



Atividade da ATPase miosínica e seus parâmetros cinéticos frente ao extrato de folhas de *Blepharocalyx salicifolius*

Ariane Pereira Carvalho, discente de graduação, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguiana

Cleci Menezes Moreira, docente, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguiana

arianecarvalho.aluno@unipampa.edu.br

Através do conhecimento popular, muitas plantas são utilizadas para tratamento de diversas doenças, com isso, estudos com elas são fundamentais para comprovação dos seus efeitos. Uma destas plantas populares é a Murta (*Blepharocalyx salicifolius*), pertencente à família Myrtaceae. Esta planta é utilizada pela população como tendo efeitos digestivo, antidiarreico, antiespasmódico e hipotensor. A miosina cardíaca é a proteína com um sítio catalítico para hidrólise do ATP, responsável pela força gerada para contração muscular. Através da medida da atividade ATPásica da miosina pode-se inferir se extratos de plantas possuem efeito inotrópico cardíaco, uma vez que a sua atividade libera fosfato inorgânico (Pi) para geração de força do miócito. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do extrato aquoso das folhas da *Blepharocalyx salicifolius* na atividade da ATPase miosínica cardíaca e determinar seus parâmetros cinéticos. Para isso, foi preparado o extrato aquoso das folhas secas e trituradas (5%), através de infusão a 80°C, por 15 min, e posteriormente foi liofilizado. Para a extração da miosina, o ventrículo esquerdo de ratos *Wistar* machos (006/2021, Ceua), 3 meses de idade, (n=4), foi homogeneizado em solução tampão fosfato 150 mM contendo 0,6 M de KCl, pH 6,5. A miosina solubilizada pela ação de alta força iônica foi precipitada através da adição de água, centrifugada a 30.000 xg por 30 min. Este procedimento foi realizado duas vezes para a extração da miosina. O ensaio da atividade enzimática foi realizado em um tampão (pH 7,0) contendo 50 mM de HEPES; 5mM de CaCl₂; 0,6 M de KCl; sendo ATP (1mM) o substrato, em um volume final de 200 µL, a 30°C. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético a 10%. O fosfato liberado, foi determinado pelo método de Chan. A atividade específica da enzima foi expressa como fosfato inorgânico liberado pela hidrólise do ATP, em nmol de Pi/min/mg de proteína, e a proteína foi quantificada pelo método de Bradford, utilizando albumina bovina (1 mg/mL) como padrão. Foram testadas concentrações de 125, 625 e 1250 µg/mL do extrato para a determinação do efeito na atividade específica da enzima. Posteriormente foi realizada uma curva de substrato nas concentrações de 0,15; 0,25; 0,50 mM de ATP, frente a três concentrações de extrato (125, 250 e 350 µg/mL), para a determinação do tipo de inibição causada. A análise estatística foi realizada por ANOVA de 1 via, seguido de *post hoc* de Tukey, *p<0,05 foi considerado significativo. Os resultados em % de atividade do controle, foram: 68,01%; 41,54%*; 17,96%* respectivamente para 125; 625; 1250 µg/mL. Foi calculado um valor de IC₅₀ de 629,0 µg/mL, que é a concentração capaz de causar 50% de inibição da atividade. A inibição da atividade enzimática se deu de maneira concentração dependente. A partir dos dados da curva de substrato, construímos o duplo recíproco de Lineweaver-burk, onde plota-se 1/V_{max} versus 1/[Substrato, ATP].

Este *plot* mostrou uma inibição do tipo competitiva, pois o k_m aumentou na presença do seu inibidor (extratos da planta) e a velocidade máxima não se modificou. Valores de K_m de 0,125, 0,228; 0,309; 0,474 mM para sem inibidor, 125, 250, 350 $\mu\text{g/mL}$ de extrato, respectivamente). Valores de V_{\max} de 178,6; 175,4; 181,8; 175,4 nmol de Pi/min/mg de proteína, respectivamente para sem inibidor, 125, 250 e 350 $\mu\text{g/mL}$ de extrato). Esses resultados mostraram que o extrato aquoso da *Blepharocalyx salicifolius* foi capaz de inibir a atividade da ATPase miosínica a partir da concentração de 625 $\mu\text{g/mL}$ de maneira dose dependente e com a inibição do tipo competitiva. Estes resultados, são os primeiros estudos realizados com a atividade desta enzima e seus parâmetros cinéticos, determinados *in vitro*, frente a extratos vegetais, sugerindo que esta planta pode apresentar um possível efeito inotrópico negativo ao miocárdio.

Agradecimentos: UNIPAMPA.

Palavras-chave: Miosina; *Blepharocalyx salicifolius*; Murta; ATPase;