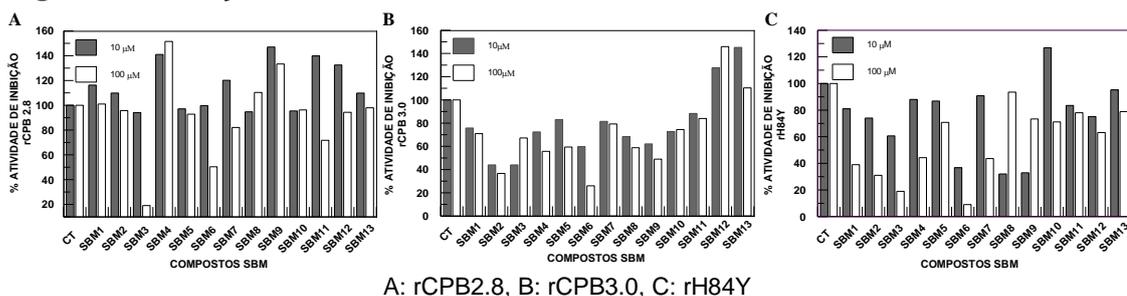
### RESULTADOS E DISCUSSÃO

O composto base SBM12 (morfolina do eugenol) apresentou baixo efeito inibitório sobre as enzimas. Substituições *para* no ácido benzóico ligado ao eugenol alterou a seletividade dos compostos.

Os compostos SBM3 (*para*NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), SBM6 (*para*Cl<sup>-</sup>) e SBM11 (*para*F<sup>-</sup>) inibiram a rCPB2.8 em 90%, 50% e 30% respectivamente (**Figura 2A**). Os compostos SBM4, SBM9, SBM11, SBM12 ativaram a rCPB2.8 com possível interação alostérica.

Os compostos SBM2 (sem ligante *para*), SBM3, SBM4 (*para*CH<sub>3</sub>), SBM5 (*para*OCH<sub>3</sub>), SBM6, SBM8 (*para*Br<sup>-</sup>) e SBM9 (*para*CF<sub>3</sub><sup>-</sup>) apresentaram inibição da rCPB3.0 em 65%, 35%, 45%, 40%, 75%, 40% e 50%, respectivamente e SBM12 e SBM13 promoveram ativação (**Figura 2B**).

**Figura 2:** Avaliação da atividade inibitória sobre a enzima rCPB2.8, rCPB3.0 e rH84Y



Evidenciou-se maior número de moléculas na inibição da rH84Y (**Figura 2C**): SBM1 (*para*CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>), SBM2, SBM3, SBM4, SBM5, SBM6 e SBM7 (*para*Hidroxil) com redução da atividade em 60%, 70%, 85%, 55%, 30%, 90% e 55%, respectivamente, contudo SBM10 promoveu ativação.

Foram selecionadas as moléculas SBM3, SBM6 e SBM11 para a enzima rCPB2.8; SBM2, SBM3, SBM4, SBM5, SBM6, SBM8 e SBM9 para a enzima rCPB3.0; SBM1, SBM2, SBM3, SBM4, SBM6 e SBM7 para a rH84Y para determinação do IC<sub>50</sub> (**Tabela 1**).

O SBM3, contendo nitrogênio com carga formal positiva no grupamento nitro, e o SBM11 apresentando átomo de flúor de maior eletronegatividade, foram os mais efetivos na inibição da rCPB2.8. O composto SBM6, que apresenta o cloro (menos eletronegativo que o flúor) apresentou IC<sub>50</sub>=23,3±0,9μM, enquanto SBM3 e SBM11 apresentaram IC<sub>50</sub> de 1,7±0,05μM e 1,7±0,06μM, respectivamente (**Tabela 1**).

**Tabela 1:** Potencial inibitório IC<sub>50</sub> na modulação da atividade enzimática da rCPB2.8, rCPB3.0 e rH84Y.

Composto	IC <sub>50</sub> (μM)		
	rCPB2.8	rCPB3.0	rH84Y
SBM1	-	-	31,4 ± 0,9
SBM2	-	23,8 ± 0,8	7,8 ± 0,15
SBM3	1,7 ± 0,05	3,77 ± 0,2	6,07 ± 0,13
SBM4	-	25,0 ± 0,45	41,6 ± 2,5
SBM5	-	30,34 ± 0,6	-
SBM6	23,3 ± 0,9	11,96 ± 0,2	19,0 ± 0,3
SBM7	-	-	21,1 ± 0,6
SBM8	-	18,23 ± 0,35	-
SBM9	-	1,87 ± 0,07	-
SBM11	1,7 ± 0,06	-	-

Os compostos SBM3 e o SBM9, possuindo trifluorometil como substituinte no anel, foram mais efetivos na inibição da enzima rCPB3.0 com IC<sub>50</sub>=3,77±0,2μM e IC<sub>50</sub>=1,87±0,07μM. SBM2, SBM4, SBM5, SBM6 e SBM8 foram menos eficientes com IC<sub>50</sub> acima de 11μM (**Tabela 1**). As isoformas CPB2.8 e CPB3.0 (Judice *et al.*, 2004), apresentam variações nas posições 60, 61 e 64, resultando em diferenças na distribuição de cargas e modificações do potencial eletrostático ocasionando as diferenças de IC<sub>50</sub> do SBM3 sobre a rCPB2.8 (IC<sub>50</sub>=1,7±0,05μM) e rCPB3.0 (IC<sub>50</sub>=3,77±0,2μM); e para o SBM6 sobre rCPB2.8 (IC<sub>50</sub>=23,3±0,9μM) e rCPB3.0 (IC<sub>50</sub>=11,96±0,2μM). As substituições na rCPB2.8 gerando a rH84Y modificou a seletividade aos compostos interferindo no IC<sub>50</sub> (**Tabela 1**). SBM3 inibiu a rH84Y com IC<sub>50</sub>=6,07±0,13μM e o SBM2 (sem ligante no anel) apresentou IC<sub>50</sub>=7,8±0,15μM. Os compostos SBM1, SBM4, SBM6 e SBM7, comparados aos SBM2 e SBM3 foram menos eficientes com IC<sub>50</sub> acima de 19μM (**Tabela 1**). O SBM11 sobre a rCPB2.8 e SBM9 sobre a rCPB3.0 apresentaram IC<sub>50</sub> abaixo de 2μM (**Tabela 1**). SBM3 contendo nitrobenzeno o qual é tóxico e carcinogênico (Kovacic e Somanathan, 2014) poderá ser tóxico. A série em estudo apresenta caráter básico podendo atuar como *peptide-like* devido ao grupo éster de carbonila com carbono de baixa densidade eletrônica possibilitando a interação com a Cys<sup>25</sup> reativa. A possível interação da rCPB2.8 com grupamentos carregados positivamente (Gillmor, Craik e Fletterick, 1997) talvez deve-se ao Glu<sup>205</sup>, possível responsável pela afinidade do SBM3, que contém grupo nitro de carga positiva. A presença do átomo de maior eletronegatividade, o flúor, e receptor de ligação de hidrogênio, levou a uma boa atividade inibitória do composto SBM11 sobre a rCPB2.8.

## CONCLUSÃO

Os compostos SBM3, SBM11 se mostraram os mais efetivos na inibição a rCPB2.8 e o SBM3 e SBM9 para a rCPB3.0.

Dessa forma, SBM3 e SBM11 se tornam candidatos antileishmanias, sendo necessário estudo complementar *in vitro* para entendimento do mecanismo de inibição das cisteíno proteases de *Leishmania mexicana*, por esta classe de compostos.

## REFERÊNCIAS

AZIZI, H. et al. Searching for virulence factors in the non-pathogenic parasite to humans *Leishmania tarentolae*. **Parasitology**, Inglaterra, v. 136, n. 7, p. 723-735, 2009.

GILLMOR S.A.; CRAIK C.S.; FLETTERICK R.J. Structural determinants of specificity in the cysteine protease cruzain. **Protein Science**, v. 6, n. 8, p. 1603-1611, 1997

HUANG, X. et al. Anti-inflammatory effects of eugenol on lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction in acute lung injury via regulating inflammation and redox status. **International Immunopharmacology**, Estados Unidos da América, v. 26, n. 1, p. 265-271, 2015.

JUDICE, W.A.; MOTTRAM, J.C.; COOMBS, G.H.; JULIANO MA, JULIANO L. Specific negative charges in cysteine protease isoforms of *Leishmania mexicana* are highly influential on the substrate binding and hydrolysis. **Molecular and Biochemical Parasitology Journal**, v. 144, n. 1, p. 36-43, 2005.

KOVACIC, P; SOMANATHAN, R. Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism. **Journal of Applied Toxicology**, Estados Unidos da América, v. 34, n. 8, p. 810-824, 2014.

MODJINO, T. et al. Antibacterial and antioxidant bio-based networks derived from eugenol using photo-activated thiol-ene reaction. **Reactive and Functional Polymers**, Japão, v. 101, P. 47-53, 2016

MOTTRAM, J. C. et al. The Multiple cpb Cysteine Proteinase Genes of *Leishmania mexicana* Encode Isoenzymes That Differ in Their Stage Regulation and Substrate Preferences. **The Journal of Biological Chemistry**, Estados Unidos da América, v. 272, n. 22, p. 14285-14293, 1997

NORTH, M. J.; COOMBS, G. H. Proteinases of *Leishmania mexicana* amastigotes and promastigotes: analysis by gel electrophoresis. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 3, n. 5, p. 293-300, 1981.

PEREIRA, F. O.; MENDES, J. M.; LIMA, E. O. Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum*. **Medical Mycology**, Inglaterra, v. 51, n. 5, 2013.

ROBERTSON, C. D.; COOMBS, G. H. ;NORTH, M. J.; MOTTRAM, J. C. Parasite cysteine proteinases. **Perspectives in Drug Discovery and Design**, v. 6, p.99-118, 1996.