

# CARACTERIZAÇÃO DE BENZOFENONAS E BIFLAVONÓIDES COMO INIBIDORES DE CATEPSINAS.

Alex Carvalho Arantes<sup>1</sup>, Marcelo Henrique dos Santos <sup>2</sup>,  
Wagner Alves de Souza Júdice<sup>3</sup>

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: alexicmarantes@hotmail.com<sup>1</sup>

Professor-pesquisador da UNIFAL; marcelo\_hs@yahoo.com.br<sup>2</sup>

Professor-pesquisador da UMC; e-mail: wagnerjudice@gmail.com<sup>3</sup>

**Área de conhecimento:** Enzimologia

**Palavras-chave:** Inibidores, Benzofenonas, Biflavonóides

## INTRODUÇÃO

Catepsinas (Cat) são cisteíno-proteases encontradas nos lisossomos, desempenham papel essencial no organismo participando de processos celulares mais especializados estando envolvida também em processos patológicos como aterosclerose, progressão tumoral, artrite reumatoide, doença de Alzheimer, esclerose múltipla, distrofia muscular além de participarem da apoptose, sendo assim, as catepsinas são alvos para o desenvolvimento de novas drogas (TURK & GUNCAR, 2003; VASILJEVA & TURK, 2008). Dentre as estratégias de desenvolvimento está a busca de moléculas naturais dentre elas as benzofenonas e biflavonóides. Benzofenonas são compostos fenólicos de origem natural produzidas em plantas superiores capazes de inibir cisteíno-proteases entre elas a catepsina B envolvida na progressão tumoral (MARTIS et al, 2009). Flavonóides são substâncias naturais produzidas por várias espécies vegetais, podendo ser encontrados como dímeros flavona-flavona ou flavanona-flavanona denominados biflavonóides os quais possuem propriedades farmacológicas atuando benéficamente no organismo humano sendo utilizadas no desenvolvimento de novos fármacos (BAPTISTA & SIQUEIRA, 1994; YOKOZAWA et al, 1997).

## OBJETIVOS

Nosso objetivo é a caracterização de compostos naturais e semi-sintéticos derivados de benzofenonas e biflavonóides como inibidores de catepsinas.

## METODOLOGIA

Os ensaios de inibição das enzimas catepsinas B, K, L e V foram realizados em tampão acetato de sódio 100mM, com 5mM de EDTA, pH 5,5. Aliquotas das enzimas foram pré-incubadas com DTT 2,5mM durante 5min a 35°C e as atividades enzimáticas seguidas pela medição hidrólise de Z-FR-MCA em  $\lambda_{ex}=360nm$  e  $\lambda_{em} 480nm$ ) em espectrofluorímetro Hitachi-F2500, como descrito previamente (CHAGAS et al, 1990; OLIVEIRA et al, 1992). Os parâmetros cinéticos foram determinados por regressão não linear usando o programa Grafit 5.0 (WILKINSON, 1961).

Os ensaios de inibição das proteases foram similares aos de hidrólise de substratos, entretanto, após a ativação enzimática e medição da atividade inicial das catepsinas, adicionou-se concentrações crescentes de inibidor até a estabilização da redução da atividade enzimática e com os dados coletados calculou-se os valores de IC<sub>50</sub>s.

As catepsinas recombinantes humanas B, K, V e L foram expressas em *Pichia pastoris* de acordo com a metodologia descrita previamente por (LINNEVERS et al, 1997) e gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Dieter Brömme, da University of British Columbia,

Vancouver, Canadá. O substrato Z-FR-MCA foi obtido comercialmente e sua concentração determinada em função da massa molar e volume de solução preparada. Os compostos benzofenonas (CMA, CMB, LFQM113, LFQM114, LFQM115, LFQM119, LFQM120 e LFQM121) e biflavonóides (semi-sintéticos VG1, VG3, VG4, e natural VG0) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos do Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal da Universidade Federal de Alfenas. Os mesmos foram solubilizados em DMSO para concentração estoque de 2mM.

## RESULTADOS/DISCUSSÃO

Analisando os resultados de IC<sub>50</sub> dos ensaios de inibição das catepsinas B, K, L e V, frente os biflavonóides e as benzofenonas observamos que dentre os biflavonóides o mais eficiente para inibir a catálise das catepsinas foi o composto biflavonóide VG0 com IC<sub>50</sub>=13μM para a Cat-B e 11μM para Cat-K e 7,5μM para Cat-V. Por outro lado, o biflavonóide VG3 foi o mais efetivo na inibição da Cat-L com IC<sub>50</sub>=0,90μM (Tabela 1).

**TABELA 1.** Valores de IC<sub>50</sub> de compostos Biflavonóides para inibição das Catepsinas B, K, L e V.

COMPOSTO	IC <sub>50</sub> (μM)			
	CAT B	CAT K	CAT L	CAT V
VG0	13 ± 1	11 ± 1	3,3 ± 0,2	7,5 ± 0,2
VG1	111 ± 15	24 ± 4	2,1 ± 0,1	40 ± 2
VG3	93 ± 6	17 ± 11	0,90 ± 0,01	41 ± 1
VG4	129 ± 10	18 ± 2	2,8 ± 0,2	37 ± 2

Dentre as benzofenonas observamos que os composto LFQM-119 foi o mais efetivo na inibição das Cat-L (IC<sub>50</sub>=1,1μM) e Cat-V (IC<sub>50</sub>=3,1μM). Para as catepsinas B e K, os compostos LFQM-121 e CMA foram os mais potentes com IC<sub>50</sub> de 16μM e 20μM, respectivamente (Tabela 2).

**TABELA 2.** Valores de IC<sub>50</sub> de compostos de Benzofenonas para inibição das Catepsinas B, K, L e V.

COMPOSTO	IC <sub>50</sub> (μM)			
	CAT B	CAT K	CAT L	CAT V
CMA	31 ± 2	20 ± 1	3,1 ± 0,1	8,3 ± 0,5
CMB	42 ± 4	72 ± 2	4,0 ± 0,1	3,3 ± 0,1
LFQM113	30 ± 4	38 ± 5	2,9 ± 0,6	5,0 ± 0,2
LFQM114	56 ± 4	40 ± 5	1,8 ± 0,1	19 ± 1
LFQM115	39 ± 5	82 ± 4	1,6 ± 0,1	28 ± 5
LFQM119	59 ± 5	27 ± 6	1,1 ± 0,1	3,1 ± 0,3
LFQM120	30 ± 3	25 ± 2	3,2 ± 0,2	25 ± 1
LFQM121	16 ± 1	22 ± 3	1,5 ± 0,1	8,7 ± 0,8

## CONCLUSÕES

Cisteíno-proteases estão envolvidas em diversas situações normais e patológicas nos organismos, dentre elas as catepsinas. Nossos resultados mostraram que as catepsinas B, K, L e V foram efetivamente inibidas por compostos naturais e/ou sintéticos benzofenônicos e biflavonoídicos. Em função de nossos resultados iniciais, os compostos biflavonóides VG0 e VG3 e as benzofenonas LFQM-119, LFQM-121 são

potenciais moléculas para o desenvolvimento de novos fármacos na inibição de catepsinas envolvidas em processos patológicos, entretanto, novos estudos são necessários objetivando a determinação dos mecanismos de ação bem como citotoxicidade.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BAPTISTA, M.; SIQUEIRA, J. Efeito de Flavonoides na Germinação de Esporos e no Crescimento Assimbiótico do Fungo Micorrízico Arbuscular *Gigaspora gigantea*. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v.6(2), p.127-134, 1994.

CHAGAS, J.R.; JULIANO, L.; PRADO, E.S. Intramolecularly quenched fluorogenic tetrapeptide substrates for tissue and plasma kallikreins. **Analytical Biochemistry**, v. 192, p.419-425, 1990.

LINNEVERS C. J.; MCGRATH M.E.; ARMSTRONG, R.; MISTRY, F.R.; BARNES, M.G.; KLAUS, J.L.; PALMER, J.T.;KATZ. B.A.; BROMME, D. Expression of human cathepsin K in *Pichia pastoris* and preliminary crystallographic studies of an inhibitor complex. **Protein Science**, v. 6, p 919-921, 1997.

MARTINS, F.T.; ASSIS, D.M.; SANTOS, M.H.; CAMPS, I.; VELOSO, M.P.; JULIANO, M.A.; ALVES, L.C.; DORIGUETTO, A.C. Natural polyprenylated benzophenones inhibiting cysteine and serine proteases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1230–1239, 2009.

OLIVEIRA, M.C.F.; HIRATA, I.Y.; CHAGAS, J.R.; BOSCHCOV, P.; GOMES, R.A.S.; FIGUEIREDO, A.F.S; JULIANO, L. Intramolecularly quenched fluorogenic peptide substrates for human renin. **Analytical Biochemistry**, v. 203, p. 39–46, 1992.

TURK, D.; GUNCAR, G. Lysosomal cysteine protease (cathepsins): promising drug targets. **Acta crys.**, v. D59, p. 203-213, 2003.

VASILJEVA, O.; TURK, B.; Dual contrasting roles of cysteine cathepsins in cancer progression: Apoptosis versus tumour invasion , **Biochimie** v.90, p.380-386, 2008.

YOKOZAWA, T.; DONG, E.; LIU, Z.W.; SHIMIZU, M. Antioxidant activity of flavones and flavonols in vitro. **Phytotherapy Research**. v.11, p. 446-450, 1997.

WILKINSON, G.N. Statistical estimations in enzyme kinetics. **Biochem. J.**, v. 80, p. 324-332, 1961.