

## Caracterização e atividade de extratos de plantas de uma espécie de *Bauhinia* sobre a ação de Metaloproteinases

### Characterization and activity of extracts from plants of a *Bauhinia* species on Metalloproteinases action

Carac. e atividade de extratos de plantas de uma espécie de *Bauhinia* sobre a ação de MMPs.  
Charact. and activity of extracts from plants of a *Bauhinia* species on MMPs action

Kamilla Monteiro dos Santos<sup>1\*</sup>; Damiana Antonia Nunes de Fátima<sup>1</sup>; Izabella Faria<sup>1</sup>; Rosy Lara Maciel Azambuja Ribeiro<sup>1</sup>

#### ABSTRACT

*Metastasis is responsible for most cancer-related deaths. Such an event occurs through processes that include proteolytic degradation of extracellular matrix adjacent to the tumor. Matrix metalloproteinase (MMPs) 2, and 9 have influence on prognosis of human cancers because they cleave the major structural components of the basement membrane. These actions cause of MMPs attractive targets for studies of cancer and metastasis. This study evaluates the potential inhibitor in extracts of a species of *Bauhinia* on enzymatic activity of MMP 2 and 9 and acknowledge the group of secondary metabolites responsible for this property. After fractionation bio directed three fractions were obtained from the column with ability to inhibit 100% these enzymes. The phytochemical study of these fractions showed flavonoids and alkaloids. Therefore, the stems extracts of the species worked have molecule inhibitors of metalloproteinase. Possibly such inhibition was caused by flavonoids and alkaloids.*

**Key-words:** Gelatinase; Metastasis, Plant extracts, Fractionation column, Phytochemistry.

<sup>1</sup> Universidade Federal de São João del-Rei Campus Centro-Oeste Dona Lindu – Laboratório de Biologia Celular e Mutagenicidade - Av. Sebastião Gonçalves Coelho, 400, Chanadour - Divinópolis-MG 35501-296 – Minas Gerais. E-mail: kamillamonteiro07@gmail.com

#### RESUMO

A metástase é responsável pela maioria das mortes relacionadas ao câncer. Tal evento ocorre a partir de processos que incluem a degradação proteolítica da matriz extracelular adjacente ao tumor. As metaloproteinases de matriz (MMPs) 2 e 9 têm influência no prognóstico das neoplasias humanas, porque clivam os principais componentes estruturais da membrana basal. Estas ações fazem das MMPs alvos atraentes para estudos de câncer e metástase. Este trabalho avalia o potencial inibidor dos extratos de uma espécie de *Bauhinia* sobre a atividade enzimática de MMP 2 e 9 e busca reconhecer o grupo de compostos secundários responsáveis por esta propriedade. Após fracionamento biodirecionado, foram obtidas três frações de coluna capazes de inibir 100% destas enzimas. O estudo fitoquímico das frações apresentaram flavonoides e alcaloides. Sendo assim, os extratos de caules da espécie trabalhada possuem moléculas inibidoras das metaloproteinases. Possivelmente, tal inibição foi ocasionada por flavonoides e alcaloides.

**Palavras-chave:** Gelatinase, Metástase, Extratos vegetais, Fracionamento em coluna, Estudo fitoquímico.

#### INTRODUÇÃO

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são zincoproteases dependentes de cálcio e são responsáveis pela degradação da matriz extracelular de tecidos<sup>1</sup>. Dentro da família de MMPs humanas, a MMP-2 (gelatinase A) e a MMP-9 (gelatinase B) têm como função clivar, entre outros componentes, o colágeno tipo IV, que é um dos principais componentes estruturais da lâmina basal. Vários estudos têm demonstrado a influência das MMPs no prognóstico do câncer, associando expressões mais elevadas destas enzimas com o aumento da agressividade dos tumores e o desenvolvimento de metástase. Responsável por cerca de 90% das mortes de pacientes com câncer, a metástase é um mecanismo extremamente devastador<sup>2</sup>, visto que é uma das principais causas da alta mortalidade por câncer, contra o qual não estão limitados recursos terapêuticos ou clínicos<sup>3</sup>.

O gênero *Bauhinia* é popularmente conhecido no Brasil como “Pata-de-Vaca” e é amplamente utilizado na medicina tradicional como

antidiabético ou agente antioxidante<sup>4</sup>. Na Índia, praticamente todas as partes do vegetal são usadas pelo sistema da medicina *Ayurvédica* no tratamento de doenças, como: febre, lepra, feridas e tumores<sup>5</sup>. Um estudo recente revelou potencial capacidade de inibição de colinesterases<sup>6</sup>.

Deste modo, devido à possível ação antitumoral e de inibição enzimática por partes isoladas de diferentes espécies de *Bauhinia* e tendo em vista que a inibição de metaloproteinases por extratos de plantas pode ser um mecanismo para evitar a metástase de células neoplásicas, é de extrema relevância que seja avaliada a atividade dos extratos da espécie escolhida sobre a atividade de MMP-2 e MMP-9.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar, a partir de estudo fitoquímico, e verificar, a partir de zimograma, a ação de extratos de folhas, flores, caules e frutos de uma espécie do gênero *Bauhinia* sobre a inibição da atividade destas enzimas.

## METODOLOGIA

Amostras de folhas (I), flores (II), caules (III) e frutos (IV) foram coletadas de uma árvore localizada em Divinópolis (-20.1439 e -44.902899; -20.149716). A espécie foi identificada pelo Prof. Dr. Guilherme Araújo Lacerda (CRBio 44480/04-D) e depositada no Herbário fiel depositário da Universidade Federal de Minas Gerais, sob os códigos BHCB161590. As amostras tiveram suas partes separadas, lavadas em água corrente, secas em temperatura ambiente por sete dias e trituradas<sup>7</sup>. A produção do extrato bruto foi realizada por maceração exaustiva em álcool etílico 70%. Os macerados totais foram congelados em *super-freezer* a -80°C e liofilizados (Liofilizador modelo K 105, Liobras<sup>®</sup>) até a obtenção de amostras totalmente secas.

A inibição da atividade gelatinolítica de MMPs pelos extratos foi avaliada pela técnica de Zimograma de gelatina, adaptada de Ribeiro *et al.* (2010)<sup>8</sup>. Em todos os testes, foi utilizada a concentração de 0,09 g/mL de extrato liofilizado de cada amostra, diluída (entendi que foi a concentração

de extrato que foi diluída) em Dimetilsulfóxido (DMSO). Cada extrato foi adicionado a um poço de gel contendo 1,5 uL de MMP-2 e MMP-9 (Sigma-Aldrich Chemie, M9445 e M8945 respectivamente; em 1800ng/mL, em tampão SDS 2,5 g% e sacarose 1g%). Utilizou-se a mesma concentração de MMPs como controle positivo. Realizadas as corridas de eletroforese, imagens digitais dos géis foram obtidas pelo programa *Image Lpix*<sup>®</sup> (Loccus Biotecnologia<sup>®</sup>), e a análise da área branca (correspondente à atividade gelatinolítica das MMPs) foi quantificada pelo programa *Axion Vizion*<sup>®</sup> Versão 4.8.6 (6-2010). A partir dos resultados, foi calculada a percentagem de inibição da atividade gelatinolítica causada por cada extrato e realizada a seleção dos melhores resultados para a produção de partições líquido-líquido com os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol 70%. Depois a realização do zimograma das partições, previamente liofilizadas, os melhores resultados foram selecionados para o fracionamento em coluna por gravidade, eluída com solventes de polaridade crescente. Para a coluna, foi utilizada a sílica 60G. As frações coletadas da coluna foram liofilizadas e, destas, realizados novos zimogramas. Para identificar a presença de metabólitos secundários nos extratos, nas partições e frações, foram realizados testes fitoquímicos qualitativos de acordo com Matos (1988)<sup>9</sup>. Estes testes baseiam-se na observação visual da alteração da cor ou formação de precipitado após a adição de reagentes específicos.

## RESULTADOS

O extrato bruto de caule apresentou os melhores índices de inibição da atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9, com 83% e 99%, respectivamente. O extrato bruto do caule foi então o escolhido para a produção das partições. Após o zimograma, a partição que apresentou o melhor índice de inibição foi a hidroalcoólica, com 81% de inibição de MMP-2 e 96% de MMP-9. Esta partição foi selecionada para o fracionamento em coluna por gravidade. Depois de realizar o zimograma das alíquotas recolhidas da coluna, três frações (FR86, FR87 e FR91) apresentaram 100% de inibição da atividade gelatinolítica de MMP-2 (figura 1) e MMP-9

(figura 2). Estas frações foram eluídas das colunas pelas combinações de acetato de etilo/metanol (1:1, v/v) (FR86 e FR87) e metanol (FR91). Os estudos fitoquímicos destas frações revelaram a presença de flavonoides e alcaloides em comum.

Figura 1: Porcentagem de inibição de MMP-2 por frações de BVC. Controle I: MMP-2 sem adição de extratos, referente ao gel com amostras de FR7 a FR86; Controle II: MMP-2 sem adição de extratos, referente ao gel com amostras de FR87 a FR159.

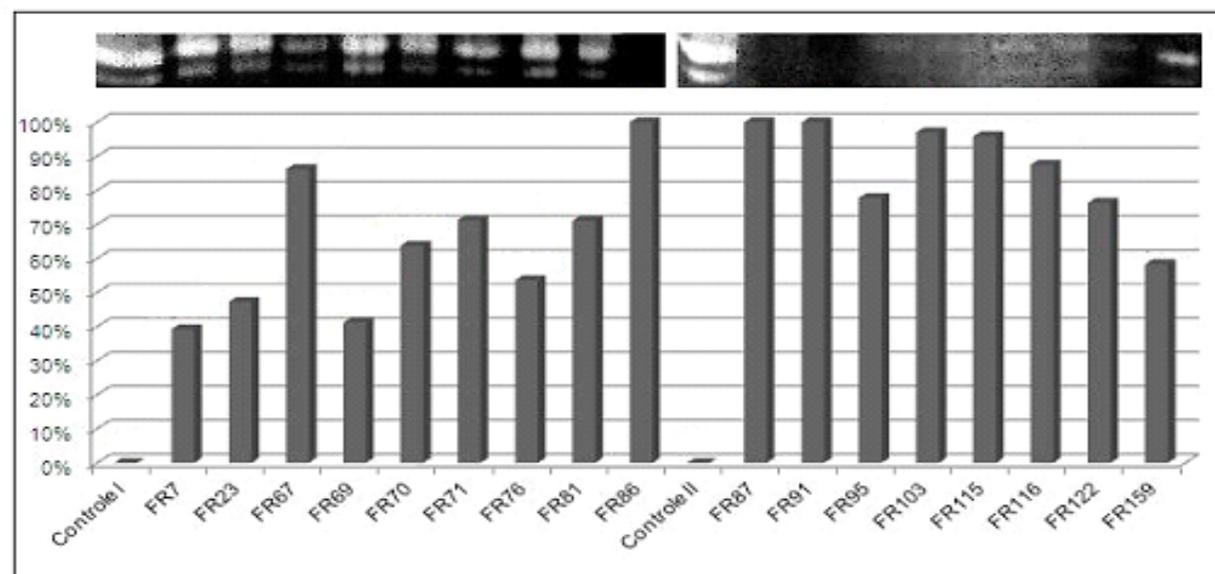
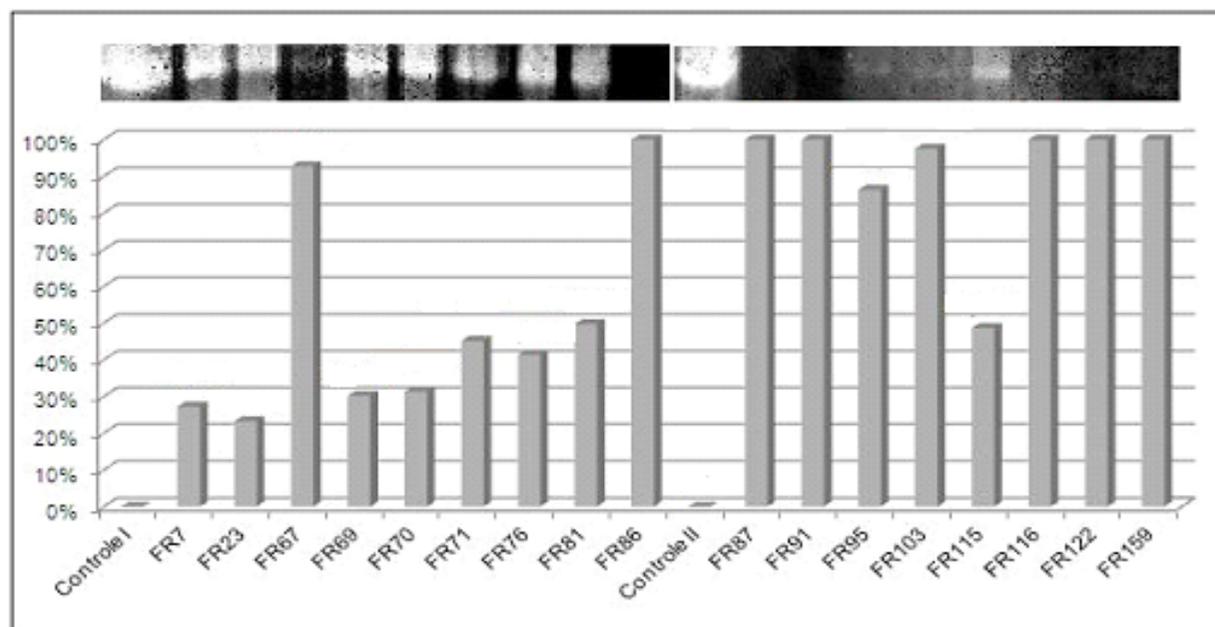


Figura 2: Porcentagem de inibição de MMP-9 por frações de 15IIIA. Controle I: MMP-9 sem adição de extratos, referente ao gel com amostras de FR7 a FR86; Controle II: MMP-9 sem adição de extratos, referente ao gel com amostras de FR87 a FR159.



Já se sabe que os flavonoides, fitocompostos polifenólicos encontrados em plantas, apresentam diversas atividades biológicas devido à sua capacidade de modular diversas enzimas e receptores. Estes compostos possuem ação protetora contra algumas doenças, por exemplo, o câncer. Um estudo recente revelou que os flavonoides quercetina, narigina e morina foram capazes de inibir a atividade de MMP-2, secretadas de fígado de camundongos com Carcinosarcoma de Walker 256<sup>10</sup>.

Os alcaloides têm sido utilizados pelos humanos desde a idade média. Atualmente, eles são empregados em uma infinidade de ações, porém existem poucos relatos da ação destes compostos em inibição de atividade de metaloproteinases<sup>11</sup>.

Os compostos secundários encontrados, neste trabalho, estão de acordo com os descritos na literatura e sugerem que, possivelmente, tanto flavonoides quanto alcaloides inibam as MMPs<sup>12</sup>.

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que os compostos inibidores da atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9 estão presentes nos caules da espécie estudada. Também foi possível concluir que tal inibição, possivelmente, foi ocasionada por flavonoides e alcaloides, que estavam presentes em comum nos extratos com atividade inibitória. Estas moléculas foram parcialmente isoladas pelos solventes acetato de etila/metanol (1:1, v/v) e metanol. Cabe ressaltar a necessidade de estudos mais aprofundados na tentativa de isolar os compostos presentes nas frações ativas, a fim de conhecer o papel destes separadamente, assim como reconhecer as moléculas bioativas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) NAGASE, H.; VISSE, ROBERT; GILLIAN, MURPHY; BAE, K. Structure and function of matrix metalloproteinase and TIMPs. **Cardiovascular Research**, v.69, p. 562 – 573, 2006.
- (2) WEIGELT, B.; PETERSE, JOHANNES L.; VAN'T VEER, LAURA J. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nature Reviews Cancer**, v.5, p. 591-602, 2005.
- (3) VICENT, S.; De las Rivas, Javier. Las metástasis óseas del cáncer. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, v.29, p. 177-187, 2006.
- (4) MORAES, EMILY ACARI DE; REMPEL, CLAUDETE; PÉRICO, EDUARDO; GUIMARÃES, STROHSCHOEN ANDREIA APARECIDA. Evaluation of glycemic profile in patients with diabetes mellitus typ II in health centers that use leaf infusion of *Bauhinia forficata* Link. **ConScientiae Saúde**, v.9, n.4, p. 569-574, 2010.
- (5) BODAKHE, S. H.; RAM, A. Hepatoprotective properties of *Bauhinia variegata* bark extract. **Yakugaku Zasshi**, v.127, n.9, p.1503-1507, 2007.
- (6) SANTOS, K. M.; GONÇALVES, P.S.; PAIVA, J.M.; LACERDA, G. A. Acetylcholinesterase inhibition starting from extracts of *Bauhinia variegata* L., *Bauhinia* var. *candida* (Aiton) Buch.-Ham., and *Bauhinia unguolata* L. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.44, n.6, p. 781-3, 2011a.
- (7) PANI, S. R. MISHRA, S.; SAHOO, S.; PANDA, P. K. Nephroprotective effect of *Bauhinia variegata* (Linn.) whole stem extract against cisplatin-induced nephropathy in rats. **Indian J Pharmacol**, v.43, n.2, p.200-2, 2011.
- (8) RIBEIRO, R. I. M. A. K.; JULIANA SAYURI; BORGES JÚNIOR, PAULO CESAR; BELETTI, MARCELO EMÍLIO; ESPINDOLA, FOUED SALMEN; CASSALI, GEOVANNI DANTAS; LOYOLA, ADRIANO MOTA. Inhibition of Metalloproteinases by *Aloe vera*, *Annona muricata* and Black tea aqueous extracts. **Biosci. J**, v.26, n.1, p. 121-127, 2010.
- (9) MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 6ed, 141p, Editora UFC, Fortaleza. 1988.
- (10) CAMARGO, C. D. A. **Atividade anticâncer de Quercetina, Narigina, Morina e Acetoxi dmu no tratamento terapêutico de ratos inoculados com carcinossarcoma de Walker 256**, 141f, 2011. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- (11) CHEN, X. W.; Di, Y. M.; Zhang, J.; Zhou, Z. W.; Li, C. G; Zhou, S. F. Interaction of herbal compounds with biological targets: a case study with berberine. **ScientificWorldJournal**, v. 2012, p. 708292, 2012.
- (12) ALVES, M. M. P. ANA MARIA S; PEREIRA, PAULO S; FRANÇA, SUZELEI C; BERTONI, BIANCA W. Caracterização química qualitativa de tinturas e extratos secos de plantas medicinais do Cerrado por cromatografia em camada delgada comparativa. **Scientia Plena**, v. 7, n. 12, 2011.