



## INIBIÇÃO DA ELASTASE POR EXTRATOS FOLIARES AQUOSOS E ETANÓLICOS DE *SEDUM DENDROIDEUM*: Um estudo *in vitro*

Giovana Figueiredo Romero<sup>1</sup>; Lais Guadalupe Casaloti<sup>2</sup>; Jorge Alexandre Nogueira Santos<sup>3</sup>

### RESUMO

A atividade desregulada de enzimas em seres humanos está relacionada com uma série de doenças. A elastase é uma enzima controlada pelo inibidor  $\alpha$ 1-antitripsina (AAT) que é produzida naturalmente pelo fígado. Mutações no gene SERPINA 1 causam deficiência desse inibidor e a consequência disso é o aparecimento de diversas patologias como enfisema pulmonar, artrite reumatoide e fibrose cística que estão relacionadas com a ação enzimática desregulada da elastase. Dado que espécies vegetais são fontes promissoras para a descoberta de novos fármacos, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito inibitório de extratos aquosos e etanólicos de *Sedum dendroideum* sobre a atividade enzimática da elastase. Através de ensaios enzimáticos de inibição foram encontrados valores de IC<sub>50</sub> de  $13.2 \pm 1.2 \mu\text{g/ml}$  (extrato aquoso) e  $1.9 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$  (extrato etanólico). Estes resultados sugerem que os extratos de *Sedum dendroideum* podem ser uma fonte potencial de compostos bioativos para a descoberta de novos inibidores para a elastase.

**Palavras-chave:** Elastase; Neutrófilos; Proteases.

### 1. INTRODUÇÃO

A elastase é uma enzima proteolítica produzida principalmente pelo pâncreas e neutrófilos, e possui a propriedade de hidrolisar componentes proteicos da matriz extracelular, como colágeno, elastina, laminina e proteoglicanos. A atividade proteolítica da elastase neutrofílica é estritamente regulada pelo inibidor proteico endógeno denominado  $\alpha$ -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 gera lesões teciduais em diversos órgãos, já que esta enzima é a principal protease liberada pelos neutrófilos em processos inflamatórios. A ação desregulada da elastase está relacionada com uma série de doenças como falência hepática, artrite reumatoide, psoríase, câncer de pele, arteriosclerose e diversas patologias pulmonares (Johansson, 2002). 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 de proteases. Para se proteger contra animais e insetos herbívoros, as plantas geralmente produzem metabólitos secundários que incluem terpenos, polifenóis, taninos, peptídeos e proteínas (Ibanez; Gallet; Després, 2012). Muitos desses metabólitos são de inibidores de proteases

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/FAPEMIG, IFSULDEMINAS – *Campus* Inconfidentes. E-mail: giovanaromero@outlook.com.br

<sup>2</sup>Discente do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, IFSULDEMINAS – *Campus* Inconfidentes. E-mail: lais00casaloti@gmail.com

<sup>3</sup>Orientador, IFSULDEMINAS – *Campus* Inconfidentes. E-mail: Jorge.santos@ifsuldeminas.edu.br.

e provocam uma diminuição do processo de absorção dos aminoácidos essenciais para o desenvolvimento dos insetos (Cuccioloni *et al.*, 2009). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de extratos aquosos e etanólicos brutos das folhas da espécie *Sedum dendroideum* sobre a atividade enzimática da elastase. Popularmente conhecida como bálsamo, a espécie *Sedum dendroideum* é uma planta da família *Crassulaceae*. É uma espécie perene, suculenta, sublenhosa e xerófita, originária da África do Sul. No Brasil, está amplamente adaptada e é denominada popularmente de bálsamo. O sumo de suas folhas tem sido utilizado para tratamento de inflamações cutâneas e contusões, e internamente para distúrbios gástricos, em razão das atividades emoliente e cicatrizante dessa planta (Milaneze e Gonçalves, 2001).

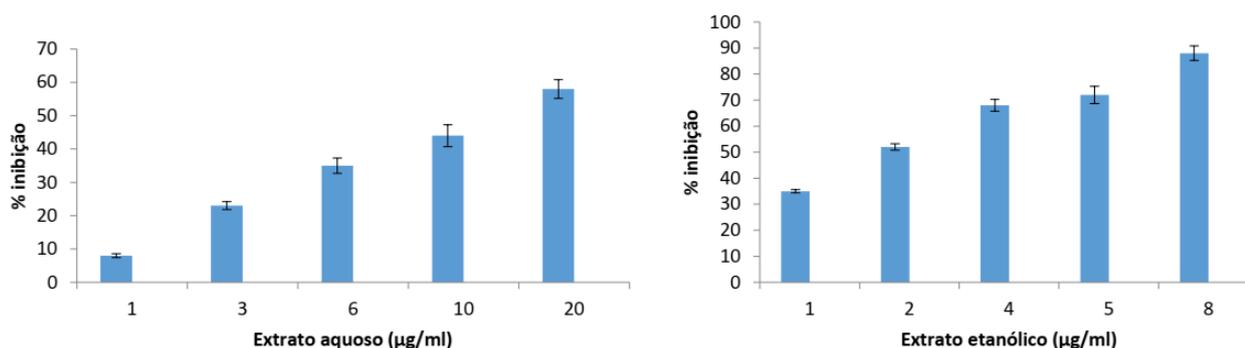
## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Cerca de 10 g das folhas de *Sedum dendroideum* foram secas por 72 horas em uma estufa a 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 n° 1 e um líquido transparente e livre de partículas foram obtidos. O mesmo procedimento foi utilizado para a preparação do extrato etanólico, entretanto no lugar de água destilada foi utilizado etanol 99 %. Para os ensaios de inibição foram utilizados a enzima elastase de pâncreas de porco (E.C 3.4.21.36,  $\geq 4\text{U/mg}$ ) e seu substrato cromogênico N-Succinil-AlaAla-Ala-p-nitroanilida (Thomson & Kapadia, 1979) que foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich. A enzima (na concentração final de 10  $\mu\text{g/ml}$ ) foi incubada em tampão fosfato de sódio (50 mM, pH= 8) com os extratos da planta em diferentes concentrações (variação de 1 para 20  $\mu\text{g/ml}$  para o extrato aquoso e variação de 1 para 8  $\mu\text{g/ml}$  para o extrato etanólico) à 25° C para um volume total final de 990  $\mu\text{l}$ . Após 30 minutos, 10  $\mu\text{L}$  de substrato para uma concentração final de 10  $\mu\text{M}$  foi adicionado na mistura e a hidrólise do substrato cromogênico foi monitorada por 5 minutos utilizando-se um espectrofotômetro V-M5 Bel Photonics no comprimento de onda de 410 nm. Como controle negativo foi utilizado tampão fosfato 50 mM, pH 8, e como controle positivo epigallocatequina-3-galato. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Os valores do parâmetro de inibição  $\text{IC}_{50}$ , que é a concentração de extrato que inibe 50% da atividade enzimática, foram determinados pela porcentagem de inibição remanescente versus a concentração de extrato e calculados por regressão não linear. A porcentagem de inibição foi calculada pela equação:

$$\% \text{ inibição} = |\text{Abs controle} - \text{Abs extrato}| / \text{Abs controle} \times 100\%$$

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os gráficos da figura 1 apresentam a porcentagem de inibição em função de diferentes concentrações de extratos aquosos e etanólicos de *Sedum dendroideum*. Esses extratos inibiram a elastase com diferentes intensidades. Conforme é mostrado na figura 1, na concentração de 20 µg/ml de extrato aquoso ocorreu inibição de 59 % da atividade enzimática da elastase. Para os extratos etanólicos podemos observar que a maior inibição (88%) ocorreu na concentração 8 µg/ml.



**Figura 1.** % de inibição da elastase por extratos aquosos e etanólicos de *Sedum dendroideum*. Barras de erros são expressadas como desvio padrão, n=3.

Dos resultados gerados pelos gráficos da figura 1 foram calculados os valores de IC<sub>50</sub> para os dois extratos, sendo  $13,2 \pm 1,2$  µg/ml para o extrato aquoso) e  $1,9 \pm 0,1$  µg/ml para o extrato etanólico. Esses resultados indicam que o extrato etanólico apresentou melhor poder de inibição sobre a elastase que o extrato aquoso. Estudos de análise fitoquímica mostraram que o gênero *Sedum* produz uma grande variedade de metabólitos secundários como glicoalcalóides, flavonóides, terpenóides carboidratos e antroquinonas (Sendl *et al.*, 1993; Aimin *et al.*,1998). Esses compostos provavelmente estão envolvidos no processo de inibição da elastase e podem explicar os resultados encontrados em nosso trabalho. Flavonóides como inibidores de proteases, incluindo tripsina e elastase, são descritos por diversos autores (Sin e Kim, 2005; Middleton; Kandaswami; Theoharides, 2000).

### 4. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que os extratos aquosos e etanólicos de *Sedum dendroideum* inibem de maneira significativa a atividade enzimática da elastase. É necessário estudos mais específicos para identificar e isolar os possíveis compostos bioativos nos extratos da *Sedum dendroideum*.

## 5. REFERÊNCIAS

AIMIN, H.; MINGSHI, W.; HONGYAN, H.; DECHENG, Z.; LEE, K. H. Hepatoprotective triterpenes from *Sedum sarmentosum*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 49, n. 8, p. 2607-10, 1998.

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.**, 74: 1–15, 2009.

IBANEZ, S., GALLET, C., DESPRÉS, L., Plant Insecticidal Toxins in Ecological Networks. **Toxins.**, 4: 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.

MIDDLETON, E., KANDASWAMI, C., THEOHARIDES, T.C., The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease and Cancer. **Pharmacol Rev.**, 52:673-75, 2000.

MILANEZE, M. A.; GONÇALVES, E. Caracterização morfo-anatômica das folhas de *Sedum dendroideum*, **Simpósio Brasileiro De Farmacognosia**, 3., 2001, Curitiba. Anais. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmácia, Laboratório de Farmacognosia, p.23., 2001

SENDL, A.; MULINACCI, N.; VINCIERI, F. F.; WAGNER, H. Anti-inflammatory and immunologically active polysaccharides of *Sedum telephium*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 1357-62, 1993.

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.

SIN, B.Y., KIM, H.P., Inhibition of collagenase by naturally-occurring flavonoids. **Archives of Pharmacal Research.**, 28(10): 1152-1155, 2005.