

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ELASTASE POR EXTRATOS DE SEDUM DENDROIDEUM : UM ESTUDO IN VITRO

Lais G. CASALOTI¹; Jorge A. N. SANTOS²

RESUMO

Proteases são enzimas que participam de muitos processos fisiológicos como a reciclagem de proteínas, sinalização celular, digestão de alimentos, coagulação sanguínea, cicatrização, resposta imunológica, diferenciação, e crescimento celular, entre outros. A elastase é uma protease controlada pelo inibidor $\alpha 1$ -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 extrato aquoso das folhas de *Sedum dendroideum* sobre a atividade enzimática da protease elastase. O extrato aquoso apresentou grande efeito inibitório sobre a atividade proteolítica da elastase, com valor de IC_{50} de $12,43 \text{ ug/ml} \pm 0,57$.

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). Levando em consideração os diversos metabólitos secundários encontrados na espécie *Sedum dendroideum*, e tendo em vista o seu potencial uso como planta medicinal, o objetivo do respectivo projeto foi avaliar o potencial de inibição de extratos das folhas de *Sedum dendroideum* sobre a atividade proteolítica da enzima elastase.

¹ Bolsista Fapemig- IFSULDEMINAS-Campus Inconfidentes- Email: lais00casaloti@gmail.com

² Orientador-IFSULDEMINAS-Campus Inconfidentes-Email:jorge.santos@ifsuldeminas.edu.br

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Elastase

A elastase é formada por uma cadeia polipeptídica contendo 240 aminoácidos e massa 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. *Sedum dendroideum*

Planta referente à ordem *Saxifrales*, *Sedum dendroideum* Moc. et Sessé ex DC. Crassulaceae é uma espécie perene, suculenta, sublenhosa e xerófita, originária da África do Sul, de clima tropical seco. No Brasil, está amplamente adaptada e é denominada popularmente de bálsamo. Suas folhas têm sido utilizadas para tratamento de inflamações cutâneas e contusões, e internamente para distúrbios gástricos, em razão das atividades emoliente e cicatrizante (MILANEZE & GONÇALVES, 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

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

Preparação do extrato aquoso: 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 água destilada, permanecendo em repouso por 12 horas. Após esse procedimento, a mistura foi filtrada em papel Whatman e um líquido transparente e livre de partículas foi obtido.

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 *Sedum Dendroideum*, 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 IC₅₀, 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 ± desvio padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Como podemos observar pelo gráfico da figura 1, o efeito de inibição sobre a atividade da elastase foi sempre crescente com o aumento da concentração do extrato. Para uma concentração de 20 µg/ml de extrato ocorreu inibição de 60% da atividade enzimática da enzima. O IC₅₀ calculado foi de 12,43 µg/ml ± 0,57. Como controle negativo foi utilizado de tampão fosfato de sódio (50 mM, pH= 8). O controle positivo (EGCG) apresentou IC₅₀ de 116 µg/ml ± 6,7.

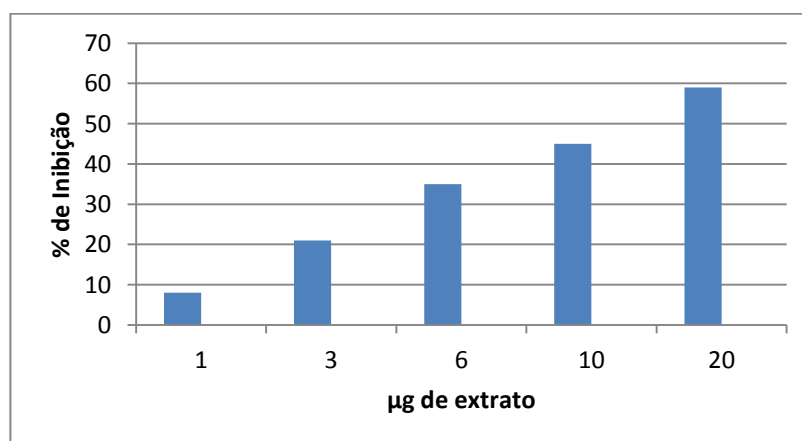


Figura 1: Gráfico da % de inibição *versus* concentração de extrato aquoso de *Sedum dendroideum*.

5. CONCLUSÕES

Estes resultados preliminares mostram que a *Sedum dendroideum* 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.

REFERÊNCIAS

- ANGELETTI, M. Natural occurring polyphenols as template for drug design. Focus on serine proteases. **Chem Biol Drug Des.** V.74, p.1–15,2009.
- 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; 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
- MILANEZE, M. A.; GONÇALVES, E. Caracterização morfo-anatômica das folhas de *Sedum dendroideum* DC, CRASSULACEAE In: Simpósio Brasileiro De Farmacognosia, 3., 2001, Curitiba. Anais. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmácia, Laboratório de Farmacognosia, 2001. p. FB-23.
- 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.