



7ª JORNADA CIENTÍFICA
E TECNOLÓGICA
DO IFSULDEMINAS
4º SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO
12 de novembro de 2015 | Poços de Caldas - MG

AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ELASTASE POR EXTRATOS DE PLANTAS

Fidelys Borges da SILVA¹; Jorge A. N. SANTOS²

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Câmpus Inconfidentes/MG - E-mail: fidelysmaia23@gmail.com

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Câmpus Inconfidentes/MG E-mail: Jorge.santos@ifsuldeminas.edu.br

RESUMO

O desequilíbrio entre a protease elastase e o seu inibidor endógeno está associada a diversas patologias como falência hepática, artrite reumatóide, psoríase, câncer de pele, arteriosclerose, enfisema, fibrose cística e asma. Esta protease é produzida em abundância por células sanguíneas chamadas neutrófilos, que desempenham um papel importante no sistema imunológico contra as bactérias, fungos e outros agentes nocivos ao organismo. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação inibitória *in vitro* de diversas espécies de plantas encontradas na escola fazenda do Câmpus Inconfidentes na forma de extratos aquosos sobre a atividade proteolítica da elastase comercial de pâncreas de porco. De um total de 19 espécies de plantas encontradas na escola fazenda, somente o extrato aquoso da espécie *Cordia Superba* apresentou atividade inibitória. A eficiência da inibição dos extratos sobre a elastase foi verificada através do cálculo do parâmetro cinético denominado IC₅₀. Tal parâmetro indica a quantidade de extrato que é necessária para inibir 50% da atividade proteolítica da elastase. O IC₅₀ calculado para os extrato aquoso foi de 85 ug.

INTRODUÇÃO

Essa enzima é uma serino protease da mesma família da tripsina humana, ou seja, para hidrolisar proteínas depende da tríade catalítica composta pelos aminoácidos serina, histidina e aspartato. 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 por inibidores proteicos endógenos, que incluem, o α 1-antitripsina e o α 2-macroglobulina. Apesar disso, em alguns processos inflamatórios pode ocorrer atividade exacerbada dos neutrófilos que acaba gerando um desequilíbrio elastase-inibidores endógenos (SIEDLE, *et al.*, 2003). A consequência deste desequilíbrio é deficiência do inibidor α 1-antitripsina. 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).

MATERIAL E MÉTODOS

Para os testes de inibição sobre a enzima elastase foram utilizadas 19 espécies de plantas encontradas na escola fazenda : *Cordia Superba*, *Myrsine intermedia*, *Pipoli Diospyros kaki*, *Annona squamosa L.*, *Annona muricata L.*, *Anacardium occidentale*, *Vitis labrusca*, *Posoqueira Calantha* , *Eugenia pyriformis* Cabes, *Maclura tinctoria*, *Mangífera indica*, *Euphorbia ingens*, *Hydrangea macrophylla* ,*Dracena reflexa* *Gallesia integrifolia* ,*Melia azedarach*, *Chamaecyparis pisifera*, *Geissospermum laevis Miers* e *Bryophyllum saylcinum salisb*. Com exceção da *Cordia superba*, onde a polpa da fruta foi testada nos ensaios de inibição, todas as outras plantas foram utilizadas as folhas para os testes inibitórios. A polpa da fruta e as folhas foram coletadas, secas, trituradas e pesadas. O triturado obtido foi macerado por três dias em água destilada a temperatura ambiente, sendo depois filtrados em papel wathman nº 1. Depois desse procedimento, todo material foi seco e determinou-se o teor de sólidos

solúveis em água. Para os ensaios de inibição, elastase 1 nM foi incubada com volumes de 2, 5, 10, 20 e 40 microlitros dos extratos aquosos por 5 minutos com o substrato Succinil-ala-ala-ala-p-nitroanilida 5mM em tampão fosfato pH 8, temperatura ambiente de 25 °C e volume total de 1 ml. A concentração de p-nitrofenol livre foi determinada medindo a absorbância a 410 nm através de um espectrofotômetro utilizando cubetas de plástico com caminho óptico de 10 mm e volume de 1 ml (OKADA et al., 1981; KAPADIA & THOMSON, 1979). O parâmetro cinético IC₅₀ foi calculado medindo-se a diminuição da absorbância em relação à um controle utilizando-se o software Grafit 5.0 (LEATHERBARROW, 1992). Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Somente os extratos obtidos da polpa da *Cordia superba* mostraram efeitos inibitórios sobre a atividade proteolítica da elastase.

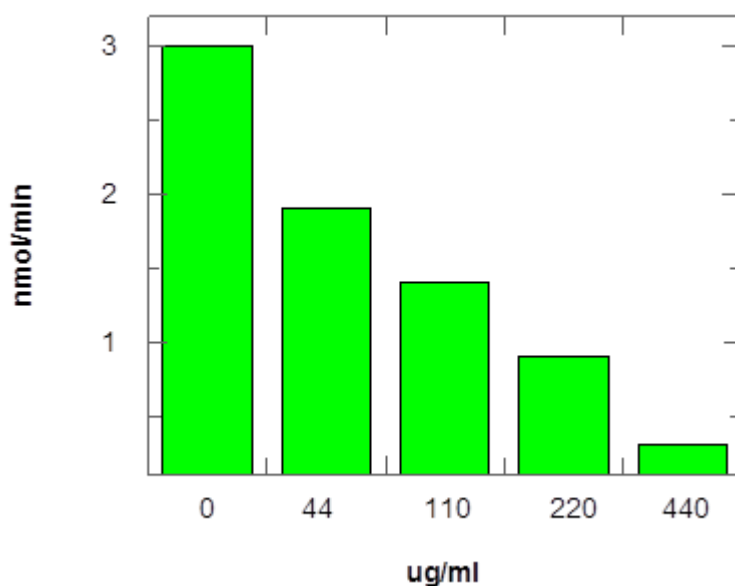


Figura 1. Atividade enzimática da elastase em função da concentração de extrato aquoso de *Cordia superba*.

Como podemos observar através do gráfico da figura 1, com o aumento da concentração do extrato aquoso, ocorre uma diminuição da atividade da enzima, ou seja, uma diminuição da velocidade de hidrólise do substrato (em nmol/min). A eficiência da inibição dos extratos sobre a elastase foi verificada

através do cálculo do parâmetro cinético denominado IC₅₀. Tal parâmetro indica a quantidade de extrato que é necessária para inibir 50% da atividade da elastase. O IC₅₀ calculado para os extrato aquoso foi de 85 ug.

CONCLUSÕES

Estes resultados preliminares mostram que a *Cordia superba* pode ser uma fonte de uma ou mais moléculas que inibem 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

JOHANSSON, S.U., Neutrophil multitarget functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products. **J. Nat. Prod.**, 2002, vol. 65, p. 32-41

LEATHERBARROW, R.J., GraFit Version 5.0., **Erithacus Software Ltd, Staines**, U.K. 1992.

OKADA, Y., MATSUDA, Y., NAGAMATSU, Y. E OKAMOTO, U., Synthesis of substrates specific for human spleen fibrinolytic proteinase. **Int. J. Peptide Protein Res.**, 1981, vol. 17, p. 560-564.

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**, 2003, vol. 7559, p. 1-7.

THOMSON, A., KAPADIA, S.K., The specificity of the S1 and S2 subsites of elastase, **Eur.J.Biochem**, 1979, vol.102, p. 311-116.