

ISSN: 2319-0124

AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE *CRASSULA OVATA* SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PROTEASE M^{PRO} DO SARS-COV- 2: um estudo *in vitro*

Karen E. BARBOSA¹; Luana C. DAS GRAÇAS²; Jorge A.N. SANTOS³

RESUMO

O SARS-COV-2 promove infecções respiratórias em seres humanos, afetando principalmente os grupos vulneráveis, no qual possui uma maior taxa de mortalidade. Uma vez que não há um fármaco eficaz que seja capaz de conter a infecção, evidencia-se, então, a importância de obtenção de novas estratégias que visem o controle do agente infeccioso, de forma segura e não tóxica ao paciente. A enzima M^{pro}, nesse contexto, consiste numa protease chave porque realiza a clivagem de poliproteínas cruciais para o desenvolvimento do vírus, sendo que uma possível inibição dessa enzima é capaz de parar a progressão da infecção. As plantas, por serem de fácil obtenção, baixo custo e produzirem metabólitos secundários bioativos, se tornaram alvo de estudos para a obtenção de inibidores de proteases. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a ação inibitória *in vitro* dos extratos aquosos e etanólicos de *Crassula Ovata* sobre a atividade proteolítica da M^{pro}. O extrato aquoso, nesse sentido, apresentou relevante inibição, com IC₅₀ = 357,6 ± 25,9, enquanto o extrato alcoólico apresentou IC₅₀ de 156,7 ± 20,7.

Palavras-chave:

Enzimas; Inibição; Covid-19; IC₅₀.

1. INTRODUÇÃO

Em 2019, eclodiu em Wuhan, na China, o novo Coronavírus, atualmente denominado como síndrome respiratória aguda grave de Coronavírus (SARS-CoV-2). Com potencial de gerar doença respiratória aguda grave em aproximadamente 15% dos indivíduos infectados e letalidade em 4% dos casos, a doença, em status pandêmico, tem maiores efeitos dentro dos grupos vulneráveis (idosos ou imunocomprometidos) e portadores de doenças subjacentes. Nesses casos, esse percentual se eleva e a infecção se torna mais letal (BANERJEE et al., 2020).

O agente causador da COVID-19 é o SARS-CoV-2, um vírus de RNA de fita simples (+ssRNA) pertencente à família Coronaviridae com capacidade de se espalhar entre humanos e animais (MACNAUGHTON e MADGE 1978). Depois da entrada do vírus na célula, a infecção progride para a tradução do RNA viral em duas poliproteínas pp1a e pp1ab (CITARELLA et al., 2021). Essas poliproteínas, no entanto, precisam ser processadas, papel executado pela protease principal do agente infeccioso, também chamada de M^{pro}. O estudo de compostos bioativos em espécies vegetais, nesse sentido, se tornou a principal e mais promissora fonte de novas moléculas de interesse clínico com potencial para inibição de proteases (OLIVEIRA et al. 2008). As plantas, nesse contexto, são importantes porque fornecem uma grande variedade de substâncias capazes de

¹ Estudante, USP – Campus Ribeirão Preto. E-mail: karen.barbosa34@usp.br

² Estudante, IFSULDEMINAS – Campus Inconfidentes. Email: luana.carolino@alunos.ifsuldeminas.edu.br

³ Orientador, IFSULDEMINAS – Campus Inconfidentes. E-mail: jorge.santos@ifsuldeminas.edu.br

auxiliar na resolução de muitos enigmas de uma série de doenças virais (GANJHU et al, 2015). E tendo em vista a presença dessas substâncias, é que se justifica o respectivo trabalho, que será avaliar se extratos de *Crassula Ovata* possuem potencial de inibição sobre a atividade dessa enzima.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. M^{pro}

A enzima M^{pro} é uma cisteíno- protease com capacidade de clivar as poliproteínas produzidas pelo vírus (DAI et al, 2020). Esse processo permite o surgimento de 12 proteínas não estruturais (Nsp4-Nsp16), incluindo a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp, Nsp12) e a helicase (Nsp13) (ZHANG et al, 2020). A enzima, então, libera proteínas virais funcionais e corresponde a uma peça chave para a replicação do vírus. Um bloqueio da M^{pro}, nesse contexto, iria parar a continuidade da infecção pelo SARS-CoV-2 (ADEM, et al. 2020).

Apesar de a vacinação contra Covid-19 ter avançado em vários países do mundo, inclusive no Brasil, ainda há uma preocupação para o desenvolvimento de um medicamento que evite a evolução para a forma grave da doença. Isso advém do fato de que a proteção contra a infecção reduz à medida que o nível de anticorpos séricos diminui alguns meses após a última dose (MOHAMED, et al. 2022). Ao mesmo tempo, a circulação de variantes altamente transmissíveis, como Delta e Omicron podem aumentar ainda mais o risco de indivíduos vacinados contrair SARS-CoV-2 (ANDREWS, et al. 2022). É sabido que ainda não há fármacos eficazes que sejam capazes de conter a infecção evidenciando, então, a importância de obtenção de novas estratégias que visem o controle dos sintomas da doença de forma segura e não tóxica (QIAO et al, 2021).

2.2. *Crassula Ovata*

A planta *Crassula ovata*, pertencente à ordem Rosales e à família Crassulaceae, conhecida popularmente como planta de jade, é utilizada em muitas comunidades para o tratamento de diversas enfermidades (MUIRURI et al, 2015) Considerando o amplo uso da planta, é que se evidencia o objetivo do trabalho, que avaliou se extratos aquosos e etanólicos das folhas de *C. Ovata* possuem potencial de inibição sobre a atividade proteolítica da enzima M^{pro}.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Folhas frescas e sadias de *C. ovata* foram coletadas no Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais (latitude 22° 19' 02" e longitude 46° 19 ' 42"), localizado no município de Inconfidentes. 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 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. A mistura foi filtrada em papel Whatman n° 1 e um líquido

transparente e livre de partículas foi obtido. O mesmo procedimento foi utilizado para preparação do extrato etanólico, com etanol absoluto 99,5%.

Para a realização dos ensaios de inibição, a enzima M^{pro} , adquirida da empresa Sigma Aldrich, foi incubada na concentração de 80 ng/mL por 30 minutos em diferentes concentrações do extrato aquoso (variação de 22,3 a 713,6 $\mu\text{g/ml}$) e etanólico (variação de 12,7 a 406,4 $\mu\text{g/ml}$) utilizando tampão fosfato de sódio 50 mM, pH= 7,0 em temperatura ambiente. Para a realização dos ensaios foi utilizado o substrato sintético Thr-Ser-Val-Leu-Gln-pNA na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente à adição do substrato, prosseguiu-se a incubação por mais 5 minutos. A reação foi cessada pela adição de ácido acético 30% e a concentração de p-nitrofenol livre foi determinada medindo a absorbância a 410 nm através de um espectrofotômetro modelo V-M5 (Bel Photonics).

A eficiência da inibição da enzima foi verificada através do cálculo do parâmetro denominado IC50. Tal parâmetro indica a quantidade de extrato vegetal necessário para inibir 50% da atividade da M^{pro} . Isso foi calculado medindo-se a diminuição da absorbância em relação ao controle por meio de um espectrofotômetro, utilizando-se cubetas de plástico com caminho óptico de 10 mm e volume de 1 ml. O parâmetro de inibição IC50 foi calculado pela regressão não linear do plote da porcentagem de inibição versus a concentração de extratos utilizando-se o software Grafit 5.0. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. Os dados foram apresentados em termos de média \pm desvio padrão. $\% \text{ inibição} = |Abs \text{ controle} - Abs \text{ extrato}| / Abs \text{ controle} \times 100\%$

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Ambos os extratos utilizados de *C. Ovata* utilizados nos experimentos apresentaram inibição sobre a atividade da M^{pro} como observado nos gráficos abaixo. Para o extrato aquoso (Figura 1) foi observado inibição de 53,4 % na concentração de 713,6 $\mu\text{g/ml}$, com IC_{50} de $357,6 \pm 25,9 \mu\text{g/ml}$. O extrato etanólico (Figura 2) apresentou inibição de 61,2 % na concentração de 406,4 $\mu\text{g/ml}$, com IC_{50} de $156,7 \pm 20,7 \mu\text{g/ml}$.

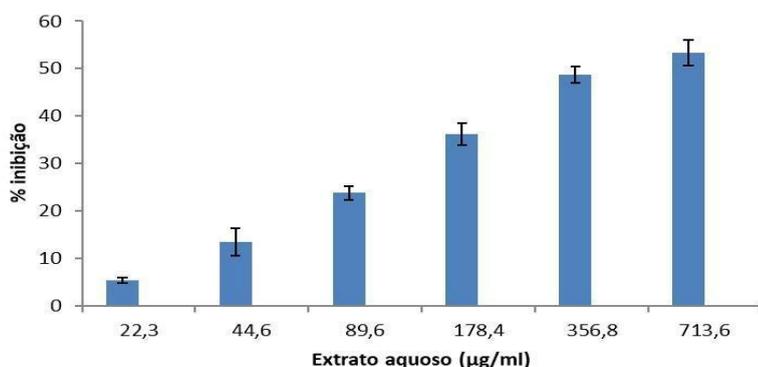


Figura 1. % de inibição da M^{pro} por

extrato aquoso de *C. Ovata*. Dados são expressos como desvio padrão, n=3.

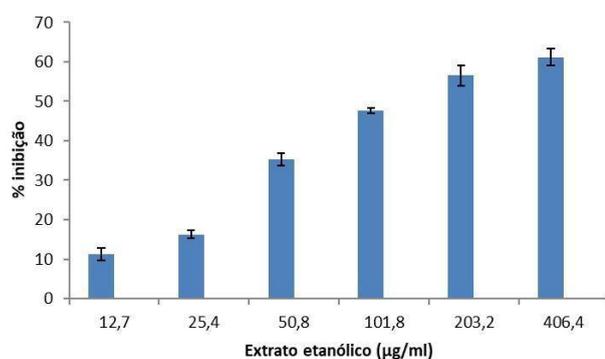


Figura 2. % de inibição da M^{pro} por extrato etanólico de *C. Ovata*. Dados são expressos como desvio padrão, n=3.

5. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho mostraram que os extratos brutos aquosos e etanólicos de *C. Ovata* apresentaram inibição significativa sobre a atividade enzimática da M^{pro}.

6. REFERÊNCIAS

ADEM, S et al. Identification of potent COVID-19 main protease (Mpro) inhibitors from natural polyphenols: an in silico strategy unveils a hope against CORONA. **Preprints**, 2020.

ANDREWS, N.; STOWE, J.; TOFFAET, S.; Covid-19 vaccine effectiveness against the Omicron (B. 1.1. 529) variant. **New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 16, p. 1532-1546, 2022.

BANERJEE, A.; PASEA, L.; PAGEL, C.; Estimating excess 1-year mortality from COVID-19 according to underlying conditions and age in England: a rapid analysis using NHS health records in 3.8 million adults. **MedRxiv**, 2020.

CITARELLA, A.; SCALA, A.; PIPPERNO, A.; SARS-CoV-2 Mpro: a potential target for peptidomimetics and small-molecule inhibitors. **Biomolecules**, v. 11, n. 4, p. 607, 2021.

DAI, W.; ZHANG, B.; LIU, H.; PENG, J.; Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease. **Science**, v. 368, n. 6497, p. 1331-1335, 2020.

GANJHU, R. K., MUDGAL, P. P., MAITY, H., DOWARHA, D., DEVADIGA, S., NAG, S., ARUNKUMAR, G. Herbal plants and plant preparations as remedial approach for viral diseases. **Virus Disease**, v. 26, n. 4, p. 225-236, 2015.

MACNAUGHTON, M. R.; MADGE, M. H. The genome of human coronavirus strain 229E. **Journal of General Virology**, v. 39, n. 3, p. 497-504, 1978.

MOHAMED, K et al. COVID-19 vaccinations: The unknowns, challenges, and hopes. **Journal of medical virology**, v. 94, n. 4, p. 1336-1349, 2022.

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.

OLIVEIRA, R. B. D. et al. Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax. e de suas frações em camundongos albinos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 485-491, 2008.

QIAO, J.; LI, Y.S.; ZENG, R.; LIU, F.L.; WANG, Y.F.; QUAN, B., SARS-CoV-2 Mpro inhibitors with antiviral activity in a transgenic mouse model. **Science**, v. 371, n. 6536, p. 1374-1378, 2021.

ZHANG, L et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. **Science**, v. 368, n. 6489, p. 409-412, 2020.