

## Otimização de parâmetros para ensaio de atividade inibitória de urease empregando piridinonas

Vânia M. M. Valente (PQ)<sup>1,2</sup>, Fabrício M. Oliveira (PG)<sup>2</sup>, Antônio J. Demuner (PQ)<sup>2\*</sup>, Luiz Cláudio A. Barbosa (PQ)<sup>2</sup>, Célia R. A. Maltha (PQ)<sup>2</sup>, Sebastião T. Rezende (PQ)<sup>3</sup>, Rubens M. Almeida (IC)<sup>2</sup>, Izabel M. Miranda (IC)<sup>2</sup> \*ademuner@ufv.br

<sup>1</sup> Campus de Rio Paranaíba, Universidade Federal de Viçosa, BR 354, km 310, 38810-000 Rio Paranaíba, MG, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Av. PH Rolfs, 36570-000 Viçosa, MG, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Univ. Federal de Viçosa, Av. PH Rolfs, 36570-000 Viçosa, MG.

Palavras Chave: Inibidores de urease, urease Jack bean, síntese, piridinonas.

### Introdução

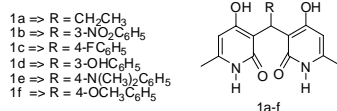
As piridinonas são uma classe de compostos com reconhecida atividade biológica: antifúngica, analgésica, antimalárica, antibacteriana, fitotóxica, anti-HIV, antiinflamatória, antiviral e anticâncer<sup>1</sup>.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa obteve piridinonas que apresentam atividade inibidora de urease. Esta enzima catalisa a hidrólise da uréia a amônia e gás carbônico, sendo também, importante em processos patogênicos envolvendo úlcera péptica e gástrica induzidas por *Helicobacter pylori*<sup>2</sup>.

Neste trabalho apresentamos a otimização de parâmetros importantes na determinação da atividade inibitória da urease de Jack bean (*Canavalia ensiformis*) por piridinonas.

### Resultados e Discussão

As piridinonas (**1a-1f**) foram sintetizadas<sup>3</sup> e avaliadas, *in vitro*, quanto à sua atividade inibidora de urease.<sup>4</sup>



Os experimentos para avaliação da atividade inibidora de urease foram realizados empregando-se solução tampão Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (200 mM, pH 7,4) e solução de urease (3,0 mg/mL, Sigma U-1500-100kU) pré-incubada com as piridinonas (C<sub>final</sub> de 500 ou 100 μM) a 25 °C (variação de tempo: 15 a 55 min). Em seguida, 0,5 mL de solução de uréia 2,4 mg/mL foram adicionados e a mistura resultante foi incubada a 25 °C durante 12 min. A amônia foi determinada pelo método Indo-fenol com incubação a 50 °C durante 20 min, a 636 nm no UV-Vis. O controle consistiu da mesma solução, porém, sem piridinona. A tiouréia foi usada como padrão de eficiência e a porcentagem de inibição foi calculada por meio da seguinte equação:

$$\text{INH}(\%) = 100 - [(A_{\text{INH}}/A_{\text{B}}) \times 100]$$

onde A<sub>INH</sub> e A<sub>B</sub> são concentrações de amônia (em ppm) com e sem inibidor (piridinona ou tiouréia), respectivamente. Devido à maior solubilidade das piridinonas em solução aquosa de DMSO ou etanol foram realizados experimentos a fim de avaliar o percentual de inibição enzimática provocada por esses solventes (0 a 18% v/v).

34<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química



Figura 1. a) Inibição da urease pelos solventes. b) Inibição de urease por 1d em função do tempo de pré-incubação.

De acordo com os resultados do efeito do solvente (Figura 1a) e tempo de pré-incubação (Figura 1b) foi realizado ensaio comparativo entre os compostos solubilizados em tampão, e na mistura DMSO:etanol (2:3), com pré-incubação de 45 min. Uma alíquota de 10 μL da solução em DMSO:etanol foi diluída em 990 μL de tampão, obtendo-se concentração final para DMSO de 0,4%, o que não interferiu significativamente na atividade da enzima. Ressalta-se que as concentrações finais do inibidor foram 500 μM para o ensaio em tampão e 100 μM para DMSO:etanol.

Observou-se que as piridinonas causaram maior inibição da enzima urease quando solubilizadas em DMSO:etanol (Figura 2), destacando-se as piridinonas **1a** e **1f**, com aumentos superiores a 10 vezes. No caso da tiouréia não houve alteração.

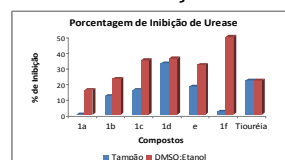


Figura 2. Atividade inibitória da urease das piridinonas e tiouréia.

### Conclusões

As piridinonas avaliadas foram mais ativas quando dissolvidas em solução de DMSO a 0,4% na solução final do que em solução tampão, para um tempo de pré-incubação de 45 min. Estes compostos são considerados promissores para novas investigações no que diz respeito ao desenvolvimento de novos inibidores de urease e de novas drogas.

### Agradecimentos

CNPq, Capes e Fapemig.

<sup>1</sup> McGlacken et al., *Nat. Prod. Rep.* **2005**, 22, 369.

<sup>2</sup> Follmer, C. *J Clin Pathol.* **2010**, 63, 424.

<sup>3</sup> Demuner et al., *Molecules* **2009**, 14, 4973.

<sup>4</sup> Dominguez et al., *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 3721.