

Inhibition and interaction *in vitro* of natural compounds from lichens with urease: possible application in the *Helicobacter pylori* treatment

Thamilla M. Maciel (IC)¹; Tiago Lage (PQ)²; Sergio A. Fernandes (PQ)^{2*}; Isabella L.M. de Aquino (IC)³; Yane Campolina C. Mota (PG)³; Luzia V. Modolo (PQ)^{3*}; Ângelo de Fátima (PQ)^{4*}; Josué Carinhonha (PQ)^{1,*} e Isis M. Figueiredo (PQ)^{1,1*}

E-mail: figueiredo.isis@gmail.com

¹Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas / ²Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa / ³Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais / ⁴Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Palavras Chave: urease, inibição, *Helicobacter pylori*, ácido úsnico, ácido fumarprotocetrárico, fluorescência molecular.

Abstract

Evaluation of usnic acid isomers and fumarprotocetraric acid in the urease inhibition capacity and interaction process.

Introdução

Os líquens são associações simbióticas entre fungos e algas e são capazes de produzir metabólitos secundários característicos e exclusivos. Dentre a variada diversidade de compostos descritos nos líquens pode-se destacar os isômeros (-) e (+) do ácido úsnico (AUS) (Fig. 1a) e o ácido fumarprotocetrárico (FUM) (Fig. 1b).

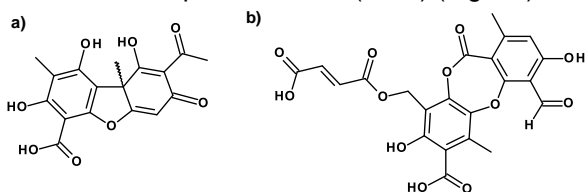


Fig. 1. Estrutura dos compostos avaliados.

Uma das estratégias de tratamento da *Helicobacter pylori* se baseia na inibição da urease, a qual é produzida e liberada por esta bactéria visando ajuste do pH no microambiente que habita. Assim, compostos passíveis de inibir a ação da urease podem apresentar potencial terapêutico no tratamento da *H. pylori*. Neste sentido, este trabalho avaliou a inibição e interação *in vitro* dos compostos (-)-AUS, (+)-AUS e FUM com urease empregando ensaio enzimático e fluorescência.

Resultados e Discussão

Os compostos (-)-AUS e FUM foram isolados e caracterizados a partir do líquen *Cladonia rappii* A Evans, enquanto o (+)-AUS foi obtido comercialmente. No ensaio de inibição enzimática foi empregada urease (*Canavalia ensiformis*, Jack bean, tipo III). A concentração de uréia foi fixada em 10 mM e dos compostos avaliados em 1,6 mM. Hidroxiuréia foi empregada como inibidor de referência. Nos estudos de interação por fluorescência molecular a concentração da urease foi mantida em 1 μ M (λ_{ex} = 280 nm / λ_{em} = 337 nm), enquanto os compostos variados de 1-80 μ M. Ambos experimentos foram realizados em tampão fosfato 20 mM, contendo 1 mM de EDTA e pH ajustado para pH = 7,4. Os resultados quanto a inibição *in vitro* da urease indicaram que todos os

compostos apresentaram excelente potencial com valores próximos a hidroxiuréia (87% de inibição). A ordem de inibição obtida foi: FUM (89%) > (-)-AUS (81%) > (+)-AUS (71%). Na avaliação do processo de interação notou-se diminuição na fluorescência intrínseca da urease à medida que os excessos dos compostos foram adicionados, indicando ocorrência de *quenching*. Os parâmetros de ligação e termodinâmicos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Principais parâmetros associados ao processo de interação. Sendo K_{SV} = constante de Stern-Volmer e K_b = constante de ligação.

Composto	T (°C)	Parâmetros de ligação		Parâmetros termodinâmicos		
		K_{SV} (10^4 L mol ⁻¹)	K_b (10^3 L mol ⁻¹)	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹)
(+)-AUS	23	5,26 ± 0,18	7,67 ± 0,34	-33,37		
	30	5,05 ± 0,16	6,61 ± 0,32	-33,80	-15,00	+ 61,96
	38	4,60 ± 0,17	5,70 ± 0,36	-34,27		
(-)-AUS	23	5,48 ± 0,30	18,3 ± 4,2	-35,58		
	30	4,86 ± 0,28	15,7 ± 4,5	-35,92	-21,02	+ 48,10
	38	5,00 ± 0,28	12,3 ± 4,4	-36,30		
FUM	23	3,29 ± 0,18	0,28 ± 0,01	-25,24		
	30	3,52 ± 0,19	0,25 ± 0,01	-25,50	-14,28	+ 36,98
	38	3,61 ± 0,23	0,21 ± 0,01	-25,78		

Os valores de K_b obtidos indicam força de ligação de intermediária a forte entre a enzima e os inibidores. O aumento da temperatura do sistema levou a redução dos valores de K_b , indicando que o mecanismo de *quenching* preferencial é estático. Quanto aos parâmetros termodinâmicos, obteve-se valores negativos para ΔG , indicando processo de interação espontâneo. Além disso, ΔH negativo e ΔS positivo indicam que as forças predominantes durante a interação são eletrostáticas. Este fato pode estar relacionado a interação dos grupos ácidos desprotonados com o centro ativo da enzima composto por dois átomos de níquel. Através do emprego de fluorescência sincronizada e 3D foi possível inferir que o processo de interação expõe os resíduos de triptofano e tirosina a um microambiente mais polar, assim como, leva a mudanças na estrutura secundária em relação a proteína nativa.

Conclusões

Os compostos avaliados interagiram e apresentaram elevada inibição da atividade da urease *in vitro*. Assim, constituem possíveis candidatos para o tratamento da *H. pylori*.

Agradecimentos

IQB-UFAL, DQ-UFV, ICB-UFMG, DQ-UFMG, FAPEMIG, CAPES e CNPq. Dr^a Suzana Martins pela identificação do líquen.