



AVALIAÇÃO DE DERIVADOS DE CHALCONAS, FLAVONÓIS E O CARBENOS N-HETEROCÍCLICOS DE OURO (I) COMO POSSÍVEIS INIBIDORES DAS CISTEÍNO PROTEASES DE *LEISHMANIA MEXICANA*

Robson Augusto Massaria Martins Junior ¹, Wagner Alves de Sousa Júdice²

1. Estudante de biomedicina; e-mail: robson.massaria@hotmail.com;
2. Professor da Universidade de Mogi das cruces, e-mail: wagnerjudice@gmail.com.

Área do conhecimento: Enzimologia

Palavra-chave: chalconas, flavanóis, Carbenos N-heterociclicos de ouro (I), cisteino protease, *Leishmania mexicana*.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma patologia negligenciada com elevada incidência mundial, associada a pobreza (DIAS *et al.*, 2013). Segundo a organização mundial da saúde (OMS), ela é classificada como umas das 18 DNT (Doenças tropicais negligenciadas), apresentando um alto grau de mobilidade e mortalidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012, 2017). O agente etiológico dessa patologia é o protozoário *leishmania ssp.* Esse protozoário tem uma variedade de cisteino protease (CP) que possuem uma grande importância para a sobrevivência do protozoário dentro do hospedeiro. O composto utilizado para inibição dessas CP foram os derivados de chalconas que possuem ação anticancerígenas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes e antiparasitárias (HIBA *et al.*, 2021), os compostos derivados de Flavonóis que apresentam atividade leishmanicida e antioxidante (REIS *et al.*, 2013) e os carbenos N-heterociclicos de ouro (I) que possuem diversas atividades biológicas, sendo potenciais agentes quimioterápicos (FAROOQ *et al.*, 2015).

OBJETIVOS

Avaliar compostos derivados de chalconas, Flavonóis e carbenos N-heterocíclicos de ouro (I) como possíveis inibidores da atividade catalítica das cisteíno proteases recombinantes de *Leishmania mexicana* rCPB2.8, rCPB3.0 e rH84Y.

METODOLOGIA

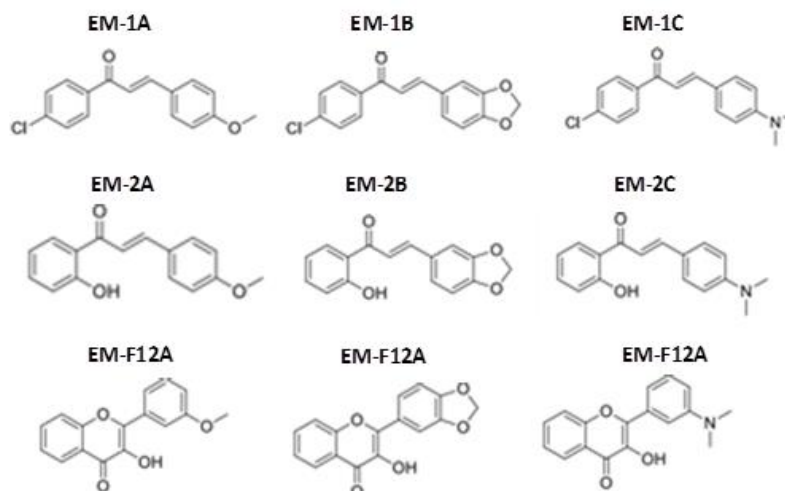
Para os ensaios enzimáticos foi utilizado o tampão acetato de sódio 100mM, glicerol 20%, triton X-100 a 0,01%, DTT 5mM, pH 5,5 a 37°C pré-ativação enzimática por 5 min. A atividade enzimática foi feita em espectrofluorímetro RF6000 shimadzu, utilizando os

comprimentos de onda de: $\lambda_{Ex}=360\text{nm}$ e $\lambda_{Em}=480\text{nm}$, utilizando como substrato Z-FR-MCA. Na determinação do potencial inibitório utilizou-se concentrações crescentes dos compostos e o IC_{50} determinado por regressão não-linear utilizando o programa Grafit 5.0. Foram testados 13 compostos sendo 6 derivados da classe das chalconas e 3 derivados de da classe dos flavonóis (**figura 1**) cedidos pelo Prof. Dr. Denis Pires de Lima da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, e 4 compostos da classe dimetyl-imidazol (**figura 2**) cedidos pela Profa. Dra. Camilla Abbehausen do Instituto de Química da Universidade de Campinas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

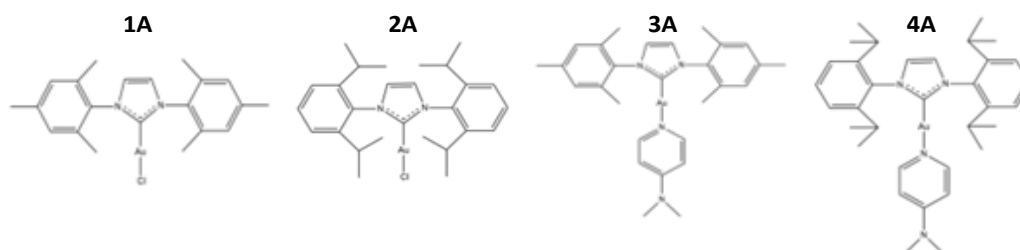
Os testes enzimáticos para determinação de IC_{50} , utilizando os compostos derivados chalconas, flavonóis e carbenos N-heterocíclicos de ouro (I), mostraram serem efetivos na inibição das enzimas de cisteino protease, entretanto esse comportamento de inibição não se repetiu para todas as enzimas, podendo ter relação com sua forma estrutural.

Figura 1 – Estrutura dos compostos derivados de Chalconas e flavonóis



EM: compostos derivados de chalconas, **EM-F:** compostos derivados de flavonóis

Figura 2 – Estrutura dos compostos derivados de carbenos N-heterocíclicos de ouro (I)



Os compostos derivados de chalconas, tiveram um caráter inibitório em todos os três tipos de enzimas, sendo o composto EM-1C e EM-2A com o maior potencial de inibição para a

enzima rCPB 2.8 apresentando os menores valores de IC₅₀ sendo eles: $2,75 \pm 1,18 \mu\text{M}$ e $2,34 \pm 0,19 \mu\text{M}$ (**tabela 1**) respectivamente, para a enzima rCPB 3.0 o composto EM-1B mostrou ser mais efetivo em sua inibição possuindo o valor de IC₅₀ de $5,60 \pm 0,35 \mu\text{M}$ (**tabela 1**). O composto EM-2B mostrou ser mais efetivo na inibição da enzima Rh84Y tendo o valor de IC₅₀ de $4,67 \pm 0,13 \mu\text{M}$ (**tabela 1**). Possivelmente os grupos dimetilamino e cloreto presente no composto EM-1C e o grupo hidroxil e metoxi presente no composto EM-2A possivelmente tem maior afinidade com a enzima rCPB 2.8 e o composto EM-1B que possui os grupos cloreto e metilenodioxo possivelmente tenham maior afinidade com a enzima rCPB 3.0 e a enzima rH84Y possivelmente tem maior afinidade pelos grupos hidroxil e metilenodioxo presente no composto EM-2B (figura 1). Estudos com modelos celulares verificaram que a associação de chalconas potencializou o efeito leishmanicida contra a forma amastigota da *L. amazonensis* por meio de sinergismo dos fitoconstituintes (SANDJO; MORAES; KUETE; *et al.*, 2016). Os compostos derivados de flavonóis foram capazes de inibir as três enzimas, o composto EM-F12A e o EM-F12B, mostraram ter o maior potencial de inibição. Para as enzimas rCPB 2.8, rCPB 3.0 e rH84Y o composto EM-F12A teve o menor valor de IC₅₀ sendo eles: $4,2 \pm 0,38 \mu\text{M}$, $7,71 \pm 0,78 \mu\text{M}$ e $3,85 \pm 0,27 \mu\text{M}$ (**tabela 1**), respectivamente, mostrando ter um alto potencial de inibição para a enzima rH84Y, já o composto EM-F12B apresentou ser mais efetivo na inibição das enzimas rCPB 2.8 (IC₅₀: $5,24 \pm 0,33 \mu\text{M}$) e rCPB 3.0 (IC₅₀: $7,05 \pm 0,62 \mu\text{M}$), essa afinidade entre o composto e a enzima pode ter relação com a presença do grupo metoxi que se encontra no composto EM-F12A e do grupo metilenodioxo que se encontra no composto EM-F12B

Figura 1

Composto	IC ₅₀ (uM)		
	rCPB 2.8	rCPB 3.0	rH84Y
1 A	$0,86 \pm 0,01$	-----	-----
2 A	$3,41 \pm 0,03$	-----	-----
3 A	$2,10 \pm 0,04$	$6,49 \pm 0,32$	-----
4 A	$2,10 \pm 0,05$	$12,29 \pm 1,09$	-----
EM-F12A	$4,72 \pm 0,38$	$7,71 \pm 0,78$	$3,85 \pm 0,27$
EM-F12B	$5,24 \pm 0,33$	$7,05 \pm 0,62$	$8,85 \pm 0,33$
EM-F12C	$10,32 \pm 0,39$	$16,67 \pm 2,53$	$28,56 \pm 1,62$
EM-1A	$13,66 \pm 0,74$	$9,91 \pm 0,59$	$29,74 \pm 2,62$
EM-1B	$7,42 \pm 0,25$	$5,60 \pm 0,35$	$15,34 \pm 0,60$
EM-1C	$2,75 \pm 1,18$	$10,16 \pm 0,51$	$11,70 \pm 1,27$
EM-2A	$2,34 \pm 0,19$	$7,14 \pm 0,86$	$16,34 \pm 0,46$
EM-2B	$20,63 \pm 1,06$	$10,98 \pm 0,40$	$4,67 \pm 0,13$
EM-2C	$11,74 \pm 0,38$	$8,96 \pm 0,61$	$9,90 \pm 0,48$

Os compostos derivados de flavonóis foram capazes de inibir as três enzimas, o composto EM-F12A e o EM-F12B, mostraram ter o maior potencial de inibição. Para as enzimas rCPB 2.8, rCPB 3.0 e rH84Y o composto EM-F12A teve o menor valor de IC_{50} sendo eles: $4,2 \pm 0,38 \mu\text{M}$, $7,71 \pm 0,78 \mu\text{M}$ e $3,85 \pm 0,27 \mu\text{M}$ (**tabela 1**), respectivamente, mostrando ter um alto potencial de inibição para a enzima rH84Y, já o composto EM-F12B apresentou ser mais efetivo na inibição das enzimas rCPB 2.8 (IC_{50} : $5,24 \pm 0,33 \mu\text{M}$) e rCPB 3.0 (IC_{50} : $7,05 \pm 0,62 \mu\text{M}$), essa afinidade entre o composto e a enzima pode ter relação com a presença do grupo metoxi que se encontra no composto EM-F12A e do grupo metilenodioxi que se encontra no composto EM-F12B (**figura 1**). Os compostos derivados de carbenos N-heterociclicos de ouro (I) mostraram ser efetivos na inibição da enzima rCPB 2.8, sendo o composto 1A com o maior potencial inibitório apresentando o menor valor de IC_{50} sendo ele: $0,86 \pm 0,01 \mu\text{M}$ (**tabela 1**). Entretanto para a enzima rCPB 3.0 os compostos 1A e 2A ativaram a enzima em 3,6 e 11 vezes o valor controle, após essa ativação ocorreu o decaimento e sua estabilização de sua atividade enzimática, isso poderia ter relação com a forma estrutural presente nesses compostos que estimulam a ativação da enzima (**figura 2**), os composto 3A e 4A tiveram caráter inibitório com os valores de IC_{50} de $6,49 \pm 0,32 \mu\text{M}$ e $12,29 \pm 1,09 \mu\text{M}$ (**tabela 1**), sendo o composto 3A com o maior potencial de inibição, possivelmente o grupamento trimetil fenil presente nesse composto (**figura 2**), aumenta sua afinidade entre o composto e a enzima, podendo estar relacionada com seu potencial inibitório. A enzima rH84Y apresentou oscilações entre ativação e inibição, possivelmente o composto não se ligou a enzima, não mostrando afinidade entre eles, podendo ter relação com a forma estrutural da enzima que apresenta uma variação nos domínios da posição 84 onde ocorre a troca de histidina por tirosina (MOTTRAM *et al*, 1997). É importante que os inibidores das cisteíno proteases em estudo sejam efetivos contra as três isoformas da enzima, pois, estudos mostraram a formação de grandes lesões em camundongos Balb/c que receberam amastigotas que expressavam apenas CPB2.8 em comparação a amastigotas deficientes das três isoformas (DENISE; MCNEIL; BROOKS; *et al.*, 2003).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se concluir que os compostos derivados de flavonóis e chalconas mostraram ser mais efetivos na inibição das enzimas de cisteíno protease de *leishmania mexicana* que os compostos derivados de carbenos N-heterociclicos de ouro (I). Tendo potencial para o desenvolvimento de novos farmacos, uma vez que possuem ação antioxidante, baixa toxicidade e tem a capacidade de inibir as cisteíno proteases de *leishmania maxicana*. O composto EM-F12A e o EM-F12B presente na classe dos derivados de flavonóis, e o composto EM-2A presente na classe das chalconas se destacam dentre os outros composto

por ter a capacidade de inibir os três tipos de enzimas, com o menor quantidade de composto, onde a EM-F12A apresentou maior potencial de inibição para enzima rH84Y, podendo ter relação com sua forma estrutural presente na enzima.

REFERÊNCIAS

DENISE, H.; MCNEIL, K.; BROOKS, D.R.; ALEXANDER, J.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence in vivo. **Infection and immunity**, v. 71, n. 6, p. 3190-3195, 2003.

DIAS, L. C. *et al.* Doenças tropicais negligenciadas: uma nova era de desafios e oportunidades. *Química Nova, Brasil*, v.36, n.10, 2013

FAROOQ M, TAHA NA, BUTORAC RR, EVANS DA, ELZATAHRY AA, ELSAYED EA, WADAAN MA, AL-DEYAB SS, COWLEY AH. Biological Screening of Newly Synthesized BIAN N-Heterocyclic Gold Carbene Complexes in Zebrafish Embryos. *Int J Mol Sci*. 2015 Oct 16;16(10):24718-31. doi: 10.3390/ijms161024718. PMID: 26501273; PMCID: PMC4632773.

HIBA JASIM, NAHAR L, JASIM MA, MOORE SA, RITCHIE KJ, SARKER SD. Chalcones: Synthetic Chemistry Follows Where Nature Leads. **Biomolecules**. 2021 Aug 13;11(8):1203. doi: 10.3390/biom11081203. PMID: 34439870; PMCID: PMC8392591.

MOTTRAM JC, FRAME MC, BROOKS DR, *et al.* The multiple cpb cysteine proteinase genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. **J Biol Chem** 1997;272:14285–93.

REIS MB, MANJOLIN LC, MAQUIAVELI CDO C, SANTOS-FILHO OA, DA SILVA ER. Inhibition of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and rat arginases by green tea EGCG, (+)-catechin and (-)-epicatechin: a comparative structural analysis of enzyme-inhibitor interactions. **PLoS One**. 2013 Nov 8;8(11):e78387. doi: 10.1371/journal.pone.0078387. PMID: 24260115; PMCID: PMC3832641

SANDJO, L.P.; MORAES, M.H.; KUETE, V.; KAMDOUM, B.C.; NGADJUI, B.T.; STEINDEL, M. Individual and combined antiparasitic effect of six plant metabolites against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 26, n. 7, p. 1772-1775, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases executive summary neglected tropical diseases - a roadmap for implementation. 2012.