

OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ELASTASE PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO *IN VITRO* DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Pedro Arthur Coelho Smith¹, Julianne Soares Jardim Lacerda Batista², Fabiana Vieira Lima
Solino Pessoa³, Paola Rocha Gonçalves⁴

Ciências da Saúde

Introdução e Objetivo

O processo inflamatório envolve uma cascata de eventos fisiológicos que levam à liberação de mediadores inflamatórios, influenciando a produção de ácido araquidônico (ETIENNE *et al.*, 2020). Esse ácido graxo é substrato da ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase (LOX), enzimas que desempenham papéis cruciais na inflamação (Kumar *et al.*, 2023). Além da COX e LOX, proteinases também desempenham um papel essencial na modulação da resposta inflamatória. As proteinases fazem parte da imunidade inata, regulam a ativação e degradação de moléculas pró-inflamatórias, mas quando ativadas de forma não controlada podem levar ao desenvolvimento de doenças crônicas, como aterosclerose e câncer. Por isto, o equilíbrio na regulação de vias inflamatórias pode prevenir o surgimento de patologias associadas à inflamação exacerbada (Mancek-Keber, 2014).

Entre as proteinases envolvidas no processo inflamatório, destaca-se a elastase que é uma serina proteinase liberada por neutrófilos responsáveis pela degradação da elastina da matriz extracelular, podendo clivar também colágeno, fibronectina e outras proteínas matriciais (Barros, 2012). A sua ação proteolítica pode levar à destruição da matriz extracelular induzindo ao dano tecidual, aumentando a permeabilidade vascular e facilitando a infiltração de células inflamatórias (Kumar *et al.*, 2023). Considerando a relevância desta protease na inflamação, pesquisas direcionadas para elucidação dos mecanismos e descoberta de potenciais inibidores da enzima são essenciais, visto que podem contribuir para o avanço do tratamento e controle do processo inflamatório. Neste contexto, uma das alternativas para

¹ Graduando em Farmácia, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES/CEUNES,

² Doutorado em Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES/CEUNES, julianne.lacerda@ufes.br;

³ Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES/CEUNES. fabiana.v.lima@ufes.br;

⁴ Doutorado em Biologia Funcional e Molecular - Bioquímica, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES/CEUNES, paola.goncalves@ufes.br;

este estudo é o ensaio de inibição da elastase *in vitro* que é amplamente difundido na literatura científica, apresentando diferentes adaptações metodológicas, com resultados satisfatórios (MOTA *et al.*, 2021; ROMERO *et al.*, 2024; JESUS *et al.*, 2024). A reprodutibilidade do teste depende de uma série de fatores, incluindo fatores intrínsecos às amostras testadas e das condições favoráveis para que a reação enzimática aconteça. Assim, o objetivo do presente trabalho é apresentar os resultados iniciais da otimização do ensaio de inibição da elastase *in vitro*, transposto para microplaca, como modelo para análise do potencial anti-inflamatório de compostos químicos.

Materiais e Métodos

A determinação do potencial anti-inflamatório pelo ensaio *in vitro* de inibição da elastase foi realizada, no laboratório de Bioquímica (DCS/CEUNES/UFES), conforme metodologia adaptada de Thring *et al.* (2009) e Mota *et al.* (2021). Para os testes foram utilizados: a enzima elastase pancreática suína (ELA) (Sigma®, código 3507.90.39) e o substrato: N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida (SUC) (Sigma®, código 2924.29.99). O ensaio foi realizado em microplacas com 96 poços em meio reacional, com volume final de 250µL/poço, preparado em tampão fosfato (PBS) ou TRIS-HCL (em pH = 7,0). Para a determinação do controle foram adicionados aos poços soluções de ELA (0,0209 U/mL) e SUC (100 µM). Neste ensaio utilizamos como inibidores enzimáticos ácido ascórbico (ASC) a 10 mg/mL e epigallocatequina-3-galato (EGCG) (Sigma®, código 989-51-5), na concentração de 0,114 mg/mL. Para avaliação da inibição, foram adicionados ao sistema ELA e SUC, 30µL de solução de cada inibidor.

Após o preparo, as microplacas foram incubadas à 37° C por 50 min, com posterior leitura em leitor de microplacas Kasuaki® (DR-200BN) a 405nm. A absorbância foi detectada de forma pontual e, também verificada, por mais 40 min, em 5 intervalos de tempo diferentes de forma contínua. A porcentagem de inibição foi calculada pela equação:

$$\% \text{ inibição da elastase [I-ELA(\%)]} = [\text{Abs controle} - \text{Abs (amostra)}] / \text{Abs controle} \times 100$$

Discussão e Resultados

O ensaio enzimático é fundamentado pela clivagem do substrato SUC pela enzima ELA, levando à formação do composto a p-nitroanilina (pNA), que é detectado a 405nm. Nas análises realizadas foi possível a detecção espectrofotométrica do cromóforo nos ensaios, na presença e na ausência do inibidor EGCG. Embora os valores das absorbâncias detectados

tenham sido baixos, quando comparado ao desejável em outros estudos (Mota *et al.*, 2021), foi observado um aumento constante e linear de formação da pNA, em função do tempo ($R^2 = 0,9874$). Tal fato atestou que a reação enzimática havia ocorrido, abrindo oportunidade para realização de novos ensaios com adequações no meio reacional (**Figura 1 A e B**).

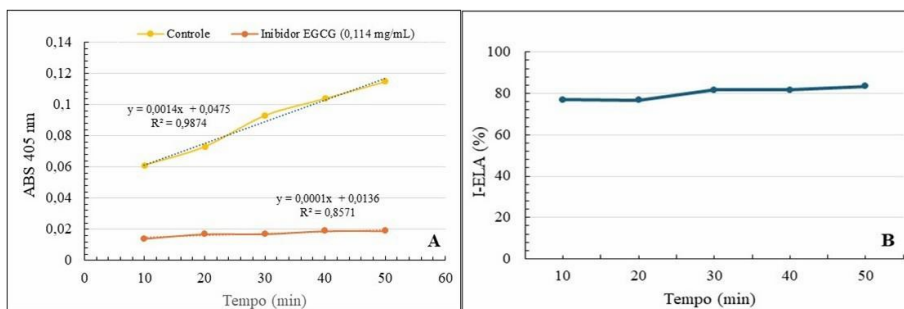


Figura 1. Padronização do ensaio de inibição de ELA. (A) Atividade da enzima em função do tempo, na presença e na ausência de EGCG em TRIS-HCl. (B) I-ELA(%) pela EGCG, em função do tempo.

A validação desta etapa do teste foi verificada empregando o inibidor EGCG que levou a I-ELA(%) de 80,0%, logo nos primeiros 10 minutos, mantendo a inibição durante todo o período avaliado. O EGCG é um flavonoide não tóxico, bastante empregado como inibidor de ELA, sendo usado como referência no teste de inibição da elastase (Sator *et al.*, 2002; Jesus *et al.*, 2024). No presente estudo, foi testado também ASC como outra alternativa de inibidor controle para o método testado, apresentando I-ELA(%) superior ao EGCG: cerca de 90,0% de inibição ao longo do tempo, a 10 mg/mL (**Figura 2**). Arifah *et al.* (2025) investigaram a capacidade de um extrato vegetal em inibir a elastase e compararam o percentual de inibição dos extratos com ASC, o qual apresentou aproximadamente 90% de inibição na concentração de 200 µg/mL. Embora ASC não atue diretamente no sítio ativo da elastase (o que pode ser observado pelo *Docking* molecular, dados não apresentados) é possível observar notória inibição de ELA *in vitro*, com mecanismo ainda não elucidado. *In vivo*, o ASC promove inibição indireta de ELA por reduzir o estresse oxidativo, modulando a ativação neutrofílica e protegendo a matriz extracelular (Pullar *et al.*, 2017).

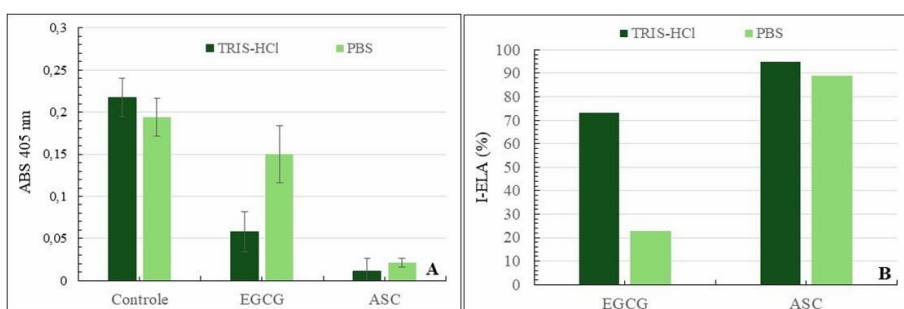


Figura 2. Padronização do ensaio de inibição da atividade da Elastase em tampão TRIS-HCl e PBS. Em (A) Atividade enzimática de ELA na presença e na ausência de EGCG e ASC. Em (B) Percentual de inibição da enzima elastase pela EGCG e ASC.

Na **Figura 2**, observa-se que a atividade da ELA varia qualitativamente dependendo do sistema tampão utilizado. Essa variação está alinhada com a literatura, que mostra que tampões diferentes podem afetar os parâmetros cinéticos de enzimas (Forero *et al*, 2023), reforçando a necessidade de padronização de condições nos ensaios. Na **Figura 2A**, mostra que a atividade de ELA foi maior em TRIS-HCl, em comparação ao PBS. Na presença dos inibidores, a produção de pNA manteve-se mais elevada em PBS, com EGCG, indicando menor eficácia do inibidor neste tampão. Enquanto que ASC levou à redução da formação do produto da reação enzimática, demonstrando eficiência para a inibição de ELA, em ambos sistemas de tamponamento.

Ainda, a **Figura 2B** revelou que o ASC apresentou maior porcentagem de inibição em relação ao EGCG, em ambos tampões, atingindo valores próximos de 95%. Uma vez que os inibidores apresentam mecanismos inibitórios distintos, essa diferença pode estar relacionada à capacidade antioxidante de ASC de potencializar essa inibição, não requerendo interação direta com a estrutura da proteína. Este resultado mostrou também que EGCG em PBS apresentou baixíssimo potencial de inibição de ELA (20%), em comparação ao sistema tampão TRIS-HCl onde apresentou atividade inibitória em torno de 70%. Esse resultado pode ser decorrente ao favorecimento da degradação do flavonoide em tampão fosfato, à 37°C (Dube et al, 2010), que perde a sua capacidade de inibir ELA.

Considerações Finais

Os dados apresentados mostraram que o ensaio *in vitro* tem o melhor desempenho quando o sistema ELA e SUC é colocado em TRIS-HCl, a 37°C. Nas próximas etapas da pesquisa, análises relacionadas à temperatura de reação e verificação da estabilidade de compostos químicos nos diferentes tampões serão realizadas. Neste estudo foi mostrada a sensibilidade do método, visto à expressiva inibição de ELA na presença EGCG e ASC que tem mecanismos de inibição distintos. Outras análises serão realizadas visando padronização metodológica da técnica, visando o seu uso como um promissor modelo para estudos de potencial propriedade anti-inflamatória de substâncias bioativas.

Agradecimentos

À FAPES pelos recursos para realização da pesquisa. Ao Evando Barbosa pelo apoio técnico no Laboratório de Bioquímica (DCS/CEUNES/UFES).

Referências

- ARIFAH N.Z., HELIANTI D., EFENDI E. **Anti-Elastase Potencial in Vitro of Koro Komak (Lablab Purpureus) Extract as Anti-Aging Protection**. Journal of Social Research. v.4, n.7, p.1946-1958, 2025. DOI: <https://doi.org/10.55324/josr.v4i7.2698>.
- BARROS A.O. **Avaliação das atividades antioxidantes e inibitória sobre as enzimas elastase e collagenase e hialuronidase da libidibia ferrea MART**. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.
- DUBE A., KEN N.G., NICOLAZZO J.A, LARSON I. **Effective use of reducing agents and nanoparticle encapsulation in stabilizing catechins in alkaline solution**. Food Chemistry. v.122, v.3, p.662-667, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.027>.
- ETIENNE R., VIEGAS F.P.D, VIEGAS Jr. C. **Aspectos fisiopatológicos da inflamação e o planejamento de fármacos: uma visão geral atualizada**. Revista Virtual de Química, v.13, n.1, p.167-191, 2021. Disponível em: <https://www.revistavirtualdequimica.com.br>.
- FORERO N., LIU C., SABBAAH S.G., LOEWEN M.C., YANG T.C. **Assay Development for Metal-Dependent Enzymes-Influence of Reaction Buffers on Activities and Kinetic Characteristics**. ACS Omega. v.18, n.43, p.40119-40127, 2023. doi: 10.1021/acsomega.3c02835.
- JESUS E.G, SOUZA F.F, ANDRADE J.V, ANDRADE E., Silva M.L, CUNHA W.R, RAMOS R.C., CAMPOS O.S., SANTOS J.A.N, SANTOS M.F.C. **In silico and in vitro elastase inhibition assessment assays of rosmarinic acid natural product from Rosmarinus officinalis Linn**. Nat Prod Res., v.38, n.5, p.879-884, 2024. doi: 10.1080/14786419.2023.2196077.
- KUMAR V., ABBAS A.K., FAUSTO N., ROBBINS, COTRAN. **Bases patológicas das doenças**. 10 ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2023.
- MANCEK-KEBER, M. **Inflammation-mediating proteases: structure, function in (patho) physiology and inhibition**. Protein Pept Lett. v.21, n.12, 2014. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/264989955_Inflammation-Mediating_Proteases_Structure_Function_in_PathoPhysiology_and_Inhibition
- MOTA F.A.R., PEREIRA S.A.P., ARAUJO A.R.T.S., SARAIVA M.L.M.F.S. **Evaluation of Ionic Liquids and Ionic Liquids Active Pharmaceutical Ingredients Inhibition in Elastase Enzyme Activity**. Molecules, v.26, n.1, p.200, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26010200>.
- PULLAR JM, CARR AC, VISSERS MCM. **The Roles of Vitamin C in Skin Health**. Nutrients. v.12, n.9, p.866, 2017. doi: 10.3390/nu9080866.
- ROMERO, G.F; CASALOTI, L. G; SANTOS, J.A.N. **Inibição da elastase por extratos foliares aquosos e etanólicos de Sedum dendroideum: um estudo in vitro**. Jornada Sul-mineira de Iniciação Científica e Tecnológica (JOSIF), v.16, n.3, 2024.
- SARTOR L., PEZZATO E, GARBISA S. **(-)Epigallocatechin-3-gallate inhibits leukocyte elastase: potential of the phyto-factor in hindering inflammation, emphysema, and invasion**. J Leukoc Biol. v.71, n.1, p.73-9, 2002. PMID: 11781382.
- THRING T.S; HILI P; NAUGHTON D.P. **Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants**. BMC Complement Altern Med., v.4, n.9, p.27, 2009. doi: 10.1186/1472-6882-9-27.