



INIBIÇÃO DA ELASTASE POR EXTRATOS DE *CRASSULA OVATA*

Franciele de Cássia GUIMARÃES¹; Lais Guadalupe CASALOTI²; Jorge Alexandre Nogueira
SANTOS³

RESUMO

A elastase é uma protease controlada pelo inibidor α 1-antitripsina (AAT) que é produzido naturalmente pelo fígado. Mutações no gene SERPINA 1 causam deficiência desse inibidor e a consequência disso é o aparecimento de diversas patologias em humanos. O objetivo deste trabalho foi examinar os efeitos de extratos aquoso e etanólico da *C. ovata* (*Crassula ovata*) sobre a atividade enzimática da protease elastase. Ambos extratos, apresentaram grande efeito inibitório sobre a elastase, com valores de IC₅₀ de 1.9 (extrato aquoso) e 2.1 µg/ml (extrato etanólico), respectivamente. Estes resultados sugerem que os extratos de *C. ovata* podem ser uma fonte potencial de compostos bioativos para a descoberta de novos inibidores para a elastase.

Palavras-chave: Enzimas; inibidores; elastase.

1. INTRODUÇÃO

Considerando-se a importância da elastase na fisiopatologia de diversas doenças, associada ao fato de existirem poucas drogas disponíveis até o momento para esta especificidade, a prospecção de compostos bioativos a partir de produtos naturais encontra nas espécies vegetais a principal e mais promissora fonte de novos compostos que possam agir como inibidores da elastase. Para se proteger contra insetos herbívoros, as plantas geralmente produzem metabólitos secundários que incluem terpenos, polifenóis, taninos, peptídeos e proteínas (IBANEZ *et al*, 2012). Muitos desses compostos são inibidores de proteases e provocam uma diminuição do processo de absorção dos aminoácidos essenciais necessários para o desenvolvimento dos insetos (CUCCILIONI *et al*, 2009). Sendo assim, as plantas constituem uma boa fonte para se prospectar inibidores para a elastase.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Elastase

A elastase é formada por uma cadeia polipeptídica contendo 240 aminoácidos e massa

¹ Graduada em Licenciatura em Ciências Biológicas- fran.gui01@hotmail.com

² Graduanda em Licenciatura em Ciências Biológicas- lais00casaloti@gmail.com

³ Professor do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas- jorge.santos@ifsuldeminas.edu.br



molecular aproximada de 26 KDa, e possui a propriedade de hidrolisar componentes da matriz extracelular, como colágeno, elastina, laminina e proteoglicanos (KAPADIA; THOMSON, 1979). A atividade proteolítica da elastase neutrofílica é estritamente regulada pelo inibidor proteico endógeno denominado α 1-antitripsina (AAT). Mutações no gene SERPINA 1, locus Pi, localizado no cromossomo 14 (14q31-32) causam deficiência da AAT (SIEDLE, et al., 2003). Sem a presença do seu inibidor natural, a elastase em abundância gera lesões teciduais, já que esta enzima é a principal protease liberada pelo neutrófilos em processos inflamatórios. A ação da elastase está relacionada com uma série de doenças como falência hepática, artrite reumatóide, psoríase, câncer de pele, arteriosclerose e diversas patologias pulmonares (JOHANSSON, 2002). Em um pulmão normal, os alvéolos são expostos a baixos níveis de elastase de neutrófilos. Essa protease pode destruir a elastina na parede alveolar se não for contida pela ação do inibidor α 1-antitripsina. Como o tecido pulmonar não pode se regenerar, um processo de enfisema, asma, lesão pulmonar aguda ou fibrose cística podem ser desencadeados (CARDOSO *et al*, 2000).

2.2. *Crassula ovata*

C. ovata é uma planta ornamental e medicinal, conhecida popularmente como planta de jade ou árvore do dinheiro. A família *Crassulaceae* são dicotiledôneas com folhas suculentas, elípticas ou ovaladas, com pequenas flores brancas ou rosas. *C. ovata* é nativa da África do Sul, mas também é encontrada na China, Índia, Europa e América do Norte. Em muitas comunidades, a medicina tradicional utiliza o extrato aquoso desta planta para tratar verrugas, sintomas de diabetes, diarreia, epilepsia e também usado como purgante (MUIRURI *et al*, 2015; WANG *et al*, 2015).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Elastase de pâncreas de porco (E.C 3.4.21.36, ≥ 4 U/mg) e o substrato cromogênico N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich.

Preparação dos extratos aquoso e etanólico: Cerca de 10 g das folhas da planta foram secas por 72 horas em uma estufa à 40 °C e, posteriormente, moídas até a obtenção de um pó de aspecto uniforme. Em seguida, o material obtido foi transferido para um frasco de vidro e



misturado com 50 ml de etanol 95%, permanecendo em repouso por 12 horas. Após esse procedimento, a mistura foi filtrada em papel Whatman. Um líquido transparente e livre de partículas foi obtido. O mesmo procedimento foi utilizado para preparação do extrato aquoso.

Ensaio de inibição proteolítica: Uma mistura contendo 970 µL de tampão fosfato de sódio (50 mM, pH= 8), 10 µL de enzima (1mg/ml) e 10 µL de extrato de *C. ovata*, para uma concentração final variando de 0 (controle) para 328 µg/ml, foram incubados por 30 minutos à 25°C. Após esse tempo, foi adicionado 10 µL de substrato à mistura para uma concentração final de 10 µM. A hidrólise do substrato cromogênico foi acompanhada por 5 minutos e a liberação de p-nitroanilina (substância de cor amarela), foi medida à 410 nm usando um espectrofotômetro modelo V-M5 Bel Photonics.

O valor do parâmetro de inibição IC_{50} , que é a concentração de extrato que inibe 50% da atividade enzimática, foi determinado pelo *plote* da porcentagem de inibição versus log concentração de extrato e calculado por regressão não linear. A porcentagem de inibição foi calculada pela equação:

$$\% \text{ inibição} = (\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{extrato}} / \text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$$

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Como podemos observar pelo gráfico da figura 1, com o aumento da concentração do extrato, ocorre um aumento da inibição da atividade enzimática da elastase. Para uma concentração de 8 µg/ml de extrato (aquoso e etanólico) ocorreu inibição de 80% da atividade enzimática da elastase. Utilizando-se os dados da figura 1, foi calculado o IC_{50} . Tal parâmetro indica a quantidade de extrato que é necessária para inibir 50% da atividade da elastase. O IC_{50} calculado para os extratos aquoso e alcoólico foram de $1,7 \pm 0,1$ e $2,2 \pm 0,2$ µg respectivamente, indicando que a inibição do extrato aquoso sobre a elastase foi mais potente.

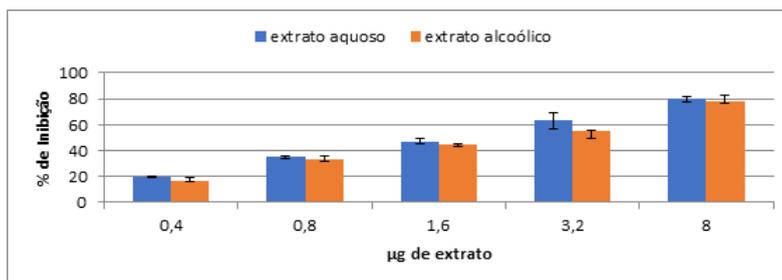


Figura 1: % de inibição da elastase por extrato etanólico de *C. ovata*. Barra de erros são expressados como desvio padrão, n=3.

5. CONCLUSÕES

Estes resultados preliminares mostram que a *C. ovata* pode ser uma fonte para prospecção de moléculas bioativas contra a ação da elastase. Para estudos mais detalhados, é necessário purificar e isolar esses possíveis inibidores, trabalho este que poderá gerar num futuro próximo um novo projeto de pesquisa.

6. REFERÊNCIAS

- CARDOSO, A. P.; LEMLE, A.; BETHLEM, N. Doenças pulmonares obstrutivas crônicas. In: **BETHLEM, N. Pneumologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, cap. 35, p.600-621, 2000
- CUCCIOLONI, M; MOZZICAFREDDO, M; ONFILI, L; CECARINI, V; ELEUTERI, A.M; ANGELETTI, M. Natural occurring polyphenols as template for drug design. Focus on serine proteases. **Chem Biol Drug Des**. V.74, p.1-15, 2009.
- IBANEZ, S.; GALLET, C.; DESPRÉS, L. Plant Insecticidal Toxins in Ecological Networks. **Toxins**, v.4, p. 228-243, 2012.
- JOHANSSON, S.U. Neutrophil multitarget functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products. **J. Nat. Prod.**, v. 65, p. 32-41, 2002
- MUIRURI, M. D.; MWANGI, W. Phytochemical and Antimicrobial Activity of (*Crassula ovata*) Jade Plant on Different Strains of Bacteria European. **Journal of Medicinal Plants**., v.11, p. 1-12, 2016.
- THOMSON, A.; KAPADIA, S.K. The Specificity of the S1 and S2 Subsites of Elastase, **Eur.J.Biochem**, v.102, p. 311-116, 1979
- SIEDLE, L.G.; GUSTAVSSON, L.; JOHANSSON, S.; MURILLO, R.; BOHLIN, L. The effect of sesquiterpene lactonas on the release of human neutrophil elastase. **Biochem. Pharmacol**, v. 7559, p. 1-7, 2003.
- WANG, Z.Q.; GUILLOT, D.; LÓPEZ-PUJOL, J. *Crassula ovata*, a new alien plant for mainland China. **Collectanea Botanica**, Barcelona, Spain, v.009, n.34, p.1-3, 2015. .