

Validação do método para determinação da atividade inibidora de urease por derivados de piridin-2(1H)-onas

Fabrício M. Oliveira (PG)¹, Vânia M. M. Valente (PQ)^{1,2}, Antônio J. Demuner (PQ)^{1*}, Luiz Cláudio A. Barbosa (PQ)¹, Célia R. A. Maltha (PQ)¹, Rubens M. Almeida (IC)¹, Izabel M. Miranda (IC)¹, Alberto Oliveros-Bastidas (PQ)³ *ademuner@ufv.br

¹ Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Av. PH Rolfs, 36570-000 Viçosa, MG, Brasil.

² Campus de Rio Paranaíba, Universidade Federal de Viçosa, BR 354, km 310, 38810-000 Rio Paranaíba, MG, Brasil

³ Departamento de Química, Universidade de Los Andes, Mérida-Estado Mérida, 5101-A, Venezuela.

Palavras Chave: validação de método, Inibidores de urease, síntese, piridinonas.

Introdução

Ureases são metaloenzimas dependentes de níquel que catalisam a hidrólise de uréia a amônia e dióxido de carbono. Apresentam grande importância biológica, estando relacionadas a patologias dos tratos urinários e gastrointestinal, e na área agrícola, exercendo função na regulação do fornecimento de nitrogênio para as plantas¹.

Nesse trabalho apresentamos a validação do método para determinação da atividade inibitória de urease por derivados de piridin-2(1H)-onas previamente sintetizados².

Resultados e Discussão

A determinação da atividade da urease foi realizada de acordo com o método descrito na literatura³ após otimização no solvente utilizado, tempo de pré-incubação e tempo de reação.

A curva analítica foi preparada com solução de NH₄Cl (Figura 1).

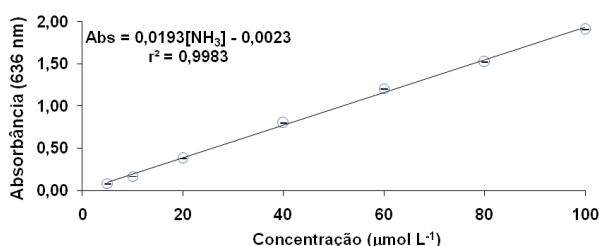


Figura 1. Curva padrão para quantificação da amônia produzida pela urease usando método indofenol.

Os experimentos *in vitro* para avaliação da atividade inibidora de urease foram realizados empregando-se solução tampão Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (200 mM, pH 7,4) e solução de urease (3,0 mg/mL, Sigma U-1500-100kU) pré-incubada com solução dos derivados de piridin-2(1H)-onas solubilizados em DMSO-etanol (2:3), com concentração final de 100 μM, a 25 °C (45 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 20 min. A amônia foi determinada pelo método Indofenol com incubação a 50 °C durante 20 min, e leitura a 636 nm no UV-Vis. O experimento 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:

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

onde A_{INH} e A_B são concentrações de amônia (em ppm) com e sem inibidor (piridinona ou tiouréia), respectivamente.

Os parâmetros da curva analítica, tais como coeficiente de correlação, equação da reta, desvios, limites de detecção e quantificação, sensibilidade analítica e linearidade encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros de calibração para determinação da atividade de urease

Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
Equação da reta	y = a + bx	LD (μM)	4,2
r ²	0,9983	LQ (μM)	14,2
a (μM)	-0,0023	Linearidade	99,056%
S _a (μM)	0,0103	Sensibilidade	1,4573
b (μM)	0,0193	analítica	
S _b (μM)	0,0002		

Os valores de concentração de NH₃ determinados encontram-se dentro da faixa linear de concentração usada, o que garante confiabilidade aos resultados.

O método validado foi ferramenta fundamental para estudar o efeito de 32 moléculas sintéticas como potenciais inibidores da enzima urease bem como possibilitar a elaboração de agrupamento de moléculas semelhantes inibidoras e correlações estrutura-atividade.

Conclusões

O método mostrou-se adequado à determinação da atividade inibitória de urease para avaliação dos derivados de piridin-2(1H)-onas na concentração de 100 μM.

Agradecimentos

CNPq, Capes, Fapemig.

¹ Balasubramanian, A.; Ponnuraj, K. *J. Molec. Biol.* **2010**, *400*, 274.

² Demuner, A. J.; Barbosa, L. Cl. A.; Valente, V. M. M.; Rathi, A. H.; Donohoe, T. J.; Thompson, A. L. *Molecules* **2009**, *14*, 4973.

³ Witte, C.; Medina-Escobar, N. *Anal. Biochem.* **2001**, *290*, 102.