Sociedade Brasileira de Química (SBQ)

Triagem de atividades inibitórias de enzimas proteolíticas em extratos de *Baccharis*.

João Henrique G. Lago (PQ)[1]*, Jorge A. Santos (PG),[2] Luiz Juliano (PQ)[2], Paulete Romoff (PQ)[3] e Rodrigo L. O. R. Cunha (PQ)[2,4]. e-mail: joao.lago@unifesp.br

[1]Departamento de Ciências Exatas e da Terra e [2]Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brasil. [3]Centro de Ciências e Humanidades, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, Brasil. [4]Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH), Universidade Federal do ABC (UFABC), Santo André, Brasil.

Palavras Chave: *Baccharis, proteases, inibidores enzimáticos, produtos naturais bioativos.*

Introdução

As proteases ou enzimas proteolíticas constituem um dos mais amplos e importantes grupos de enzimas. Proteases catalisam a hidrólise seletiva de ligações peptídicas e são divididas em quatro classes (ou grupos) principais, quais sejam as *aspatil-*, *serino-*, *treonino-*, *cisteíno-* e *metalo-proteases*. De modo geral, as proteases participam de uma miríade de processos fisiológicos fundamentais. A atividade proteolítica descontrolada ou desregulada está envolvida em diversos quadros patológicos como derrames, infecções virais, câncer, mal de Alzheimer e artrite.[1] Dada a importância central destas enzimas, seus inibidores aparecem como promissores candidatos para fármacos a serem utilizados no tratamento de doenças relacionadas com seu funcionamento não regulado. Como parte de um novo programa dedicado a busca de novos inibidores enzimáticos, neste trabalho são descritos nossos esforços iniciais para estabelecer uma nova abordagem para a seleção de extratos bioativos com ação inibitória de proteases.

Resultados e Discussão

Com o intuito de buscar por novos inibidores de enzimas proteolíticas, realizamos a triagem de extratos apolares (hexano) e polares (etanol) de algumas espécies de *Baccharis* frente a duas enzimas proteolíticas. *Tripsina* (E.C. 3.4.21.4) e *papaína* (E.C. 3.4.22.2) do látex de *Carica papaia* são respectivamente arquétipos de serina e cisteína proteases. A atividade hidrolítica destas enzimas foi monitorada por espectrofluorimetria através da hidrólise do substrato fluorogênico coumarínico, Cbz-Phe-Arg-MCA. A triagem dos inibidores foi realizada pela incubação, por uma hora, de 10µg dos extratos (solubilizados em dimetilsulfóxido) com as enzimas em tampões apropriados. As atividades enzimáticas em cada experimento foram comparadas com aquelas determinadas nas mesmas condições onde apenas os mesmos volumes de solvente (DMSO) foram utilizados, sendo expressas em termos de porcentagem de inibição da atividade enzimática original. Como resultado desta triagem inicial, foi observado que apenas a atividade enzimática da papaína foi afetada. A verificação das inibições da papaína também foi realizada na presença de detergente (Triton X-100). Nestas condições, verifica-se se a inibição observada se deu pela interação das moléculas presentes no extrato e não pela inibição enzimática não seletiva comumente observada pela formação de agregados de moléculas apolares em solução (inibição promíscua).[2] Os resultados obtidos encontram-se compilados na figura 1.

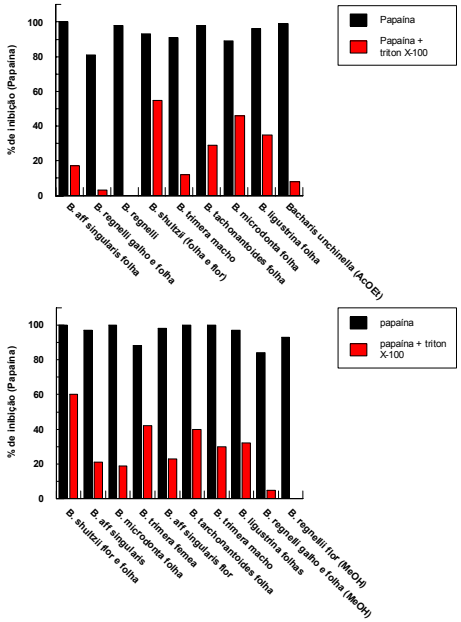

Figura 1. Inibição da atividade proteolítica de papaína por extratos hexanicos (acima) e etanólicos (abaixo) de espécies de *Baccharis*.

Legenda. A papaína (15nM) foi incubada com ditiotreitol (2,5mM) em tampão de fosfato de sódio a 100mM com aproximadamente 10µg dos extratos, a 26°C, por uma hora. Após este período a atividade, a enzimática remanescente foi determinada com a adição do substrato fluorogênico Cbz-Phe-Arg-AMC (10µM), comparada com a atividade enzimática do experimento com papaína na ausência das soluções dos extratos. Os ensaios de inibição foram realizados na presença e na ausência de detergente (triton X-100 a 0,005%), como diagnóstico de inibição promíscua.[2]

Conclusões

Neste trabalho, realizamos a triagem inicial da atividade inibitória de duas proteases representativas (*tripsina* e *papaína*) frente a extratos brutos de diversas espécies de *Baccharis*. Destas duas enzimas, apenas foi observada a inibição da *papaína*. A inibição desta enzima foi ligeiramente menos efetiva na presença de Triton X-100, indicando que, possivelmente, nas condições experimentais empregadas, houve inibição promíscua da atividade desta enzima. Contudo, as inibições observadas com os extratos hexânicos e etanólicos de folhas e flores de *B. shultzii*, indicam estes extratos como sendo os mais promissores como inibidores de cisteína proteases.

Agradecimentos

FAPESP e CNPq.

[1] Powers et al., *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4639.
[2] Feng et al., *J. Med. Chem.* **2007,** *50*, 2385.