

# EFEITOS DE COMPOSTOS DERIVADOS DO EUGENOL E AMINOFENILIDRAZINA NA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE CISTEÍNO PROTEASES DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

Juliana Fortes Di Iorio<sup>1</sup>; Caroline Barbosa Gama<sup>2</sup>; Diogo Teixeira Carvalho<sup>3</sup>; Wagner Alves de Souza Júdice<sup>4</sup>

Estudante do Curso de Biomedicina; e-mail: ju-fortes1@hotmail.com<sup>1</sup>

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: carollbg7@gmail.com<sup>2</sup>

Professor da Universidade Federal de Alfenas; e-mail: diogotcarv@gmail.com<sup>3</sup>

Professor da Universidade Mogi das Cruzes; e-mail: wagneras@umc.br<sup>4</sup>

Área do Conhecimento: Enzimologia

Palavras-chave: Eugenol; Aminofenilidrazina, cisteíno proteases, *Leishmania mexicana*

## INTRODUÇÃO

As cisteíno proteases atuam no metabolismo proteico celular, degradação de proteínas de matriz celular e estão envolvidas em muitas doenças (MORT, BUTTLE, 1997). A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por um protozoário, e este possui duas formas, a amastigota encontrada nas células do hospedeiro e a promastigota que habita o hospedeiro invertebrado (REY, 2008). Na *Leishmania mexicana* há uma maior atividade de cisteíno proteases na forma amastigota de mamíferos do que na forma promastigota do vetor tornando-as alvos no desenvolvimento de drogas anti-leishmanioses (ROBERTSON, COOMBS, 1992). Eugenol (4-alil-2-metoxifenol) é um agente flavorizante em cosméticos e produtos alimentícios e apresenta muitas propriedades medicinais como antiespasmódico, antipirético, anti-inflamatório e atividade antibactericida (MOLEYAR E NARASIMHAM, 1992). Fenilidrazinas e hidrazinas, bem como produtos naturais contendo hidrazina, foram relatados como tendo atividade antineoplásica (TOTH, 1996, 2000).

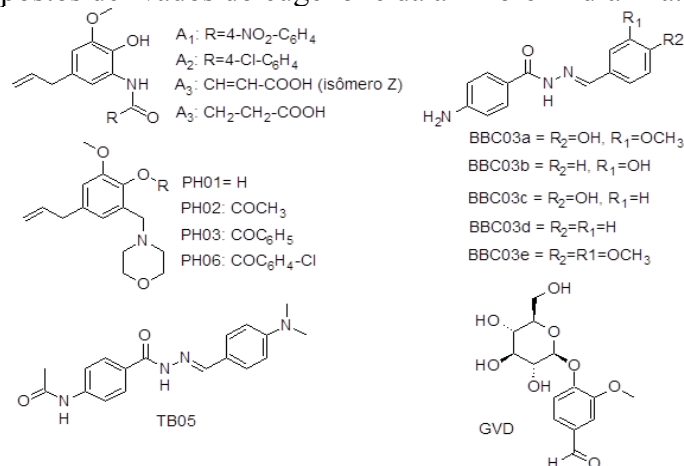
## OBJETIVOS

Avaliar a atividade de compostos derivados do eugenol e fenilidrazinas sobre as cisteíno proteases de tripanossomatídeos rCPB2.8, rCPB30 e rH84Y envolvidas como fatores de virulência na leishmaniose.

## METODOLOGIA

Realizou-se a triagem em duas concentrações (10 $\mu$ M e 100 $\mu$ M) de 15 moléculas derivados do eugenol e fenilidrazinas (**Figura 1**). Para triagem realizou-se os ensaios enzimáticos em tampão acetato de sódio 100mM, acrescido de glicerol 20%, triton X-100 0,04%, DTT 5mM, pH 5,5 com pré-ativação por 5 min a 37°C. A atividade das enzimas foi seguida nos  $\lambda_{Ex}=360\text{nm}$  e  $\lambda_{Em}=480\text{nm}$  em espectrofluorímetro Hitachi-F2700, cubeta de quartzo (1mL) utilizando como substrato Z-FR-MCA. Na determinação do potencial inibitório IC<sub>50</sub> utilizou-se concentrações crescentes dos compostos e o IC<sub>50</sub> determinado por regressão não-linear utilizando o programa Grafit 5.0.

**Figura 1** – Compostos derivados do eugenol e da aminofenilidrazina.

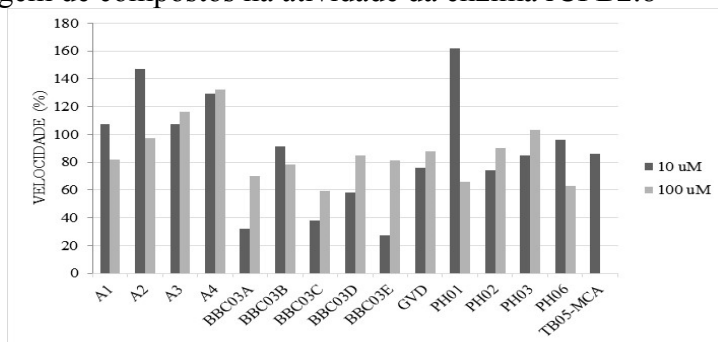


**Amidas do amino Eugenol:** A1: derivado 4-nitrobenzoílico; A2: derivado 4-clorobenzoílico; A3: derivado maleâmico; A4: derivado succinâmico. **Bases de Mannich do eugenol:** PH01: Hidroxilada, PH02: O-acetila, PH03: O-benzoílica, PH06: O-clorobenzoílica. **Acilidrazonas da 4-aminofenilidrazina:** BBC03A: derivada de vanilina, BBC03B: derivada de 3-hidroxibenzaldeído, BBC03C: derivada de 4-hidroxibenzaldeído, BBC03D: derivada de benzaldeído, BBC03E: derivada de 3,4-dimetoxibenzaldeído. TB05: Acilidrazona da 4-acetilaminofenilidrazina com *N,N*-dimetilaminobenzaldeído, GVD: Glicosídeo de vanilina desacetilado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

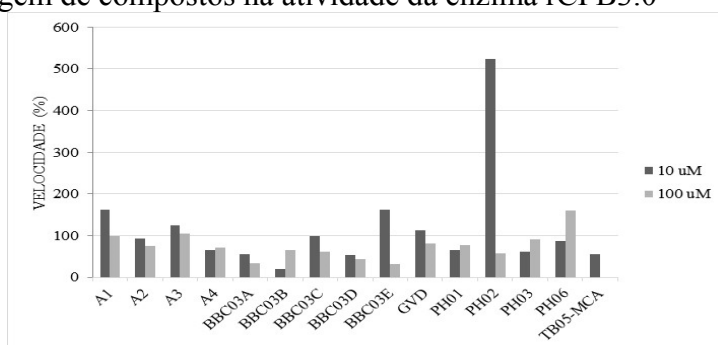
A triagem de atividade dos compostos sobre as cisteíno proteases de *L. mexicana* mostraram que vários compostos apresentaram comportamento de ativação enzimática. Contudo esse comportamento de ativação não se repetia para todas as enzimas. Isso denota que as modificações estruturais entre as diferentes isoformas interferiram nos processos.

**Figura 2** - Triagem de compostos na atividade da enzima rCPB2.8



Avaliando a capacidade de inibição da rCPB2.8 pelas moléculas analisadas, verificamos que os compostos mais efetivos na concentração de 10 $\mu\text{M}$  foram BB03A, BB03C e BB03E inibindo a rCPB2.8 em mais de 50%. Contudo, observamos para essas três moléculas ação de ativação enzimática na concentração de 100 $\mu\text{M}$ . Além disso, nenhuma das moléculas testadas foi capaz de inibir em mais de 50% a 100 $\mu\text{M}$  (**Figura 2**). De forma geral a substituição de  $\text{NO}_2$  (A1) por cloreto (A2) em R (substituinte) aumentou o efeito de ativação e a presença de hidroxila em  $R_2$  ou metoxi em  $R_1$  e  $R_2$  favoreceu o efeito inibitório pela BBC03 em relação à rCPB2.8 a 10uM. Os efeitos observados podem estar relacionados inicialmente à ligação dessas moléculas a sítios alostéricos promovendo modificações estruturais na proteína aumentando a catálise.

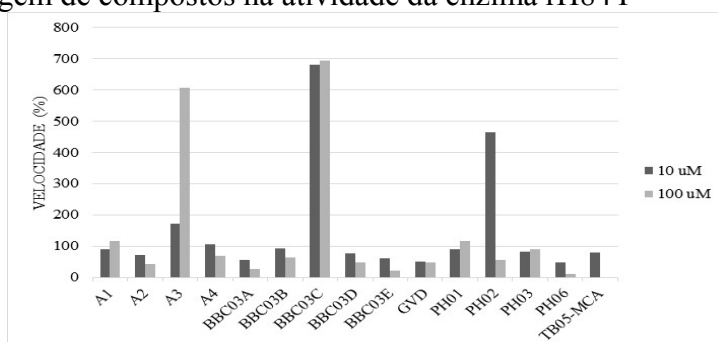
**Figura 3** - Triagem de compostos na atividade da enzima rCPB3.0



Em relação aos dados observados nos ensaios de triagem sobre a enzima rCPB3.0 (**Figura 3**), verificamos que as moléculas A1, A3, BC03E, GVD e PH02 ativaram esta enzima a 10 $\mu$ M. Inibição acima de 50% foi verificada apenas por ação do composto BBC03B em 10 $\mu$ M, porém a 100 $\mu$ M as moléculas BBC03A, BBC03D e BBC03E apresentaram esse efeito. O que chama a atenção é a ação da molécula PH02 contendo grupo *O*-acetila em R, pois ativou em 524% a 10 $\mu$ M e inibiu 42% a 100 $\mu$ M.

Analisando a atividade dos compostos sobre a enzima rH84Y (**Figura 4**) verificamos que o derivado maleâmico A3 foi muito mais eficiente em ativar na concentração de 100 $\mu$ M. Por outro lado a molécula BBC03C com OH em R<sub>2</sub> e H em R<sub>1</sub> promoveu grande ativação tanto em 10 $\mu$ M quanto em 100 $\mu$ M, próximo de 700% e a PH02 ativou em 10 $\mu$ M e inibiu em 100 $\mu$ M modificando de uma ativação de 464% para uma inibição de 46%.

**Figura 4** - Triagem de compostos na atividade da enzima rH84Y



Os compostos que inibiram a rH84Y a mais de 50% foram a GVD (Glicosídeo de vanilina desacetilado) e PH06 (derivado 4-clorobenzoílico em R) a 10 $\mu$ M. A 100 $\mu$ M foram as moléculas A2 (derivado *O*-clorobenzoílico), BBC03A (derivado de vanilina), BBC03D (derivado de benzaldeído), BBC03E (derivado de 3,4-dimetoxibenzaldeído), GVD (Glicosídeo de vanilina desacetilado) e PH06 (derivado *O*-clorobenzoílico).

A rCPB2.8 contém os resíduos Asn<sup>60</sup>, Asp<sup>61</sup> e Asp<sup>64</sup>; rCPB3.0 apresenta três resíduos variantes Asp<sup>60</sup>, Asn<sup>61</sup> e Ser<sup>64</sup> e a isoforma mutante rH84Y tem a mutação no resíduo His<sup>84</sup> para Tyr (JUDICE et al, 2005). Essas modificações foram suficientes para modificar a interação enzima/ligante uma vez que o mesmo inibidor apresentou diferentes efeitos para cada enzima. A partir dos resultados da triagem realizou-se os ensaios para determinação do potencial inibitório IC<sub>50</sub>. Para a rCPB2.8 foram selecionados os compostos BBC03A, BBC03C e BBC03E os quais apresentaram os valores de IC<sub>50</sub> de 1,48 $\pm$ 0,07 $\mu$ M, 2,98 $\pm$ 0,09 $\mu$ M e 1,29 $\pm$ 0,06 $\mu$ M, respectivamente. Em relação à rCPB3.0 realizou-se o procedimento com os compostos BBC03A, BBC03B e BBC03D, obtendo-se os valores de IC<sub>50</sub> 1,87 $\pm$ 0,06 $\mu$ M, 8,57 $\pm$ 0,25 $\mu$ M,

5,05±0,20µM. Para a rH84Y avaliaram-se o potencial inibitório para PH06, BBC03E e GVD, obtendo-se os valores de IC<sub>50</sub> de 3,3±0,1µM, 0,87±0,05µM, 2,34±0,04µM.

Os resíduos catalíticos ((resíduos da *L. mexicana* Cys<sup>25</sup>, His<sup>163</sup> e Asn<sup>183</sup>) e os subsítios S<sub>1</sub> e S'<sub>1</sub> são altamente conservados entre as três espécies de parasitas (*L. mexicana*, *L. major* e *T. cruzi*) e os resíduos chaves para os três principais subsítios são completamente conservados entre as isoformas CPB de *L. mexicana* e a homóloga *L. major*. Conseqüentemente, diferenças nas atividades entre as isoenzimas CPB de *L. mexicana* deve estar associada com variações de aminoácidos em posições mais periférica da proteína (JULIANO et al, 2004). Essas informações vão ao encontro aos dados obtidos uma vez que foram observadas grandes alterações de inibição principalmente na rH84Y.

## CONCLUSÕES

Os compostos da série das amidas do amino Eugenol (A1-A4) compreende moléculas de baixa ação inibitória sobre as proteases estudadas. Somente o composto A2 apresentou uma inibição satisfatória, entretanto à 100µM para a rH84Y. Assim, pequenas mudanças nos aminoácidos interferiram no processo de inibição.

A série das acilidrazonas da 4-aminofenilidrazina (BBC03) constitui o grupo com maior número de moléculas efetivas na inibição das enzimas, contudo o BBC03C mostrou-se ser um potente ativador da rH84Y.

Estudos de mecanismo de ação, determinação de *K<sub>i</sub>* e modelagem molecular serão os próximos passos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

JUDICE, W. A.; MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H. ; et al. Specific negative charges in cysteine protease isoforms of *Leishmania mexicana* are highly influential on the substrate binding and hydrolysis. *Molecular and Biochemical Parasitology* (Print), 144(1), 36-43, 2005.

JULIANO MA, BROOKS DR, SELZER PM, PANDOLFO HL, JUDICE WA, JULIANO L, MELDAL M, SANDERSON SJ, MOTTRAM JC, COOMBS GH. Differences in substrate specificities between cysteine protease CPB isoforms of *Leishmania mexicana* are mediated by a few amino acid changes. *Eur J Biochem*, 271(18), 3704-3714, 2004.

MOLEYAR, V.; NARASIMHAM, P. Antibacterial activity of essential oil components. *Int. J. Food Microbiol.*, 16, 337-342, 1992.

MORT, J.S.; BUTTLE, D.J. Cathepsin B. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Canadá, 29(5), 715-720, 1997.

REY, L. *Parasitologia*. 4<sup>a</sup>ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

ROBERTSON, C. D.; COOMBS, G. H. Stage-specific proteinases of *Leishmania mexicana* promastigotes. *FEMS Microbiol Lett* 94, 127-132, 1992.

TOTH, B. A review of the antineoplastic action of certain hydrazines and hydrazine-containing natural products. *In Vivo* 10, 65-96, 1996.

TOTH, B. *Hydrazines and Cancer. A guidebook on the carcinogenic activities of hydrazines, related chemicals, and hydrazine-containing natural products*. Harwood Academic Publishers, Australia, pp.243, 2000.