

## **CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS DERIVADOS DO EUGENOL COMO MODULADORES DA ATIVIDADE DAS CATEPSINAS B E L**

Yohanna Carvalho dos Santos Aoun Chikhani<sup>1</sup>; Marcia Paranho Veloso<sup>2</sup>; Wagner Alves de Souza Júdice<sup>3</sup>

1. Estudante do Curso de Biomedicina; e-mail: nanayohanna@hotmail.com
2. Professor da Universidade Federal de Alfenas; e-mail: mparanho@gmail.com
3. Professor da Universidade Mogi das Cruzes; e-mail: wagneras@umc.br

Área do Conhecimento: **Enzimologia**

**Palavras-chaves:** Catepsinas B e L, inibidores, derivados de eugenol, potencial inibitório.

### **INTRODUÇÃO**

Cisteíno proteases têm sido identificadas em diversos sistemas biológicos que compreendem desde vírus até vertebrados (SAJID e MCKERROW, 2002). A família Catepsina apresenta um total de onze membros que foram identificados exibindo atividade proteolítica em diferentes processos fisiológicos ou patológicos assim como resposta imune, absorção óssea, inflamação crônica, pancreatite e outros (CHANG et al, 2007). O aumento da atividade das catepsinas B e L tem sido observado em casos de câncer de mama, próstata e em estágios iniciais de carcinoma gástrico, sendo considerados marcadores para estas doenças e sugeridas como prognóstico para recidivas destes tipos de tumores. Também foi observado o aumento da atividade de ambas catepsinas em linhagens tumorais altamente tumorigênicas em comparação com linhagens pouco tumorigênicas (NOMURA, KATUNUMA, 2005). Inibidores enzimáticos são substâncias químicas capazes de reduzir a velocidade de reações catalisadas por enzimas (COPELAND, 2000). O eugenol tem sido foco de estudos como possível inibidor. Eugenol é o principal constituinte do óleo essencial do cravo, e sua atividade antimicrobiana está ligada à sua habilidade de permeabilizar a membrana celular e interagir com proteínas (WALSH et al, 2003; GILL e HOLLEY, 2006a; HEMAISWARYA e DOBLE, 2009). Portanto, há dados que sugerem sua utilização como um excelente agente de prevenção de metástase relacionado ao estresse oxidativo.

### **OBJETIVO**

Avaliar os efeitos de compostos morfolínicos derivados do eugenol como possíveis moduladores da atividade enzimática das catepsinas B e L.

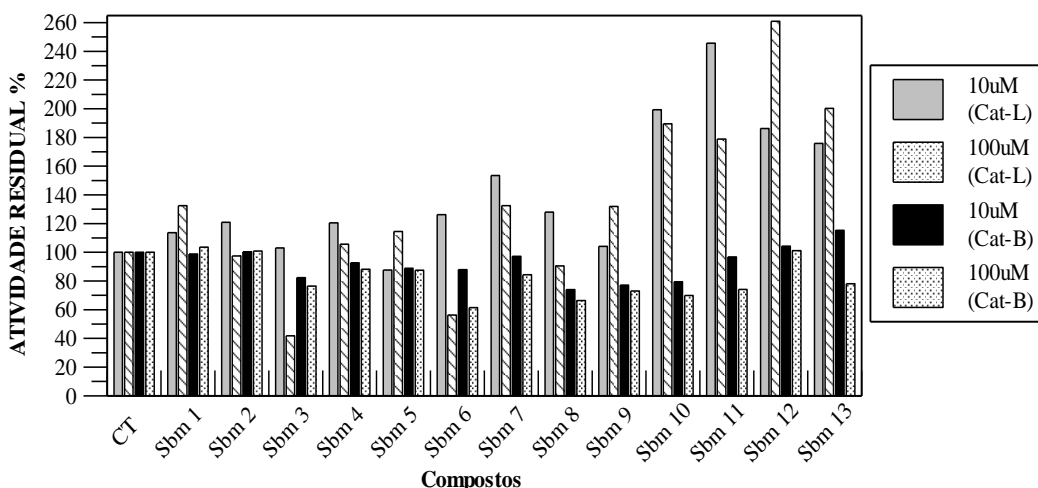
### **METODOLOGIA**

Realizou-se a triagem com os 13 compostos derivados do Eugenol em duas concentrações (10 $\mu$ M e 100 $\mu$ M). Moléculas que apresentaram redução maior ou igual a 50% da atividade enzimática foram selecionadas para determinação do potencial inibitório IC<sub>50</sub>. Foi realizado 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  $\lambda_{Ex}$ =360nm e  $\lambda_{Em}$ =480nm 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 até estabilização do decaimento da atividade enzimática. Com os dados calculou-se o IC<sub>50</sub> por regressão não-linear utilizando o programa Grafit 5.0.13.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na triagem de atividade residual dos compostos sobre a catepsina B observamos baixo efeito inibitório sobre esta protease tanto na concentração de 10 $\mu$ M quanto de 100 $\mu$ M. É possível verificar que os compostos SBM3, SBM6 e SBM8 foram os que apresentaram maior efeito inibitório cerca de 20%, 42% e 35% à 10 $\mu$ M. Os compostos SBM3, SBM6, SBM8, SBM9, SBM10, SBM11 e SBM13 apresentaram um melhor efeito na concentração de 100 $\mu$ M, com inibição respectivamente de 23%, 40%, 32%, 25%, 30%, 25% e 22% (Figura 1). Na triagem de atividade residual sobre a catepsina L, observamos que também os compostos SBM3, SBM6 e SBM8 também foram os mais efetivos na inibição com inibição de 60%, 40% e 10%, respectivamente. Um fator que chamou a atenção foi que um maior número de compostos foi capaz de ativar a catepsina L. Por exemplo, os compostos SBM10, SBM11 e SBM12 promoveram ativação em 100%, 160% e 75%, respectivamente (Figura 1) e também foram selecionados para ensaios de inibição para determinação do potencial inibitório IC<sub>50</sub> para efeito comparativo com a catepsina L.

**Figura 1:** Atividade residual da Catepsina B e Catepsina L na triagem, realizada em duas dosagens dos compostos.



Sendo assim os compostos SBM3, SBM6, SBM8, SBM9, SBM10 e SBM11 foram escolhidos para ensaios de inibição para determinação do potencial inibitório IC<sub>50</sub> para ambas as Catepsinas (Tabela 1). Os compostos testados foram mais eficientes na inibição da catepsina L do que catepsina B. Em geral SBM3, SBM6 e SBM8 inibiram duas vezes mais a catepsina L do que a catepsina B e os compostos SBM9, SBM10 e SBM11 mesmo sendo menos efetivo para a catepsina L na triagem do que com a catepsina B, foi mais efetivo no potencial inibitório IC<sub>50</sub> com a catepsina L do que com a B (Tabela 1). A atividade proteolítica excessiva freqüentemente leva à doença, mas pode ser evitada bloqueando as proteases apropriadas, que foram exploradas terapêuticamente desde a década de 1950 (TURK *et al.*, 2006). Muitos inibidores de cisteína proteases contêm grupos eletrolíticos, incluindo epóxidos, cetonas, alquil-alogenados, e nitrilos, que reagem com tiolatos nucleofílico das cisteínas dos sítios ativos e ancora o inibidor à enzima alvo (TURK *et al.*, 2006). Nota-se que o composto que apresenta melhor potencial inibitório é o que possui grupo dentro dessas características como o SBM3 que contém um grupo que se comportará como um eletrolítico, os demais compostos, não possui nenhuma das características.

**Tabela 1:** Valores de potencial inibitório IC<sub>50</sub> dos compostos SBM3, SBM6, SBM8, SBM9, SBM10, e SBM11 na inibição das catepsinas B e L.

COMPOSTO	IC50 (µM)	
	CATEPSINA B	CATEPSINA L
SBM3	28,02±0,37	17,27±0,09
SBM6	36,03±0,15	16,41±0,22
SBM8	45,22±0,29	18,43±0,15
SBM9	81,04±5,09	21,80±0,44
SBM10	101,41±8,45	62,95±1,04
SBM11	138,85±10,78	53,11±4,80

## CONCLUSÃO

Observamos que de modo geral todos os compostos apresentaram uma melhor inibição para a catepsina L do que para a catepsina B. O composto que apresentou um grupo eletrolítico como ligante foi o mais efetivo, mas não igualmente, sendo melhor para a catepsina L do que para a catepsina B. Uma possível explicação é que, se o mecanismo de inibição for competitivo, a presença de uma alça de oclusão na catepsina B, localizada junto ao sítio catalítico pode estar dificultando o acesso do inibidor o tornando menos efetivo, e como esta alça é ausente na catepsina L, os compostos teria um acesso facilitado ao sítio catalítico. Entretanto, são suposições que dependem de mais ensaios cinéticos, mais especificamente determinação do mecanismo de inibição para melhor entendimento do processo inibitório dessas catepsinas.

## REFERÊNCIAS

- CHANG, W.S.; WU, H.R.; WU, C.W.; CHANG, J.Y. Lysosomal cysteine proteinase cathepsin S as a potential target for anti-cancer. *Journal of cancer molecules*, v. 3, p. 5-14, 2007.
- COPELAND, R.A. *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. New York, Wiley, 2000.
- GILL, A.O.; HOLLEY, R.A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *Int J Food Microbiol*. 2006 Apr 15;108(1):1-9. 2006.
- HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram-negative bacteria. *Phytomedicine*. 2009 Nov;16(11):997-1005. doi: 10.1016/j.phymed.2009.04.006. 2009.
- NOMURA, T.; KATUNUMA, N. Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer cells. *The Journal of Medical Investigation*, v.25, p. 1-9, 2005.
- SAJID, M., MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 120, p.1-21, 2002.
- TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.5, 785-799, 2006.

WALSH, S.E.; MAILLARD, J.Y.; RUSSELL, A.D.; CATRENICH, C.E.; CHARBONNEAU, D.L.; BARTOLO, R.G. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. J Appl Microbiol. 94(2):240-7. 2003.