



FRANCIELE DE CÁSSIA GUIMARÃES

**INIBIÇÃO DE SERINO PROTEASES POR EXTRATOS FOLIAR AQUOSO
E ETANÓLICO DE *CRASSULA OVATA*: UM ESTUDO *IN VITRO***

**INCONFIDENTES - MG
2016**

FRANCIELE DE CÁSSIA GUIMARÃES

**INIBIÇÃO DE SERINO PROTEASES POR EXTRATOS FOLIAR AQUOSO
E ETANÓLICO DE *CRASSULA OVATA*: UM ESTUDO *IN VITRO***

Trabalho de conclusão de curso apresentado como pré-requisito de conclusão de curso em Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Inconfidentes, para obtenção do título de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. DSc. Jorge Alexandre Nogueira Santos

**INCONFIDENTES – MG
2016**

FRANCIELE DE CÁSSIA GUIMARÃES

**INIBIÇÃO DE SERINO PROTEASES POR EXTRATOS FOLIAR AQUOSO
E ETANÓLICO DE *CRASSULA OVATA*: UM ESTUDO *IN VITRO***

Data de aprovação: 05/10/2016

**Prof. DSc. Jorge Alexandre Nogueira Santos
IFSULDEMINAS - Campus Inconfidentes
Professor Orientador**

**Prof. DSc. Marcelo Augusto dos Reis
IFSULDEMINAS - Campus Inconfidentes
Membro 1**

**Prof. DSc. Francisco Felipe Gomes de Sousa
IFSULDEMINAS - Campus Inconfidentes
Membro 2**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, por todo o amor, dedicação e por nunca medir esforços para que pudesse levar meus estudos adiante.

Agradeço ao meu orientador, Jorge Alexandre Nogueira Santos, pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela sua dedicação e confiança a mim direcionada.

Agradeço ao meu namorado, Samuel, pelo companheirismo, carinho e motivação durante esses anos.

Agradeço aos meus queridos amigos de faculdade, pelos momentos bons que passamos ao longo de todo o curso.

Agradeço a todos os professores do IFSULDEMINAS que contribuíram para minha formação.

RESUMO

Proteases são enzimas encontradas em todos os organismos vivos e estão envolvidas em diversas funções biológicas. Em humanos, a ação desregulada de algumas enzimas proteolíticas está envolvida em diversas doenças. Consequentemente, a descoberta de novas substâncias que controlem ou regulem a atividade de proteases envolvidas em diversas patologias é urgentemente necessária. O objetivo deste trabalho foi examinar os efeitos dos extratos brutos aquoso e etanólico da *Crassula ovata* sobre a atividade enzimática de três serino proteases: elastase, tripsina e proteinase K. Ambos os extratos apresentaram alta inibição contra estas enzimas. A elastase possui o melhor efeito inibitório, com valores de IC₅₀ de 1,7 (extrato aquoso) e 2,2 µg/ml (extrato etanólico), respectivamente. Estes resultados sugerem que os extratos de *C. ovata* podem ser uma fonte potencial de compostos bioativos para a descoberta de novos inibidores de proteases.

Palavras-chave: Serino protease; Elastase; Tripsina; Proteinase K; Inibidor de Protease.

ABSTRACT

Proteases are enzymes found in all living organisms and are involved in various biological functions. In humans, deregulated proteases activities play a key role in a variety of diseases. Consequently, the discovery of compounds that strictly control or regulate the activities of proteases involved in variety of pathologies is urgently needed. The purpose of this study was to examine the effects of crude aqueous and ethanolic extracts from *Crassula ovata* on the activity of three protease models: elastase, trypsin and proteinase K. Both extracts exhibited high inhibition against these enzymes. The best inhibitory effect was on elastase, with IC₅₀ values of 1,7 (aqueous extract) and 2,2 µg/ml (ethanolic extract), respectively. These results suggest that extracts of *C. ovata* could be a potential source of bioactive compounds for the discovery of new protease inhibitors.

Keywords: Serine protease; Elastase; Trypsin; Proteinase K; Protease Inhibitor

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. METODOLOGIA	9
2.1. MATERIAIS	9
2.2. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS E ETANÓLICOS	9
2.3. ENSAIOS PARA INIBIÇÃO PROTEOLÍTICA	9
2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	10
3. RESULTADOS.....	11
4. DISCUSSÕES	14
5. CONCLUSÃO	15
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
ANEXO I.....	18

1. INTRODUÇÃO

Proteases, também denominada peptidases, enzimas proteolíticas ou proteinases, são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas e peptídeos. As proteases podem ser classificadas como serino, cisteíno, metalo, treonina e aspartil protease, dependendo da natureza do resíduo de aminoácido ou cofator presente no sítio ativo que está envolvido no mecanismo de catálise enzimática (RAWLINGS; BARRETT, 1993). Um grande número de pesquisas recentes tem revelado que proteases se tornaram alvos importantes para o desenvolvimento de fármacos. Proteases são fundamentais para um grande número de processos fisiológicos como a digestão proteica, reprodução, coagulação sanguínea, sistema calicreína-cinina e fibrinólise (LOPES-OTIN; BOND, 2008). Em humanos, a atividade desregulada de proteases está relacionada com diversas condições patológicas como câncer, processos inflamatórios, trombose, artrite, doenças de pele e enfisema pulmonar. Por essa razão a atividade das proteases precisa ser controlada e regulada (ABBOUD; VIMALANATHAN, 2008). Um mecanismo de controle eficiente envolve a interação de proteases com proteínas conhecidas como inibidores de proteases (IPs). Essas proteínas ligam-se ao sítio catalítico das proteases formando complexos inativos através do bloqueio efetivo do sítio catalítico da enzima (LASKOWSKI; QASIM, 2000). IPs são também encontrados em plantas e atuam contra o ataque de insetos e micro-organismos. Além das proteínas, pequenas moléculas, naturais ou sintéticas, também podem inibir proteases de maneira seletiva (JEDINÁK *et al.*, 2006; WAHL *et al.*, 2011). Pesquisas recentes têm procurado em plantas e outros produtos naturais compostos que possam servir como protótipos para o desenvolvimento de fármacos, incluindo inibidores de protease (NEWMAN; GRAGG, 2016).

As serino proteases são a classe de enzimas proteolíticas mais estudadas (MURI *et al.*, 2005). Elastase, tripsina e proteinase k são exemplos de serino proteases. A elastase é secretada por neutrófilos e macrófagos e está envolvida em processos inflamatórios, na

degradação de fibronectina, elastina do colágeno e outras proteínas. A ação da elastase é controlada pela α 1-antitripsina (A1AT), que se ligam irreversivelmente ao sítio ativo da enzima (MOHANKA *et al.*, 2012). A tripsina é uma importante enzima digestiva encontrada no intestino delgado e produzida pelo pâncreas. A atividade desregulada da tripsina pode levar à inflamação do pâncreas (pancreatite) e tumores (WHITCOMB, 2004; YAMAMOTO *et al.*, 2003). A proteinase K é uma serino protease produzida pelo fungo *Tritirachium album* Limber, que apresenta ampla especificidade com o substrato sendo muito utilizada na biologia molecular para a degradação de proteínas em células lisadas. Complexos de proteinase K e peptídeos têm sido relatados como estratégia para produzir inibidores de peptídeos (PAL *et al.*, 1994; SAXENA *et al.*, 1996).

Crassula ovata é uma planta ornamental e medicinal, conhecida popularmente como planta de jade ou árvore do dinheiro. A família Crassulaceae são dicotiledôneas com folhas suculentas, elípticas ou ovaladas, com pequenas flores brancas ou rosas. *C. ovata* é nativa da África do Sul, mas também é encontrada na China, Índia, Europa e América do Norte. Em muitas comunidades, a medicina tradicional utiliza o extrato aquoso desta planta para tratar verrugas, sintomas de diabetes, epilepsia e também usado como purgante (MUIRURI; MWANGI, 2016; WANG *et al.*, 2015).

Neste trabalho, a fim de identificar novos inibidores de proteases, extratos aquosos e etanólicos de *C. ovata* foram testados contra a atividade proteolítica das serino proteases elastase, tripsina e proteinase K.

2. METODOLOGIA

2.1. MATERIAIS

Enzimas: Elastase de pâncreas de porco (E.C 3.4.21.36, ≥ 4 U/mg), Tripsina de pâncreas de porco (E.C 3.4.21.4, 2000 BAEE U/mg), Proteinase K do fungo *Tritirachium album* (E.C 3.4.21.64, 30 U/mg).

Substratos: N-Succinil-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida, N α -Benzoil-L-arginina etil-éster hidrocloreto e N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida.

Extrato: Folhas da *C. ovata*.

Todos os matérias foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich.

2.2. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS E ETANÓLICOS

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 secadas 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 etanol 95%, 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 foi obtido. O mesmo procedimento foi utilizado para preparação do extrato aquoso.

2.3. ENSAIOS PARA INIBIÇÃO PROTEOLÍTICA

Para cada uma das enzimas foi utilizado um substrato cromogênico: N-Succinil-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida para elastase, N α -Benzoil-L-arginina etil éster hidrocloreto para tripsina e N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida para proteinase K. Todos os ensaios enzimáticos de inibição foram conduzidos utilizando o mesmo procedimento. Cada enzima

(concentração final de 10 µg/ml) foi incubada em tampão fosfato de sódio (50 mM, pH= 8) com os extratos da planta (aquoso e etanólico) em diferentes concentrações (variação de 0,4 para 8 µg/ml para elastase e variação de 16 para 328 µg/ml para tripsina e proteinase K) à 25° C para um volume total final de 990 µl. Após 30 minutos, 10 µL de substrato para uma concentração final de 10 µM foi adicionado à mistura e a hidrólise do substrato cromogênico foi monitorada por 5 minutos utilizando-se um espectrofotômetro V-M5 Bel Photonics.

2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram apresentados como média ± desvio padrão. As análises estatísticas foram avaliadas utilizando o Microsoft Excel. Os valores do parâmetro de inibição IC₅₀, 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 utilizando o programa Grafit 5.0 (LEATHERBARROW, 1992). A porcentagem de inibição foi calculada pela equação:

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

3. RESULTADOS

Os valores do IC₅₀ (tabela 1) mostram que todas as três serino proteases testadas foram inibidas pelos extratos aquoso e etanólico das folhas de *C. ovata* com diferentes intensidades. Os extratos exibiram o melhor efeito inibitório sobre a elastase, onde os valores de IC₅₀ foram de 1,7 e 2,2 μg/ml, respectivamente. A tripsina foi inibida pelos extratos aquoso e etanólico de *C. ovata* com valores de IC₅₀ de 112,5 e 117,1 μg/ml, respectivamente, enquanto na proteinase K, os valores de IC₅₀ foram de 75,8 e 51,5 μg/ml, respectivamente.

Na concentração de 8 μg/ml de extrato aquoso e etanólico de *C. ovata*, a elastase sofreu inibição de 80 e 78%, respectivamente (Figura 1). A maior concentração de extrato bruto aquoso e etanólico de *C. ovata* testado sobre a tripsina e a proteinase K foi de 328 μg/ml. Essa concentração produziu uma inibição de 80 (extrato aquoso) e 88% (extrato etanólico) sobre a tripsina, enquanto que nessa mesma concentração, a Proteinase K sofreu inibição de 80 (extrato aquoso) e 90% (extrato etanólico), como mostram as figuras 2 e 3.

IC ₅₀ (μg/ml)			
	Elastase	Tripsina	Proteinase K
Extrato aquoso	1,7 ± 0,2	112,5 ± 8,2	75,8 ± 5,7
Extrato etanólico	2,2 ± 0,2	117,1 ± 6,8	51,5 ± 4,2

Tabela 1: Valores de IC₅₀ para Elastase, Tripsina e Proteinase K. Valores expressados como média ± desvio padrão, n=3.

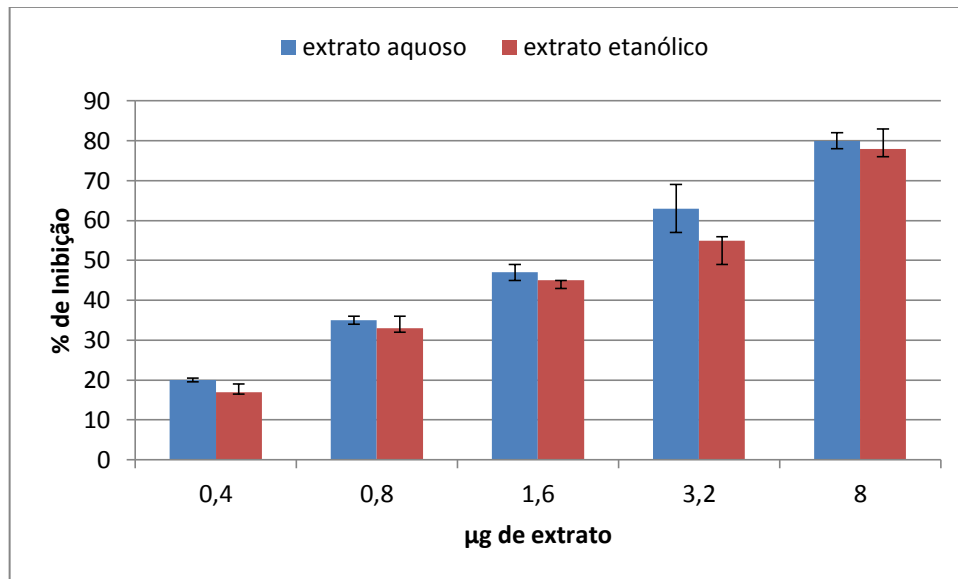


Figura 1: Porcentagem (%) de inibição da Elastase por extratos aquoso e etanólico. Barras de erro são expressadas como desvio padrão, n=3.

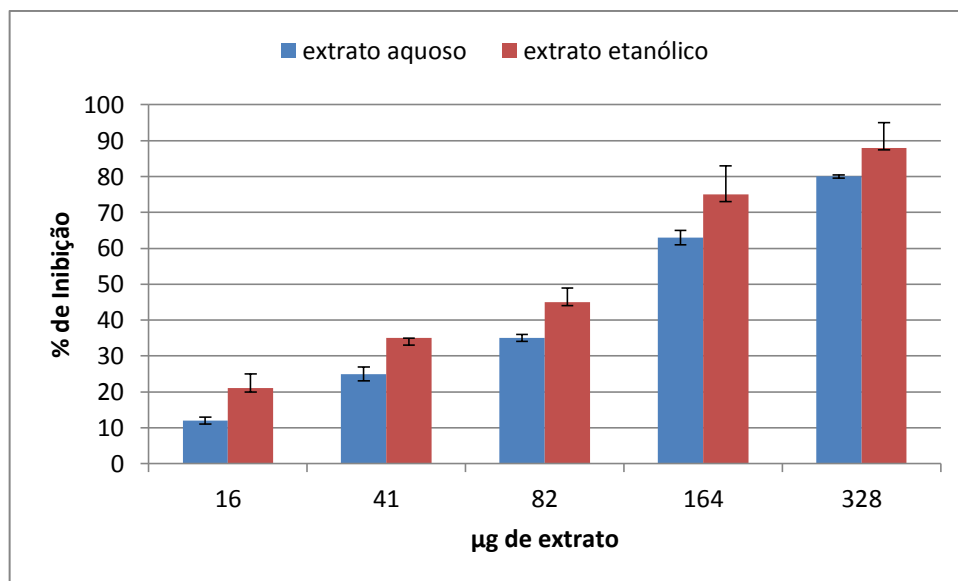


Figura 2: Porcentagem (%) de inibição da Tripsina por extratos aquoso e etanólico. Barras de erro são expressadas como desvio padrão, n=3.

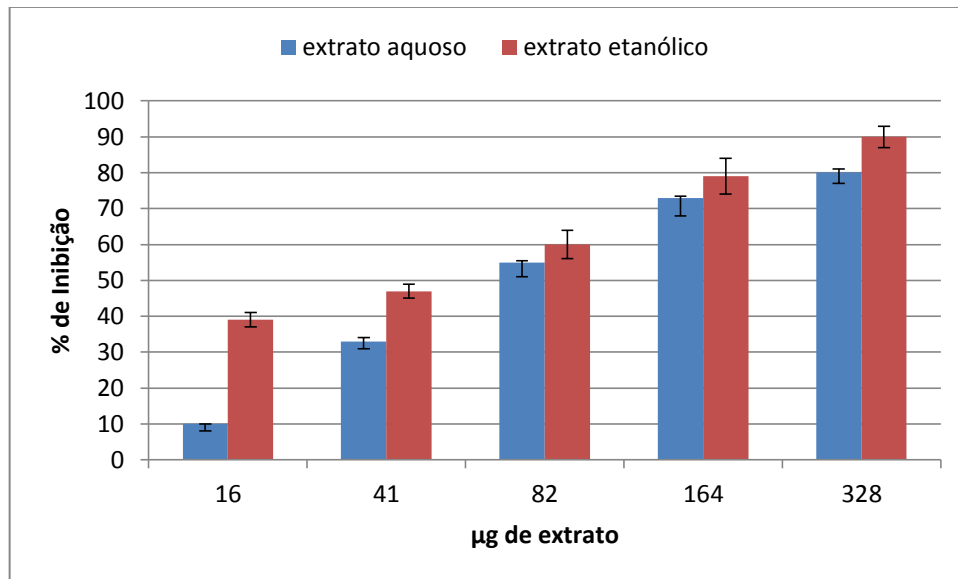


Figura 3: Porcentagem (%) de inibição da Proteinase K por extratos aquoso e etanólico. Barras de erro são expressadas como desvio padrão, n=3.

4. DISCUSSÕES

Produtos naturais, tal como extratos de plantas, fornecem oportunidades ilimitadas para descoberta de novos inibidores de proteases. Plantas superiores produzem uma grande variedade de compostos químicos para proteção contra herbívoros, insetos e muitos destes compostos são inibidores de serino proteases (WINK, 1988; CUCCILIONI *et al.*, 2009). Produtos de defesa química incluem terpenos, polifenóis, taninos, peptídeos e proteínas (IBANEZ *et al.*, 2012). Como mencionado anteriormente, as plantas sintetizam proteínas (IPs) que inibem proteases digestivas presentes nos fluidos intestinais de insetos herbívoros, o que produziria uma diminuição de absorção dos aminoácidos essenciais necessários para o desenvolvimento desses insetos. IPs são proteínas comuns em muitas espécies de plantas e são encontradas em níveis elevados (1 a 10 % da proteína total) em folhas e sementes (RYAN, 1990). Em futuros experimentos pretendemos verificar a presença do IPs em *C. ovata*. Não há artigo na literatura que relata a presença de IPs nesta planta. No entanto, carboidratos, alcalóides e flavonóides foram encontrados em extratos aquosos e metanólicos de *C. ovata* (MUIRURI *et al.*, 2016). Flavonóides como inibidores de serino proteases, incluindo tripsina e elastase, são descritos por vários autores (SIN; KIM, 2005; MIDDLETON *et al.*, 2000; PARELLADA; GUINEA, 1995). Esses são compostos bioativos que podem estar envolvidos na inibição da atividade de serino proteases estudada no respectivo trabalho.

5. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo indicaram que os extratos aquosos e etanólicos da *C. ovata* tiveram uma atividade inibitória significativa sobre a atividade proteolítica da tripsina elastase e proteinase K. Essa conquista promissora pode levar a novas pesquisas em direção à identificação / isolamento de compostos bioativos em extratos de *C. ovata*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOUD, R.T.; VIMALANATHAN S. Pathogenesis of COPD. Part I: The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema. **International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases**. v.12, n.4, p.361–367, 2008.
- 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**. V.74, p.1–15, 2009.
- IBANEZ, S.; GALLET, C.; DESPRÉS, L. Plant insecticidal toxins in ecological networks. **Toxins**, v.4, p. 228-243, 2012.
- JEDINÁK, A.; MALIAR, T.; GRANCAI, D.; NAGY, M. Inhibition activities of natural products on serine proteases. **Phytother. Res.**, v.20, n.3, p.214-217, 2006.
- LASKOWSKI M. JR.; QASIM, M. A. What can the structures of enzyme–inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? **Biochim. Biophys. Acta**, v.1477, p.324–337, 2000.
- LEATHERBARROW, R.J. GraFit Version 5.0, **Erithacus Software Ltd**, Staines, U.K., 1992.
- LOPEZ-OTIN, C.; BOND, J.S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. **J. Biol. Chem**. v.283, p.30433–3043, 2008.
- MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacol Rev.**, v.52, p.673-751, 2000.
- MOHANKA, M.; KHEMASUWAN, D.; STOLLER, J.K. A review of augmentation therapy for alpha-1 antitrypsin deficiency. **Expert Opin Biol Ther.**, v. 12, n.6, p. 685–700, 2012.
- 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, n.1, p.1-12, 2016.
- MURI, E.M.F.; GOMES, M. JR.; COSTA, J.S.; ALENCAR, F.L.; SALES, A. JR.; BASTOS, M.L.; HERNANDEZ-VALDES, R.; ALBUQUERQUE, M.G.; CUNHA, E.F.F.; ALENCASTRO, R.B.; WILLIAMSON, J.S.; ANTUNES, O.A.C. N- t-Boc-amino acid esters of isomannide: potential inhibitors of serine proteases. **Amino Acids.**, v.27, p.153–159, 2005.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod.**, v.79, p.629–661, 2016.

PAL, G.P.; JANY, K.D.; TSERNOGLOU, D. Crystallization of an enzyme-inhibitor complex: proteinase K with its protein inhibitor, PK13. **Proteins**, v.19, n.2, p.161-162, 1994.

PARELLADA, J.; GUINEA, M. Flavonoid inhibitors of trypsin and leucine aminopeptidase: a proposed mathematical model for IC50 estimation. **J Nat Prod.**, v.58, n.6, p.823- 829, 1995.

RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J. Evolutionary families of peptidases. **Biochemical Journal**, Cambridge, Reino Unido, n. 290, p.205-218, 1993.

RYAN, C.A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.28, n.1, p.425-449, 1990.

SAXENA, A.K.; SINGH, T.P.; PETERS, K.; FITTKAU, S.; VISANJI, M.; WILSON, K.S.; BETZEL, C. Structure of a ternary complex of proteinase K, mercury, and a substrate-analogue hexa-peptide at 2.2 Å resolution. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v.25, n.2, p.195-201, 1996.

SIN, B.Y.; KIM, H.P. Inhibition of collagenase by naturally-occurring flavonoids. **Archives of Pharmacal Research**, v.28, n.10, p.1152-1155, 2005

WAHL, O.; OSWALD, M.; TRETZEL, L.; HERRES, E.; AREND, J.; EFFERTH, T. Inhibition of tumor angiogenesis by antibodies, synthetic small molecules and natural products. **Current Medicinal Chemistry**, v.18, n.21, p.3136-3155, 2011.

WANG, Z.Q.; GUILLOT, D.; LÓPEZ-PUJOL, J. *Crassula ovata*, a new alien plant for mainland China. **Collectanea Botanica**, Barcelona, Spain, v.009, n.34, p.1-3, 2015.

WHITCOMB, D.C. Value of genetic testing in the management of pancreatitis. **Gut**, v.53, n. 11, p.1710–1717, 2004.

WINK, M. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. **Theoretical Applied Genetics**, v.75, p.225-233, 1988.

YAMAMOTO, H.; IKU, S.; ADACHI, Y.; IMSUMRAN, A.; TANIGUCHI, H.; NOSHO, K.; MIN, Y.; HORIUCHI, S.; YOSHIDA, M.; ITOH, F.; KOHZOH, I. Association of trypsin expression with tumor progression and matrix metalloproteinase expression in human colorectal cancer. **The Journal of Pathology**, v.199, n.2, p.176–184, 2003.

ANEXO I

Inhibition of serine proteases by aqueous and ethanolic extracts of *Crassula ovata*: an in vitro study

Franciele de Cássia Guimarães and Jorge Alexandre Nogueira Santos*

Departamento of Biochemistry, Federal Institute of Education, Science and Technology South of Minas Gerais, Inconfidentes, Brazil

*Corresponding author

ABSTRACT

Proteases are enzymes found in all living organisms and are involved in various biological functions. In humans, deregulated proteases activities play a key role in a variety of diseases. Consequently, the discovery of compounds that strictly control or regulate the activities of proteases involved in variety of pathologies is urgently needed. The purpose of this study was to examine the effects of crude aqueous and ethanolic extracts from *C. ovata* (*Crassula ovata*) on the activity of three serine proteases: elastase, trypsin and proteinase K. Both extracts exhibited high inhibition against these enzymes. The best inhibitory effect was on elastase, with IC₅₀ values of 1.7 (aqueous extract) and 2.2 µg/ml (ethanolic extract), respectively. These results suggest that extracts of *Crassula ovata* could be a potential source of bioactive compounds for the discovery of new protease inhibitors.

Keywords: *Crassula ovata*; serine protease; elastase; trypsin; proteinase K; protease inhibitor.

INTRODUCTION

Proteases, also termed peptidases, proteolytic enzymes or proteinases, are enzymes that catalyze the hydrolysis of covalent peptidic bonds in proteins and peptides. Proteases can be classified as serine, cysteine, metallo, threonine and aspartic protease depending on the nature of the amino acid residue or cofactor at the active site that is involved in the mechanism enzyme catalysis (Rawlings & Barrett, 1993). Numerous recent experimental evidences revealed that proteases have become important targets for the rational development of drugs. Proteases are fundamental for several physiological processes such as protein digestion, mammalian reproduction, blood coagulation, kallikrein-kinin system and fibrinolysis (Lopes-Otin and Bond, 2008). In humans, deregulated protease activity confers many pathological conditions such as cancer, inflammatory states, thrombosis, arthritis, skin diseases and pulmonary emphysema. For this reason, the activities of proteases need to be regulated and controlled (Abboud and Vimalanathan, 2008). An efficient control mechanism involves interaction of the proteases with proteins called protease inhibitors (PIs). These protease inhibitors (PIs) binds to the catalytic site on the protease to form inactive complex, thus effectively blocking the catalytic site (Laskowski and Qasim, 2000). PIs are also found in plants and act against the attack of insects and microorganisms. Natural and synthetic small molecules also can selectively inhibit proteases as well as proteins (Jedinák et al., 2006; Wahl, et al, 2011). Plants and others natural products as sources to development of the new drugs prototypes, including inhibitors proteases, is still alive and well (Newman and Cragg, 2016).

Serine proteases are the most widely studied class of proteolytic enzymes (Muri et al., 2005). Elastase, trypsin and proteinase K are examples of serine proteases. Elastase is secreted by neutrophils and macrophages and is involved in inflammatory process, in the degradation of fibronectin, cross-linked elastin, collagen and others proteins. The elastase action is controlled by α 1-antitrypsin (A1AT), which binds irreversibly to the active center of the enzyme (Mohanka et.al., 2012). Trypsin is an important digestive enzyme found in the small intestine and produced by the pancreas. The deregulated trypsin activity leads to pancreatic inflammation (pancreatitis) and tumor progression (Whitcomb, 2004; Yamamoto et al. 2003). Proteinase K is a serine protease produced by fungus *Tritirachium album Limber*, that exhibits broad substrate specificity and has been used in molecular biology for the degradation of proteins in cell lysates. Complexes of proteinase K and peptides have been reported as strategy to design peptides inhibitors (Pal et al., 1994; Saxena et al., 1996)

C. ovata, an ornamental and medicinal plant, is commonly known as the jade plant or the money tree. They are a family of dicotyledonous plants, of succulent genera, with white or pink flowers and leaves egg-shaped to elliptic. *C. ovata* is a native plant to South Africa, but it is also found in China, India, Europe and North America. In many communities, the traditional medicine use the aqueous extracts of this plant used to treat warts, symptoms of diabetes, diarrhea, epilepsy and are also used as a purgative (Muiruri and Mwangi, 2016; Wang et al., 2015)

In this work, in order to identify news protease inhibitors, aqueous and ethanolic extracts of *C. ovata* were tested for inhibition of serine proteases elastase, trypsin and proteinase K.

MATERIALS AND METHODS

Materials: Elastase from porcine pancreas (E.C 3.4.21.36, ≥ 4 U/mg), Trypsin from porcine pancreas (E.C 3.4.21.4, 2000 BAEE U/mg), Proteinase K from Tritirachium album (E.C 3.4.21.64, 30 U/mg), N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide, N α -Benzoyl-L-arginine ethylester hydrochloride, N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide were purchased from Sigma Aldrich.

Preparation of aqueous and ethanolic extracts: The fresh and healthy leaves of *C. ovata* were collected at the herbarium of the Federal Institute of Education, Science and Technology of South of Minas Gerais (latitude 22° 19' 02" and longitude 46° 19 ' 42"), Inconfidentes, Brazil. About 10 g of leaves of the plant were dried for 72 hours in an electric oven (40 °C), milled into powder and soaked in 50 ml of 95 % ethanol. The resulting was filtered using Whatman filter paper N° 1 and a clear filtrate free of particles was obtained. The same procedure was followed for preparation of aqueous extract using distilled water.

Protease inhibition assays: Chromogenic substrates were applied for particular enzymes, N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide for elastase, N α -Benzoyl-L-arginine ethyl ester hydrochloride for trypsin and N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide for proteinase K. All enzymatic assays were performed in the same way. Each enzyme (final concentration of 10 μ g/ml) was incubated in sodium phosphate buffer (50 mM, pH 8) with the plant extracts (aqueous and ethanolic) in different final concentrations (range from 0.4 to 8.0 μ g/ml for elastase and range from 16 to 328 μ g/ml for trypsin and proteinase K) at 25° C in a total volume of 990 μ l. After 30 minutes, 10 μ L of substrate was used in order to reach a final

concentration of 10 μ M. The hydrolysis of chromogenic substrates for 5 minutes was monitored at a wavelength of 410 nm using a V-M5 Bel Photonics spectrophotometer.

Statistical Analysis: All experiments were performed in triplicate and data are presented as mean \pm standard error of mean (SEM). IC₅₀ values, that is, the extract concentration that inhibits 50% of the enzyme activity, were determined from plots of percent inhibition *versus* log inhibitor concentration and calculated by nonlinear regression using the Grafit program (Leatherbarrow, 1992). The percentage inhibition was calculated as:

$$\% \text{ inhibition} = |\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{extracts}}| / \text{Abs}_{\text{control}} \times 100 \%$$

RESULTS

Summary of IC₅₀ values (table 1) shows that all three serine proteases tested were inhibited by crude aqueous and ethanolic leaf extracts of *C. ovata* to a greater or lesser extent. These extracts exhibited the best inhibitory effect on elastase, with IC₅₀ values of 1.7 and 2.2 μ g/ml, respectively. Trypsin was inhibited by crude aqueous and ethanolic extracts of *C. ovata* with IC₅₀ values of 112.5 and 117.1 μ g/ml, respectively, while Proteinase K, the IC₅₀ values were 75.8 and 51.5 μ g/ml, respectively. A concentration of 8 μ g/ml of crude aqueous and ethanolic extracts of *C. ovata* produced elastase inhibition of 80 and 78%, respectively (figure 1). The highest concentration tested for the crude aqueous and ethanolic extracts of *C. ovata* in trypsin and Proteinase K assays were 328 μ g/ml (figures 2 and 3). This concentration produced trypsin inhibition of 80 (aqueous extract) and 88 % (ethanolic extract), while at the same concentration produced Proteinase K inhibition of 80 (aqueous extract) and 90 % (ethanolic extract).

DISCUSSION

Natural products, such as plants extracts, provide unlimited opportunities for new protease inhibitors. Higher plants produce a tremendous variety of chemical compounds for protection against herbivores insects and many of these compounds are serine protease inhibitors (Wink, 1988; Cuccilioni et al., 2009). Chemical defense products include terpenoids, polyphenols, tannins, peptides and proteins (Ibanez et al., 2012). As mentioned before, plants synthesize proteins (PIs) that inhibit digestive proteases present in gut fluids of herbivorous insects, which would produce a decrease absorption of the essential amino acids necessary for development of insect. PIs are common proteins in many plant species and are

found in high levels (1 to 10% of the total protein) in leaves and seeds (Ryan et al., 1990). In future experiments we intend to check the presence of PIs in *C. ovata*. To our knowledge, this is the first report of PIs presence in this plant. On the other hand, carbohydrates, alkaloids and flavonoids were found in aqueous and methanolic extracts of *C. ovata* (Muiruri and Mwangi, 2016). Flavonoids as inhibitors of serine proteases, including trypsin and elastase, are described by various authors (Sin and Kim, 2005; Middleton et al., 2000; Parellada and Guinea, 1995). These are bioactive compounds that may be involved in inhibition of serine proteases activities studied in their work.

CONCLUSION

The results of the present study indicated that the aqueous and ethanolic extracts of *C. ovata* had significant inhibitory activity on trypsin, elastase and proteinase K. This promising achievement may lead to new research towards to identification/isolation of bioactive compounds in the extracts of *C. ovata*.

REFERENCES

- Abboud, R.T., Vimalanathan S., (2008): "Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema". *International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases.*, 12 (4): 361–367.
- Cuccioloni, M., Mozzicafreddo, M., Onfili, L., Cecarini, V., Eleuteri, A.M., Angeletti, M., (2009): Natural occurring polyphenols as template for drug design. Focus on serine proteases. *Chem Biol Drug Des.*, 74: 1–15.
- Ibanez, S., Gallet, C., Després, L., (2012): Plant Insecticidal Toxins in Ecological Networks. *Toxins.*, 4: 228-243.
- Jedinák, A., Maliar, T., Grancai, D., Nagy, M., (2006): Inhibition activities of natural products on serine proteases. *Phytother. Res.*, 20(3): 214-217.
- Laskowski M. Jr., Qasim, M.A., (2000): What can the structures of enzyme–inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? *Biochim. Biophys. Acta.*, 1477: 324–337.
- Leatherbarrow, R.J., (1992): GraFit Version 5.0, Erithacus Software Ltd, Staines, U.K.
- Lopez-Otin, C., Bond, J.S., (2008): Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J. Biol. Chem.*, 283: 30433–3043.

- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., (2000): The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease and Cancer. *Pharmacol Rev.*, 52:673-751.
- Mohanka, M., Khemasuwan, D., Stoller, J.K., (2012): A review of augmentation therapy for alpha-1 antitrypsin deficiency. *Expert Opin Biol Ther.*, 12 (6): 685–700.
- Muiruri, M. D., Mwangi, W., (2016): Phytochemical and Antimicrobial Activity of (*Crassula ovata*) Jade Plant on Different Strains of BacteriaEuropean. *Journal of Medicinal Plants.*, 11(1): 1-12.
- Muri, E.M.F., Gomes, M. Jr., Costa, J.S., Alencar, F.L., Sales, A. Jr., Bastos, M.L., Hernandez-Valdes, R., Albuquerque, M.G., Cunha, E.F.F., Alencastro, R.B., Williamson, J.S., Antunes, O.A.C., (2005): N- t-Boc-amino acid esters of isomannide: potential inhibitors of serine proteases. *Amino Acids.*, 27:153–159.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., (2016): Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.*, 79: 629–661.
- Pal, G.P., Jany, K.D., Tsernoglou, D., (1994): Crystallization of an enzyme-inhibitor complex: proteinase K with its protein inhibitor, PK13. *Proteins.*, 19(2): 161-162
- Parellada, J., Guinea, M., (1995): Flavonoid inhibitors of trypsin and leucine aminopeptidase: a proposed mathematical model for IC50 estimation. *J Nat Prod.*,58(6): 823- 829.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., (1993): Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal.*, 290: 205-218.
- Ryan, C.A., (1990): Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 28(1): 425-449.
- Saxena, A.K., Singh, T.P., Peters, K., Fittkau, S., Visanji, M., Wilson, K.S., Betzel, C., (1996): Structure of a ternary complex of proteinase K, mercury, and a substrate-analogue hexa-peptide at 2.2 Å resolution. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics.*, 25(2): 195-201.
- Sin, B.Y., Kim, H.P., (2005): Inhibition of collagenase by naturally-occurring flavonoids. *Archives of Pharmacal Research.*, 28(10): 1152-1155.
- Wahl, O., Oswald, M., Tretzel, L., Herres, E., Arend, J., Efferth, T., (2011): Inhibition of Tumor Angiogenesis by Antibodies, Synthetic Small Molecules and Natural Products. *Current Medicinal Chemistry.*, 18(21): 3136-3155.
- Wang, Z.Q., Guillot, D., López-Pujol, J., (2015): *Crassula ovata*, a new alien plant for mainland China. *Collectanea Botanica.*, 09(34): 1-3.
- Whitcomb, D.C., (2004): Value of genetic testing in the management of pancreatitis. *Gut.*, 53(11): 1710–1717.

Wink, M., (1988): Plant breeding: Importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical Applied Genetics.*, 75: 225-233.

Yamamoto, H., Iku, S., Adachi, Y., Imsumran, A., Taniguchi, H., Nosho, K., Min, Y., Horiuchi, S., Yoshida, M., Itoh, F., Kohzoh, I., (2003): Association of trypsin expression with tumour progression and matrix metalloproteinase expression in human colorectal cancer. *The Journal of Pathology.*, 199(2): 176–184.

Table 1: IC₅₀ values for elastase, trypsin and proteinase K inhibition. Values are expressed as mean ± SD (n=3).

IC ₅₀ (µg/ml)			
	Elastase	Trypsin	Proteinase K
Aqueous extract	1,7 ± 0,2	112,5 ± 8,2	75,8 ± 5,7
Ethanollic extract	2,2 ± 0,2	117,1 ± 6,8	51,5 ± 4,2

Figure 1: % inhibition of elastase by aqueous and ethanolic extracts. Erro bars represented standard deviations, n=3.

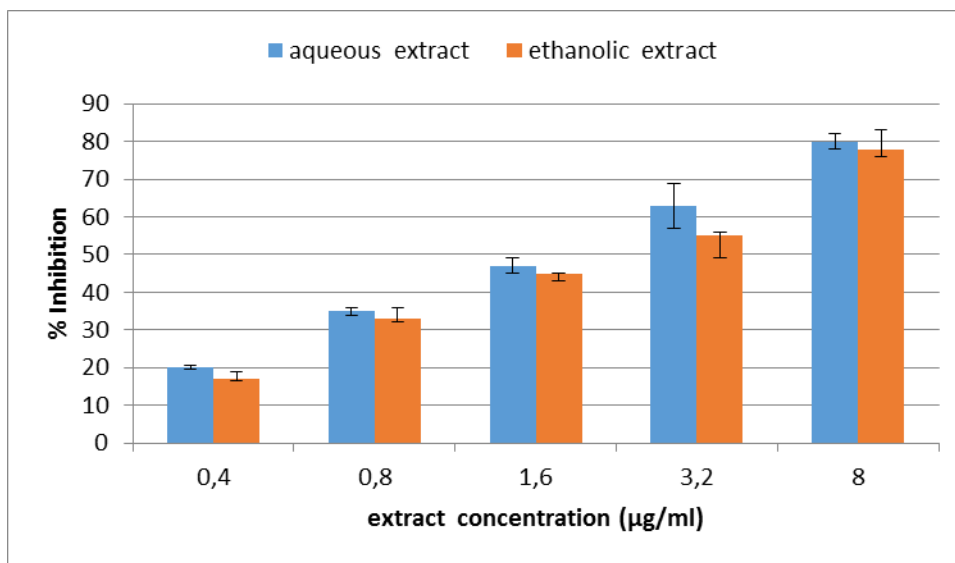


Figure 2: % inhibition of trypsin by aqueous and ethanolic extracts. Erro bars represented standard deviations, n=3.

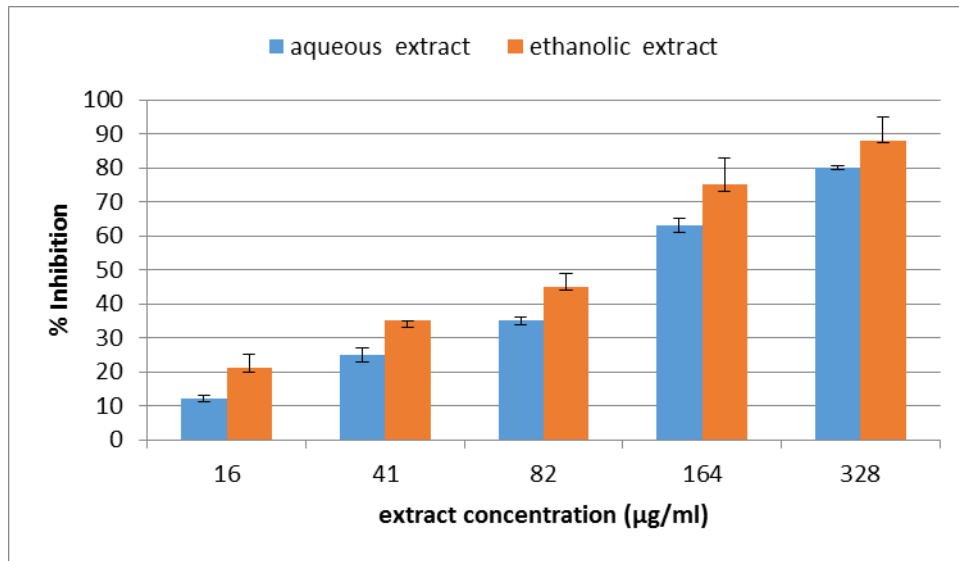


Figure 3: % inhibition of proteinase K by aqueous and ethanolic extracts. Erro bars represented standard deviations, n=3.

